



Effect van aquathermie op microbiologische drinkwaterkwaliteit

Deel I | KWR 2023.010

Door

dr. ir. Nikki van Bel (KWR), ir. A. (Andreas) Moerman (KWR), ing.
Daniëlle van der Linde (KWR), Carola Koopmans (KWR)

12 april 2023



Auteurs: dr. ir. Nikki van Bel (KWR), ir. A. (Andreas) Moerman (KWR), ing. Daniëlle van der Linde (KWR), Carola Koopmans (KWR)
12 april 2023

Kwaliteitsborger: dr. Paul van der Wielen (KWR)

KWR 2023.010
Versie 1
WarmingUP Project 3B

Dit project is uitgevoerd als onderdeel van het Innovatieplan WarmingUP. Dit is mede mogelijk gemaakt door subsidie van de Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO) in het kader van de subsidieregeling Meerjarige Missiegedreven Innovatie Programma's (MMIP), bij RVO bekend onder projectnummer TEUE819001. WarmingUP geeft invulling aan MMIP-4 – Duurzame warmte en koude in gebouwde omgeving en levert daarmee een bijdrage aan Missie B – Een CO₂-vrije gebouwde omgeving in 2050.

[Projectnummer](#)
403185/003

[Keywords](#)
TED, thermische energie, potentieel

[Jaar van publicatie](#)
2023

[Meer informatie](#)
Andreas Moerman
T 030 6069 605
E andreas.moerman@kwrwater.nl

April 2023 ©

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevens bestand, 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.

Inhoudsopgave

Samenvatting	5
Dankwoord	6
Verklarende woordenlijst	7
1 Inleiding	9
1.1 Aanleiding	9
1.2 Doel en reikwijdte	9
1.3 Begripsbepaling TED	9
1.4 Samenhang met andere WarmingUP-rapporten	10
1.5 Samenhang met andere onderzoeksprogramma's	10
2 Achtergrond drinkwater	11
2.1 Productie en distributie van (drink)water	11
2.2 Temperatuur van drinkwater	12
2.3 TED in relatie tot ongewenste opwarming van drinkwater	13
3 State-of-the-art kennis effecten TED op microbiologische waterkwaliteit	14
3.1 Mogelijke risico's aquathermie voor drinkwaterkwaliteit	14
3.2 Bestaande onderzoeken en cases naar TED in het Nederlandse distributienet	16
4 Materialen en methoden	19
4.1 Inleiding	19
4.2 Opzet flowcellen	19
4.3 Opzet flowcellen in container ZOB	22
4.4 Opzet experimenten	23
4.5 Opportunistische pathogenen	26
4.6 Monsternamen	27
4.7 Laboratoriumanalyses	28
4.8 Statistische analyse	29
5 Resultaten KWR-experiment	31
5.1 Biofilmvorming	31
5.2 Opportunistische pathogenen	31
6 Resultaten PWN-experiment	36
6.1 Opstart en afbreken van experimenten	36
6.2 Temperaturen water en biofilm	36

6.3	PWN-experiment met bestaande biofilm	39
6.4	PWN-experiment zonder bestaande biofilm	44
7	Discussie	48
7.1	Inleiding	48
7.2	Representativiteit dosering micro-organismen	48
7.3	Effect temperatuur en materiaal op groei micro-organismen	48
8	Conclusies en aanbevelingen	57
8.1	Conclusies	57
8.2	Wat betekenen deze resultaten voor de praktijk?	58
8.3	Aanbevelingen voor vervolgonderzoek	59
9	Referenties	60
Bijlage I	Logboek van container en flowcellen	62
Bijlage II	Instellingen en optimalisatie temperatuur flowcellen, experiment PWN	64
Bijlage III	Tabellen KWR-experiment van resultaten opp. pathogenen	65
Bijlage IV	Resultaten opportunistische pathogenen in PWN-experiment met biofilm	67
Bijlage V	Resultaten opportunistische pathogenen in PWN-experiment zonder biofilm van	71

Samenvatting

Om te komen tot een duurzame warmtevoorziening zijn alle beschikbare bronnen in Nederland nodig. Ook drinkwaterbedrijven worden daarom steeds vaker benaderd met de vraag of zij warmte of koelcapaciteit willen aanbieden vanuit hun assets, zogenaamde “Thermische Energie uit Drinkwater” (TED). 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. Drinkwaterbedrijven willen daarom weten onder welke condities het leveren van warmte of koude uit het drinkwaternet veilig is.

TED wordt in Nederland al ongeveer 18 jaar toegepast, ook als collectieve warmtevoorziening, zoals in de wijk EVA-Lanxmeer in Culemborg. Bij TED als warmtewinning koelt het drinkwater af. Afhankelijk van de situatie kan TED ook een bron zijn van duurzame koude; het drinkwater warmt dan op. Een voorbeeld hiervan is het bestaande TED-systeem bij Sanquin in Amsterdam (Waternet). Hier wordt in het winterseizoen ‘koude gewonnen’ en opgeslagen in een bodemenergiesysteem voor koeling in de zomer. Er is nu nog onvoldoende kennis beschikbaar om te beoordelen tot welke temperatuur het gebruik van TED drinkwater mag opwarmen zonder de drinkwaterveiligheid in gevaar te brengen. Daarom worden grote veiligheidsmarges gehanteerd.

Binnen WarmingUP/ project 3B een proefopstelling met zogenaamde flowcellen gebouwd waarmee daadwerkelijk onderzoek gedaan kan worden naar de groei van micro-organismen op diverse materialen en bij verschillende temperaturen in een omgeving die voldoende representatief is vergeleken met een warmtewisselaar. Drinkwaterbedrijf PWN heeft een locatie ter beschikking gesteld voor de proefinstallatie. Op deze locatie werd drinkwater onttrokken aan een transportleiding van PWN en verzameld in een afzonderlijk systeem, zodat er geen risico bestond op uitwisseling van water uit de proefinstallatie met het drinkwater van PWN.

Deze studie is een eerste stap om de risico's van continue lokale opwarming (in de warmtewisselaar) op de microbiologische waterkwaliteit te bepalen en is vooral representatief voor het bepalen van de juiste proefopzet. Additioneel levert deze studie een aantal aanbevelingen voor de praktijk op.

Er wordt aanbevolen om – ten minste voor drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater – de inzet van materialen met een lage BPP-waarde voor pakkingen in warmtewisselaars te onderzoeken. Verder wordt aanbevolen om bij de toelaatbaarheid van TED niet alleen uit te gaan van de temperatuur van het uitgaande drinkwater, maar (met name) van de condities van de biofilm in de warmtewisselaar.

De ‘lessons learned’ uit deze studie zijn toegepast op een vervolgmeting die eind 2022 gestart is en doorloopt in de winter van 2023. Op basis van dit vervolgonderzoek (deel II) kunnen naar verwachting hardere conclusies getrokken worden over temperaturen waarbij aquathermie/ TED veilig toegepast kan worden, ook bij drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater.

Dankwoord

KWR is de betrokken medewerkers van drinkwaterbedrijf PWN erkentelijk voor het faciliteren van het onderzoek en de praktische ondersteuning bij de realisatie en bedrijfsvoering van de proefinstallatie. Zonder de bijdragen van met name Ljiljana Zlatanovic, Matthijs Rietveld en Jan Bakker was de realisatie van dit onderzoek en specifiek de praktijkproef bij Zuid Oost Beemster niet mogelijk geweest.

Verklarende woordenlijst

Aquathermie	Warmte- of koudewinning uit water waarvoor warmtewisselaars in de waterstroom worden geplaatst.
ATP	Een energierijk molecuul dat in alle (micro-)organismen aanwezig is. ATP wordt bepaald in water en in de biofilm en is een maat voor de hoeveelheid actieve biomassa (micro-organismen). Resultaten worden uitgedrukt in ng ATP/l (water) of pg ATP/cm ² (biofilm).
Biofilm	Een slijmerige laag die op nagenoeg alle materialen wordt gevormd die in contact staan met (drink)water. Deze laag bestaat o.a. uit micro-organismen, koolhydraten, eiwitten en andere moleculen. De hoeveelheid actieve biomassa (micro-organismen) in de biofilm wordt bepaald met ATP.
Biofilmmonitor	Een verticale glazen buis, met daarin op elkaar gestapeld ringen van verschillende materialen (b.v. glas of PVC-P), waar water doorheen stroomt en daarmee een biofilm op het materiaal gaat vormen. De temperatuur van het water kan ingesteld worden. Het water kan gecirculeerd worden, maar ook continu ververs.
BPP	Biomassaproductiepotentie van materialen. Een maat voor hoeveel biomassa dat gevormd kan worden op de nutriënten die uit materiaal (b.v. EPDM, RVS, PE) lekken en daarmee een voedingsbron vormen voor micro-organismen. Zo wordt bij een hoge BPP veel biomassa gevormd.
Flowcel	Een flowcel bootst een warmtewisselaar na. In de flowcellen stroomt drinkwater over plaatjes van verschillende materialen die in warmtewisselaars gebruikt worden (RVS-316 en EPDM) en van een materiaal waarvan bekend is dat het een hoge BPP heeft (PE). In tegenstelling tot een fullscale warmtewisselaar kan de flowcel makkelijk geopend worden voor bemonstering en analyse van de biofilm.
Heatblock	In dit onderzoek wordt hiermee bedoeld: De onderkant van de flowcel waar warm water doorheen stroomt om zo de plaatjes, biofilm en daarboven langsgstromende drinkwater op te warmen. Het heatblock, en het water daarin, bootsen het secundaire circuit van een echte warmtewisselaar na. Het water in het heatblock komt nooit in aanraking met de drinkwaterzijde.
Kweekmethode	Laboratoriummethode om het aantal kolonievormende eenheden (kve) van een specifiek micro-organisme te bepalen. Hiermee worden alleen levende micro-organismen aangetoond. Resultaten worden uitgedrukt in kve/l (water) of kve/cm ² (biofilm).
Opportunistische pathogenen	Micro-organismen die bij mensen met een verzwakt immuunsysteem (b.v. ouderen, zwangeren, ernstig zieke patiënten, zware rokers of mensen die medicijnen gebruiken om het immuunsysteem te onderdrukken na een

transplantatie) ziekte kunnen veroorzaken. Het bekendste voorbeeld is *Legionella pneumophila* dat de veteranenziekte veroorzaakt.

qPCR-methode	Laboratoriummethode om de hoeveelheid DNA (uitgedrukt in genkopieën (gk)) van een specifiek micro-organisme te bepalen. Dit DNA kan van levende en dode micro-organismen afkomstig zijn. De qPCR-methoden kan hierin geen onderscheid maken. Resultaten worden uitgedrukt in gk/l (water) of gk/cm ² (biofilm).
Steeklans	Via een steeklans wordt continu drinkwater uit de transportleiding van PWN bemonsterd. De steeklans bemonstert water uit het midden en het bovenste deel van de transportleiding.
TED	Thermische Energie uit Drinkwater. Hiervoor worden warmtewisselaars in het drinkwaterleidingnet geplaatst om koude of warmte uit het drinkwater te winnen.
Waterbad en warmtewisselaar	Het drinkwater dat over de plaatjes in de flowcel stroomt, wordt door middel van een warmtewisselaar op de juiste temperatuur gebracht. De warmtewisselaar staat aangesloten op een waterbad om zo de benodigde warmte of koude te leveren.
Waterfase	In dit onderzoek wordt hiermee bedoeld: het water dat door de flowcel stroomt en in contact staat met de biofilm op de plaatjes van de flowcel.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Bijna 40% van het energiegebruik in Nederland wordt gebruikt voor de warmtevoorziening. Aquathermie kan een substantiële bijdrage leveren aan duurzame warmte (en koude) in de gebouwde omgeving. Door (1) de winning van warmte en koude uit het 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 50% van de warmtevraag. Aquathermie met TED wordt 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. Hiervoor is in het verleden al verschillende keren onderzoek gedaan. Deze onderzoeken geven 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. 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 en bij verschillende temperaturen van drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater.

1.2 Doel en reikwijdte

Met deze studie is beoogd vast te stellen (1) of de gekozen onderzoeksopzet voldoet om betrouwbare uitspraken te doen over toelaatbare temperaturen voor aquathermie/ TED en (2) wat toelaatbare temperaturen zijn 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 Begripsbepaling TED

Onder het begrip TED (Thermische Energie uit Drinkwater) wordt thermische energie verstaan waarvan Nederlandse drinkwaterbedrijven (Figuur 1) bronhouder zijn. TED is daarbij onder te verdelen in de volgende brontypen:

- thermische energie uit drinkwater (reservoirs, transportleidingen, distributieleidingen);
- thermische energie uit ruwwater (transportleidingen voor voorgezuiverd ruwwater).



Figuur 1. Drinkwaterbedrijven in Nederland. Bron: Vewin Drinkwaterstatistieken 2017.

1.4 Samenhang met andere WarmingUP-rapporten

Dit rapport is onderdeel van project 3B van WarmingUP (Effecten van Aquathermie). Binnen dit project loopt ook een deelproject waarin de reikwijdte van – door TED – geïnduceerde temperatuurveranderingen in het drinkwaternet onderzocht wordt. Modellen om deze reikwijdte vast te stellen zijn mede binnen het WarmingUP-programma gevalideerd met metingen. Samen met de uitkomsten van deze validatiestudies beschrijft dit rapport de mogelijke impact van TED-systemen op het drinkwatersysteem.

1.5 Samenhang met andere onderzoeksprogramma's

Dit rapport is een beschrijving van het eerste deel van een groter onderzoek naar microbiologische effecten van aquathermie/ TED (vandaar de toevoeging 'Deel I' aan de titel).

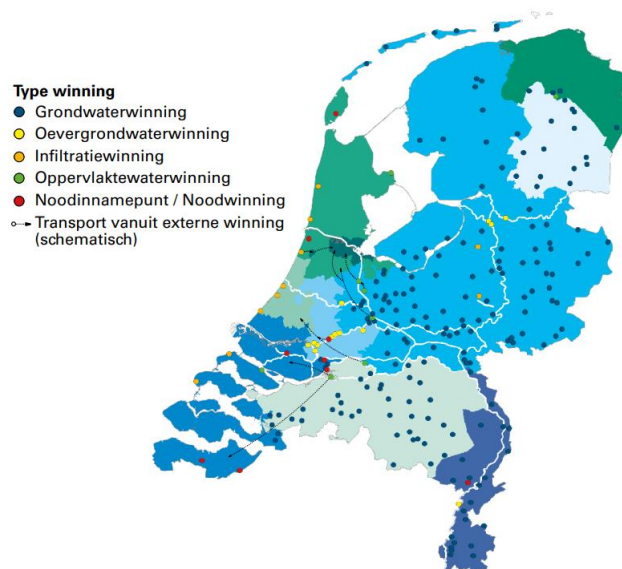
Dit rapport hangt samen met de rapportage van een vervolgproject ('Deel II') waarbij aanvullende metingen uitgevoerd zijn. Deel II van deze studie wordt uitgevoerd binnen het BTO WiCE programma van de drinkwaterbedrijven in samenwerking met aquathermie-partners.

2 Achtergrond drinkwater

2.1 Productie en distributie van (drink)water

Drinkwater wordt in Nederland gemaakt uit grondwater of (geïnfiltreerd) oppervlaktewater (Figuur 2). Na het zuiveringsproces vindt distributie van het drinkwater plaats via een leidingstelsel, bestaand uit transportleidingen ($\varnothing$ 300 – 1500 mm)¹ die het drinkwater transporteren naar een ringstructuur van secundaire leidingen ($\varnothing$ 160 – 300 mm). Deze leidingen voeden weer zogenaamde tertiaire leidingen ($\varnothing$ < 160 mm) die het water distribueren naar aansluitleidingen naar de klanten. Dit leidingstelsel heeft een totale lengte van ca. 120.000 km in Nederland. In 2019 werd 1.187 Mm³ drinkwater geproduceerd en gedistribueerd (Vewin, Drinkwaterstatistieken, 2020).

Al dit water bevat thermische energie die middels een warmtewisselaar uit het water gewonnen kan worden, voordat het verder gedistribueerd wordt.



Figuur 2. Overzicht van waterwinningen ten behoeve van drinkwaterproductie. Bron: Vewin Statistiek 2017.

Bij zogenaamde infiltratiewinningen (Figuur 2) is sprake van transport van voorgezuiverd ruwwater vanuit een oppervlaktewaterwinning naar een infiltratiepunt, zoals de Waterleidingduinen bij Amsterdam of de infiltratiegebieden van PWN in het Noordhollands Duinreservaat. Dit gebeurt doorgaans middels grote leidingen en in grote hoeveelheden van voorgezuiverd ruwwater.

Voor de meeste leidingen geldt dat de volumestromen van drinkwater in het leidingnet gedurende een etmaal sterk fluctueren. Dit komt doordat het drinkwaterverbruik bij de klant de stroming in het leidingnet bepaalt en het drinkwaterverbruik fluctueert sterk over de dag. Voor de meeste leidingen geldt daarom dat er 's nachts bijna geen water door de leiding stroomt, terwijl er 's morgens tussen 7.00 en 8.00 uur en 's avonds tussen 17.00 en 19.00 pieken in volumestromen optreden. Met name de avondpiek is in de zomer nog hoger vanwege o.a. het beregenen van tuinen met drinkwater.

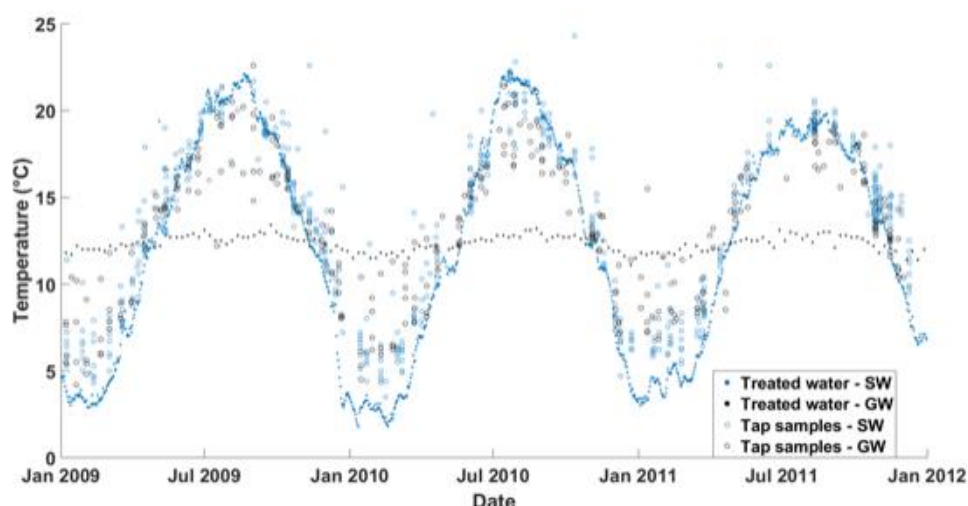
¹ De genoemde spreiding van diameters is een indicatie. Het onderscheid dat wordt beschreven is een functioneel onderscheid, en valt alleen grofweg samen met onderscheid in diameter.

Wanneer zich benedenstrooms van een waterleiding een buffer (reinwaterreservoir genoemd) bevindt, zal deze leiding een meer constante volumestroom hebben omdat het reservoir de fluctuaties benedenstrooms van het buffer opvangt. Infiltratiegebieden zoals de duinen fungeren ook als een buffer. Een dergelijk constante bedrijfsvoering is doorgaans alleen het geval bij (zeer) grote transportleidingen, bijvoorbeeld voor het transport van grondwater of voorgezuiverd ruwwater naar een zuivering. Reinwaterreservoirs zijn doorgaans op locatie van een drinkwaterzuivering te vinden om een zuiveringsproces zo constant mogelijk te kunnen bedrijven. Op sommige locaties zijn ook reservoirs in het distributienet te vinden.

2.2 Temperatuur van drinkwater

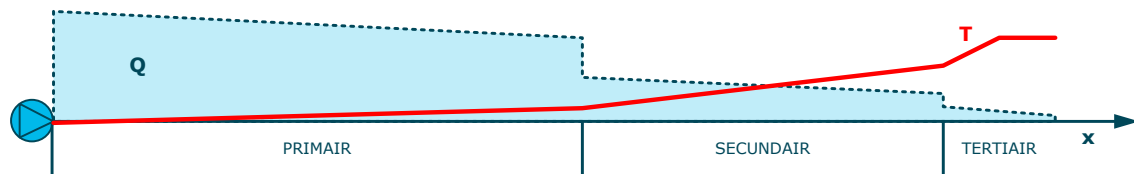
Om de mogelijkheden van TED goed te begrijpen is het allereerst van belang om begrip te hebben van de temperatuur van het drinkwater in het leidingnet tussen bron en klant. De temperatuur van het drinkwater is gedurende het transport in het drinkwaterleidingnet niet constant. Uit onderzoek is gebleken dat het drinkwater de bodemtemperatuur aangenomen heeft wanneer het de klant bereikt. 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 de kleinere diameter leidingen in het drinkwaterleidingnet. Afhankelijk van de bron (grondwater, oppervlaktewater) en het seizoen warmt het drinkwater op of koelt het af gedurende het verblijf in het drinkwaterleidingnet. Vanuit het perspectief van warmtelevering betekent dit dat het drinkwaterleidingnet in de zomer fungeert als een 'collector voor bodemenergie', en TED eigenlijk een manier is om bodemenergie te winnen.

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 3).



Figuur 3. Resultaat van temperatuurmetingen aan de tap gedurende een jaar. De lijnen geven de brontemperatuur aan gedurende het 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 [1].

Voor tertiaire drinkwaterleidingen kan dus aangenomen worden dat het drinkwater de bodemtemperatuur aangenomen heeft. Voor transportleidingen is de temperatuur afhankelijk van de bron (grondwater, oppervlaktewater) en de verblijftijd in het transportnet. Dit is schematisch weergegeven in Figuur 4.



Figuur 4. Schematische weergave verloop volumestroom (Q) en temperatuur (T) in het leidingnet tussen (bovenstrooms) het pompstation en (benedenstrooms) de klant uitgaande van een zomerse dag waarbij het drinkwater opwarmt in het leidingnet.

2.3 TED in relatie tot ongewenste opwarming van drinkwater

Zoals uitgelegd in § 2.2 is de temperatuur van de bodem bepalend voor de temperatuur waarmee het drinkwater aankomt bij de klant. Door klimaatverandering neemt de gemiddelde temperatuur toe. Als de zomers warmer worden, dan wordt ook de bodem in die zomers warmer. Studies van KWR hebben laten zien dat er in het drinkwaterleidingnet hotspots aan te wijzen zijn; locaties waar het warmer is dan gemiddeld [2]. 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 (hogetemperatuur)warmtenetten. Dit betekent ook dat koude-onttrekking (opwarming) van drinkwater in de winter in zekere mate mogelijk is zonder substantiële invloed op de temperatuur van het drinkwater bij de klant. Lokaal kunnen door warmteonttrekking- of toevoeging wel grotere temperatuurfluctuaties optreden. Met het onderzoek beschreven in dit rapport is beoogd antwoord te geven op de vraag in hoeverre dit ook tot veranderingen in de microbiologische waterkwaliteit leidt. Hierop wordt verder ingegaan in de hierna volgende hoofdstukken.

3 State-of-the-art kennis effecten TED op microbiologische waterkwaliteit

3.1 Mogelijke risico's aquathermie voor drinkwaterkwaliteit

3.1.1 Opportunistische pathogenen

In Nederlands drinkwater is de concentratie beschikbaar organisch koolstof laag. Dit zijn de nutriënten waarop micro-organismen in drinkwatersystemen kunnen groeien. Desondanks is groei van micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem mogelijk. Onder micro-organismen die zich in drinkwatersystemen kunnen vermeerderen vallen ook de opportunistische pathogenen: 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 [3-5]. 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 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.

Omdat de verwachting is dat in een toekomstige samenleving er steeds meer mensen zullen zijn met een verzwakt immuunsysteem, is een toename van opportunistische pathogenen in drinkwater (bijvoorbeeld als gevolg van opwarming van drinkwater, al dan niet door aquathermie) een aandachtspunt [8].

3.1.2 Hogere temperaturen van drinkwater en buiswand

Hogere temperaturen in het drinkwaterleidingnet kunnen verschillende oorzaken hebben. Door klimaatverandering zal de drinkwatertemperatuur en de temperatuur van de leidingen zelf steeds verder stijgen [1]. Maar ook lokaal kan het drinkwaterleidingnet opwarmen door de aanwezigheid van hotspots in de ondergrond, deze hebben een beperkt effect op de drinkwatertemperatuur maar zorgen wel voor een continu hogere temperatuur van de buiswand en de biofilm die zich daarop bevindt. Vanwege de drukte in de ondergrond en de energietransitie, waardoor steeds meer warmtenetten worden aangelegd en waarbij de afstand tot de drinkwaterleiding soms beperkt is, is de verwachting dat in de komende jaren meer hotspotlocaties aanwezig zullen zijn waar continu de temperatuur van de drinkwaterleiding verhoogd is.

Onderdeel van de energietransitie is de inzet van duurzame bronnen. Aquathermie/ TED is hiervan een voorbeeld. Bij TED worden warmtewisselaars in het drinkwaterleidingnet geplaatst om koude of warmte uit het drinkwater te winnen. Bij koudewinning zal het drinkwater opwarmen. 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. Hierdoor is het effect van opwarming van drinkwater beperkt. 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.

3.1.3 Effect van temperatuur op opportunistische pathogenen

Van de eerder genoemde opportunistische pathogenen *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* is bekend dat deze bij hogere temperaturen in een drinkwatermilieu kunnen groeien.

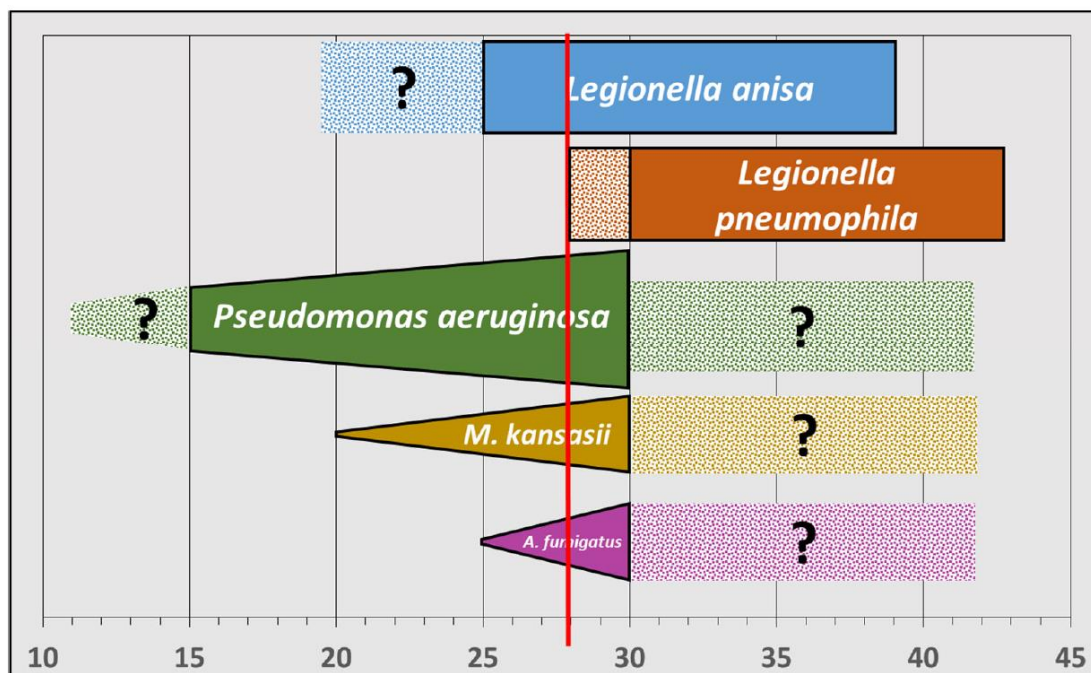
Hieronder wordt de kennis hierover kort beschreven en in Figuur 5 is deze informatie samengevat in een schematisch figuur.

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 en dit is in het laboratorium nagebootst door een biofilmmonitor gevuld met PVC-P materiaalringen die continu doorstroomd werd met drinkwater van verschillende temperaturen. Hierin kon *L. pneumophila* zich vanaf 31°C handhaven in de biofilm terwijl *L. anisa* al bij lagere temperaturen (vanaf 25°C) in hoge aantallen in de biofilm voorkwam [9, 10]. 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, *M. kansasii* en *A. fumigatus*

De invloed van temperatuur op groei van deze opportunistische pathogenen is alleen bekend uit onderzoek onder statische condities, zonder doorstroming maar met wekelijkse verversing van het water [11]. In experimenten met doorstroming in een biofilmmonitor was het namelijk niet gelukt om een stabiele populatie van de opportunistische pathogenen *P. aeruginosa*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* te krijgen [12]. In de experimenten onder statische condities was een worstcasesituatie nagebootst met glazen potten met daarin PVC-P materiaal, 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 is. 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. 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 echt toe. Voor alle drie de opportunistische pathogenen geldt dat bij toenemende temperaturen hogere aantallen werden waargenomen. Bij een stijging van de drinkwater- of biofilmt temperatuur 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 5. 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.

3.2 Bestaande onderzoeken en cases naar TED in het Nederlandse drinkwaterleidingnet

TED is in Nederland op een aantal plekken toegepast en daarbij zijn o.a. de effecten op de microbiologische kwaliteit van het drinkwater onderzocht. Dit is gedaan op full-scale warmtewisselaren op productielocaties Hoogeveen [13] en Culemborg [13], Sanquin in Amsterdam en in een hogeschool in het distributienet van Tilburg [14] (zie Tabel 1 voor specificaties van elke locatie). Daarnaast is ook een proefopstelling ontwikkeld voor onderzoeksdoeleinden die in het distributienet in Delft heeft gestaan [15]. Doordat de warmtewisselaren in Hoogeveen, Culemborg, Sanquin en Tilburg daadwerkelijk worden gebruikt in het distributienet, hebben deze een aantal nadelen voor gebruik in onderzoeksprojecten.

Zo was in Hoogeveen en Culemborg de watertemperatuur, uit voorzorgsmaatregelen, altijd onder de 15°C [13]. Zoals hierboven beschreven is uit eerder onderzoek bekend dat de meeste opportunistische pathogenen bij ideale voedingscondities pas vanaf 15°C kunnen groeien, met een enkele uitzondering die al vanaf 10°C kan groeien ([12, 16] en Figuur 5). Bij de lage temperaturen in Culemborg en Hoogeveen, en de beperkte temperatuurverschillen die door de warmtewisselaar veroorzaakt worden, was de verwachting dat er nauwelijks opportunistische pathogenen kunnen groeien. Bij bemonstering van het water (Culemborg en Hoogeveen) en de biofilm in de warmtewisselaar (Hoogeveen) zijn de opportunistische pathogenen inderdaad slechts sporadisch aangetroffen. De biofilm in Culemborg kon niet geanalyseerd worden.

Ook in de full-scale warmtewisselaar bij Sanquin in Amsterdam is als maximale watertemperatuur 15°C aangehouden. Bij deze warmtewisselaar zijn de wettelijke parameters KG22 en *Aeromonas* gemeten, met daarnaast ook ATP en directe celtelling (het totale aantal bacteriën in water). Hierin was geen duidelijk verschil zichtbaar tussen het inkomende en uitgaande drinkwater van de warmtewisselaar. De biofilm kon niet geanalyseerd worden.

In Tilburg varieerde de watertemperatuur sterk en winning van warmte was afhankelijk van het seizoen [14]. In de zomer was de temperatuur 14 – 21°C (ingaaand) en 11 – 18°C (uitgaand). Terwijl in de winter het in- en uitgaande water 10 – 19°C was. Omdat er in de winter geen warmte wordt gewonnen uit het water, staat het water in de warmtewisselaar regelmatig stil en kan het opwarmen door de omgevingstemperatuur in het gebouw van de hogeschool. Te sterke opwarming wordt tegengegaan door het regelmatig spoelen van de warmtewisselaar en de aan- en afvoerende leidingen. In Tilburg was alleen de opportunistische pathogeen *Acanthamoeba* spp. consistent aanwezig. *Acanthamoeba* spp. zijn eencellig dierlijk organisme (protozo) dat met name ooginfecties kan veroorzaken. De andere opportunistische pathogenen zijn alleen sporadisch aangetroffen. Ondanks dat het water in de warmtewisselaar in Tilburg vaak warmer is dan 15°C, zijn de opportunistische pathogenen dus alleen sporadisch aangetroffen. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat i) opportunistische pathogenen niet of nauwelijks in het inkomende water aanwezig zijn, ii) de temperatuur van de biofilm op de warmtewisselaar kouder is dan de watertemperatuur en daarmee vestiging en groei van opportunistische pathogenen moeilijk(er) maakt of iii) de opportunistische pathogenen zich nog niet hebben kunnen vestigen omdat de warmtewisselaar relatief nieuw was.

In een proefopstelling aan de TU Delft is het effect van een warmtewisselaar op de microbiologische waterkwaliteit getest bij 25°C en 30°C [15]. Hieruit bleek dat dit geen effect had op de wettelijke parameters voor microbiologische waterkwaliteit (o.a. ATP en *Aeromonas*). In deze experimenten konden echter geen opportunistische pathogenen gedoseerd worden en waren deze ook niet of nauwelijks aanwezig in het inkomende water waardoor ze zich nauwelijks in de biofilm van de warmtewisselaar konden vestigen. Het effect van de hogere temperaturen op de opportunistische pathogenen kon daarmee niet worden bepaald.

Tabel 1. Locaties met onderzoek naar het effect van aquathermie/ TED op de microbiologische kwaliteit van het drinkwater.

Case	Status	ΔT^* (°C)	Energie [kW]**	Afnemers	Watertype	Ref.
Fontys Tilburg	In gebruik	– 2,0	45	School	DW, distributienet	[14]
Thermobello Culemborg	In gebruik	– 4,0	590	~ 200 woningen 8 utiliteiten	DW, productielocatie	[13]
WMD Hoogeveen	In gebruik	– 2,0 / + 0,5	140 / 35	3 utiliteitsgebouwen	DW, productielocatie	[13]
TU Delft	Proefopstelling	+5 / +18	n.v.t.	n.v.t.	DW, distributienet	[15]
Sanquin Amsterdam	In gebruik	+ 1,5	5.500	Koudenet Sanquin	DW, transportleiding	[17]
WarmingUP	Proefopstelling	+ 7,0 / + 13,0	n.v.t.	n.v.t.	DW, transportleiding incl. dosering opp. path.	Dit rapport

*) ΔT = ontwerp temperatuurverandering hoofdstroom (na opmenging bypass) benedenstrooms van de warmtewisselaar, negatieve waarde; warmtewinning, positieve waarde; koudewinning.

**) Thermisch vermogen warmtewisselaar.

DW = drinkwater.

Bovenstaande studies (met uitzondering van de studie uit dit rapport) hebben meerdere nadelen om het potentiële risico van aquathermie op de drinkwaterkwaliteit te bepalen:

- De drinkwatertemperatuur is om veiligheidsredenen meestal onder de 15°C gehouden. Bij dergelijke temperaturen ligt het voor de hand dat er niet of nauwelijks groei mogelijk is van opportunistische pathogenen, wat de waarde van het onderzoek beperkt.
- In de full-scaleopstellingen (die daadwerkelijk in het drinkwaterleidingnet functioneren) kunnen geen opportunistische pathogenen gedoseerd worden. Dit was ook niet mogelijk in de proefopstelling bij de TU Delft. Hierdoor is vestiging en groei van opportunistische pathogenen in de warmtewisselaar sterk afhankelijk van of deze micro-organismen in het inkomende water aanwezig zijn. Als ze niet aangevoerd worden, kan het effect van temperatuur op groei van deze micro-organismen niet bepaald worden. Dit vergroot sterk de kans op een niet-representatieve uitkomst en een onderschatting van het mogelijke risico.
- Opportunistische pathogenen groeien in de biofilm en niet in het water. Bemonstering en analyse van de biofilm van full-scale warmtewisselaars is erg omslachtig en kan slechts eenmalig. Dit omdat de hele platenwisselaar gedemonteerd moet worden zodat er ruimte komt tussen de platen voor bemonstering. Dit proces verstoort de biofilm en daarnaast moet de wisselaar gereinigd worden (i.v.m. hygiëne van drinkwater) voordat deze weer in gebruik kan worden genomen. Dit maakt bemonstering van een full-scale warmtewisselaar erg kostbaar.

Verder hebben eerder uitgevoerde experimenten in het laboratorium, waarbij het effect van temperatuur op de groei van opportunistische pathogenen in een drinkwaterbiofilm wordt bepaald, het nadeel dat hierbij het water niet continu wordt ververs. Hierdoor zijn dergelijke laboratorium proeven minder representatief als het gaat om aanvoering van voedingsstoffen en hydraulische effecten zoals schuifspanning die de groei van de biofilm beïnvloeden.

In WarmingUP project 3B is daarom een opstelling gebouwd die bovenstaande nadelen niet heeft:

- een proefopstelling, in plaats van gebruik te maken van fullscale warmtewisselaars, zodat proeven met hogere temperaturen mogelijk zijn;
- continue doorstroming met vers drinkwater;
- geïsoleerd van het drinkwaterleidingnet zodat opportunistische pathogenen in hogere concentraties aan de proefopstelling gedoseerd kunnen worden;
- onafhankelijk van elkaar instellen van de temperatuur van het water en de warmtewisselaar van de proefopstelling.

Op deze manier kunnen diverse scenario's nagebootst worden, waarin bovenstaande limitaties voor vestiging en groei van opportunistische pathogenen kunnen worden opgeheven en vestiging en groei afhankelijk is van de temperatuur en waterkwaliteit.

4 Materialen en methoden

4.1 Inleiding

Om een warmtewisselaar in het drinkwaterleidingnet na te bootsen zijn flowcellen (in meer detail beschreven in § 4.2) ontwikkeld met daarin plaatjes van verschillende materialen (§ 4.4.1). Door de flowcellen stroomt drinkwater van verschillende temperaturen (§ 4.4.1), met daaraan opportunistische pathogenen gedoseerd (§ 4.5). Door de plaatjes te bemonsteren (§ 4.4.2 en § 4.6) en de biofilm daarop te analyseren, kan de groei van de gedoseerde opportunistische pathogenen in de tijd gevolgd worden.

Er zijn drie experimenten uitgevoerd met de flowcellen:

1. KWR-experiment (hoofdstuk 5):

Eerst is in de proefhal van KWR getest, met drinkwater van productielocatie Tull en 't Waal, of het principe van flowcellen met plaatjes gebruikt kan worden om groei van opportunistische pathogenen bij hogere temperaturen te bepalen.

2. PWN-experiment (hoofdstuk 6):

Na het KWR-experiment zijn in totaal vijf flowcellen in een container op de locatie ZOB (Zuidoostbeemster) geplaatst, boven een transportleiding van PWN vanaf productielocatie Andijk. Hierin zijn gelijktijdig twee experimenten uitgevoerd:

- a. Zonder bestaande biofilm;
- b. Met bestaande biofilm.

Voor het PWN-experiment is eerst een biofilm gegroeid op de plaatjes (hoofdstuk 6.3), tegelijkertijd is een kort, verkennend experiment uitgevoerd met plaatjes waarop geen biofilm aanwezig was bij de start § 6.4). Dit laatste experiment is uitgevoerd ter voorbereiding op vervollexperimenten (in een vervolgproject) zodat de juiste condities- en monsternamemomenten bepaald konden worden. Zo is bekend dat sommige opportunistische pathogenen beter een bestaande biofilm (experiment 'met biofilm') kunnen koloniseren, terwijl andere juist materialen zonder een biofilm (experiment 'zonder biofilm') kunnen koloniseren.

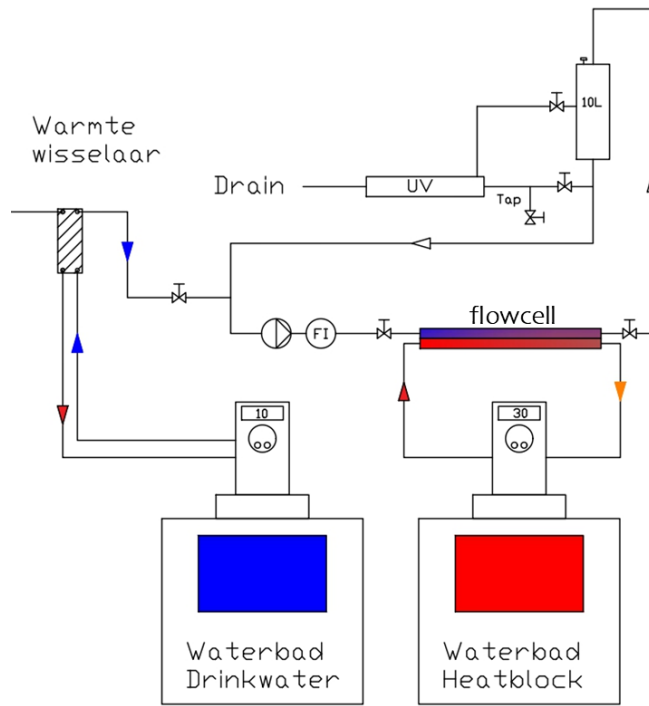
4.2 Opzet flowcellen

4.2.1 Algemeen

In de flowcellen stroomt drinkwater over plaatjes van verschillende materialen die in warmtewisselaars gebruikt worden (RVS-316 en EPDM) en van PE, 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 onderin de transportleiding aanwezig zijn) te voorkomen.

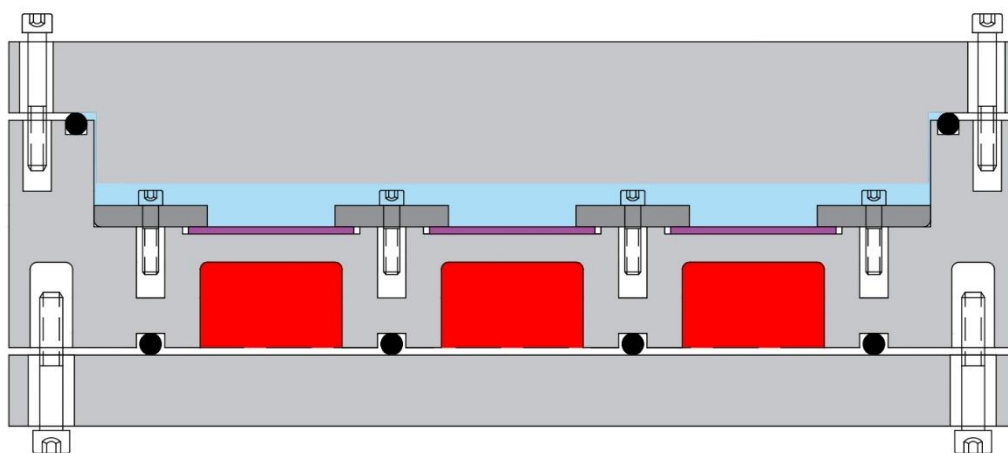
Het drinkwater wordt, voordat het in de flowcellen komt, in een apart circuit op de juiste temperatuur gebracht. Hiervoor wordt proceswater in een waterbad (blauw waterbad in Figuur 6) op de juiste temperatuur gebracht (10°C of 30°C). Dit proceswater van 10°C of 30°C stroomt naar een kleine warmtewisselaar 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 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 6) 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.

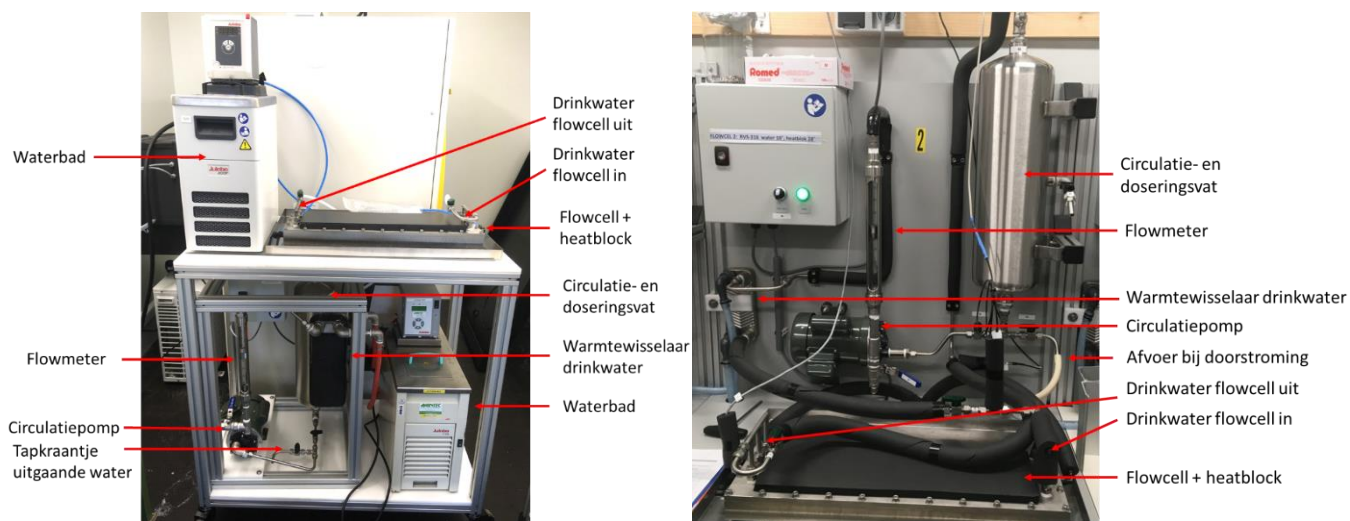


Figuur 6. Schematisch overzicht van de opstelling voor één flowcel (blauw-rode rechthoek) met waterbad om het drinkwater op 10°C of 30°C te brengen (blauw waterbad) en een waterbad om het heatblock op de juiste temperatuur (17°C, 23°C, 30°C) te brengen (rood waterbad). Dit is het overzicht voor plaatsing in de ZOB-container bij PWN. Bij plaatsing in de proefhal van KWR is het drinkwater afkomstig van tappunt en niet direct uit een (transport)leiding.

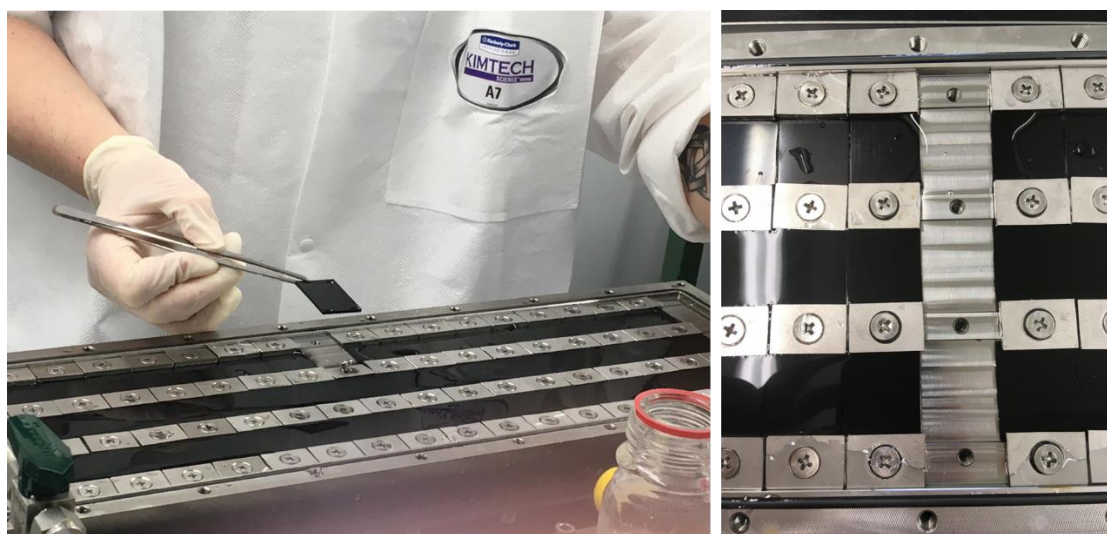
In de flowcel stroomt het drinkwater in een dunne laag van 2-5 mm (blauw in Figuur 7) over de plaatjes (paars in Figuur 7) met een flow van 0,19 m/s. Deze stroomsnelheid is gelijk aan snelheden die in full-scale warmtewisselaars wordt toegepast. Bij deze snelheid is er sprake van een turbulente waterstroom waardoor warmteoverdracht optimaal is. De plaatjes worden op hun plek gehouden door klemmetjes met schroeven (RVS-316; Figuur 7, Figuur 9).



Figuur 7. 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 8. Opzet flowcel bij KWR (links) en in de ZOB-container van PWN (rechts). Aangegeven is waar de verschillende onderdelen zitten. De waterbaden, om het inkomende drinkwater en het heatblock af te koelen of te verwarmen, staan niet op de foto van de container. In Figuur 6 is een schematische weergave gegeven van de flowcel met waterbaden zoals ze op deze foto zichtbaar zijn.



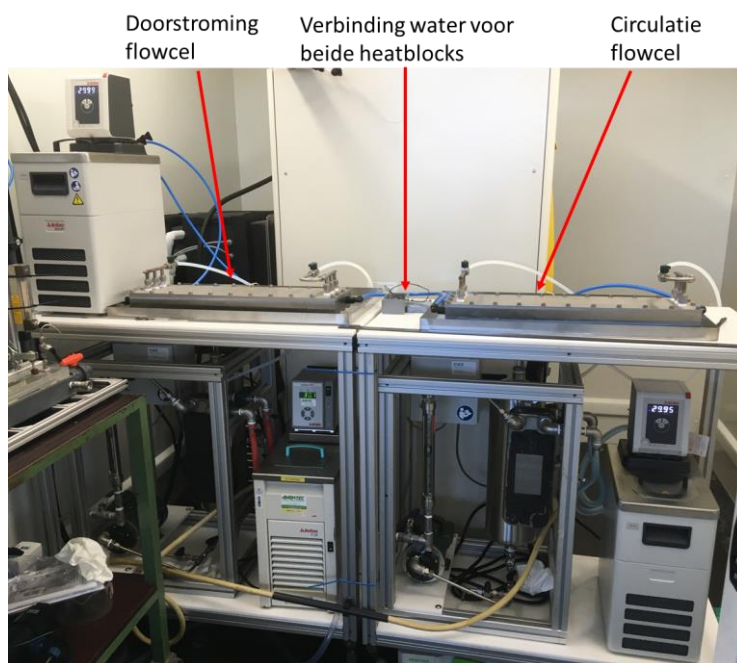
Figuur 9. Binnenkant van een flowcel met daarin EPDM-plaatjes. In de rechterfiguur is één rij plaatjes verwijderd voor monsternamen. Links vindt de monsternamen plaats.

4.2.2 Verschillen flowcellen tussen KWR- en PWN-experiment

Er waren enkele verschillen tussen de opzet van de flowcellen in het KWR-experiment vergeleken met het PWN-experiment. Ten eerste zijn de flowcellen bij KWR gevoed met drinkwater van productielocatie Tull en 't Waal, terwijl bij PWN de flowcellen werden gevoed met drinkwater van productielocatie Andijk. Het drinkwater van Tull en 't Waal is biologisch stabiel dan het drinkwater van productielocatie Andijk. Daarnaast waren in het KWR-experiment nog niet alle leidingen en flowcellen geïsoleerd (Figuur 10). In

het PWN-experiment is dit wel gedaan om omgevingsinvloeden op de temperatuur zoveel mogelijk te voorkomen.

Daarnaast hebben de twee flowcellen in het KWR-experiment gedeeltelijk in serie gestaan. Het drinkwater van beide flowcellen is gescheiden van elkaar en heeft een eigen warmtewisselaar met waterbad om op 30°C te worden gebracht, maar het water om de heatblocks te verwarmen stroomde eerst door de 'circulatie-flowcel' en daarna gelijk door de 'doorstromen-flowcel' (Figuur 10). De temperatuur van de waterstromen is niet gemeten. Maar het kan wel worden verwacht dat het water voor de heatblock in het 'circulatie-flowcel' wel 30°C is, maar dat kouder water door het heatblock van de 'doorstroming-flowcel' stroomt.



Figuur 10. Twee flowcellen (links: doorstroming; rechts: circulatie) in het KWR-experiment. Via de blauwe slang tussen beide flowcellen wordt het water van het heatblock van de circulatie-flowcel doorgeleid naar de doorstroming-flowcel.

4.3 Opzet flowcellen in container ZOB

Voor de experimenten in de Zuidoostbeemster bij PWN is een al bestaande container van PWN gebruikt. De container is voor dit onderzoek aangepast en verbouwd om de installatie van de flowcellen mogelijk te maken (Figuur 11).

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 om extreme opwarming van de container in de zomer zoveel mogelijk te voorkomen. Gedurende de zomer zijn extra maatregelen getroffen om extreme opwarming van de container verder te voorkomen (o.a. meer ventilatiegaten, container geverfd met warmtewerende witte verf). De temperatuur in de container is gemonitord met een thermometer met logger waarbij is geprobeerd de temperatuur tussen de apparatuur onder 45°C te houden i.v.m. gevaar voor kortsluiting en brand. Daarnaast kon een te hoge temperatuur van de container, en daarmee mogelijk ook een te hoge temperatuur van het water dat door de flowcellen stroomde, leiden tot afdoding van de micro-organismen en daarmee het experiment ongewenst negatief beïnvloeden.



Figuur 11. ZOB-container van PWN waarin de flowcellen zijn geïnstalleerd. Rechts achterin (niet in beeld) bevindt zich de steekslans waarmee continu drinkwater uit de onderliggende transportleiding wordt bemonsterd. N.B. tijdens het maken van deze foto was de hittewerende verf nog niet aangebracht.

Als de flowcellen op doorstromen stonden ingesteld, werd het drinkwater na passage door de flowcellen geloosd op het riool. Het uitgaande water is 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 6) gesloten.

4.4 Opzet experimenten

4.4.1 Temperatuur en materiaal

KWR-experiment

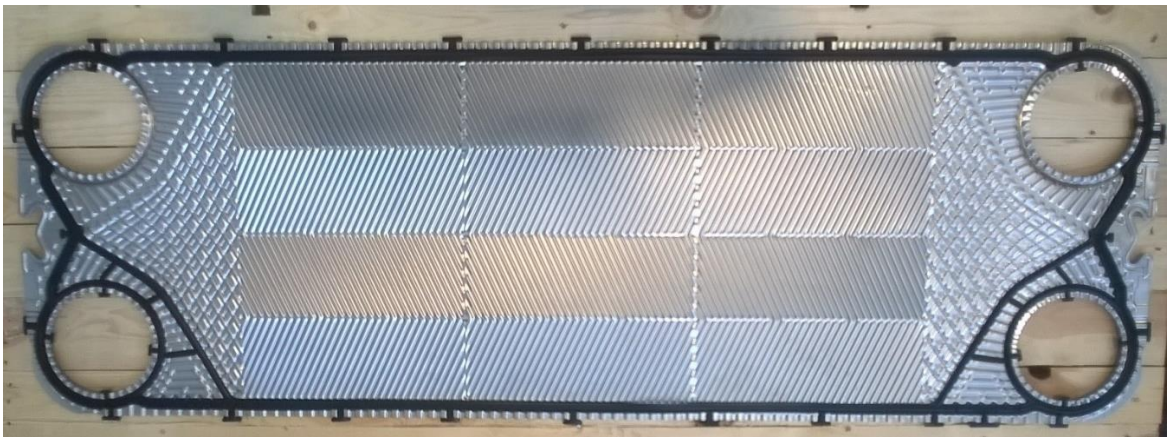
Voor het KWR-experiment (introdunctie hoofdstuk 4) zijn optimale condities gekozen waarbij de gedoseerde opportunistische pathogenen de plaatjes in de flowcellen moeten kunnen koloniseren en daar ook gaan groeien. Dit experiment is uitgevoerd als controle om na te gaan of de opzet van de flowcellen geschikt was voor het onderzoeksdoel of dat deze voorafgaand aan het PWN-experiment aangepast zou moeten worden.

De inkomende en uitgaande drinkwatertemperatuur was ingesteld op 30°C en de plaatjes zijn gemaakt van PE-materiaal (Tabel 2). Alle gedoseerde opportunistische pathogenen zijn in staat om bij 30°C te groeien [11] en van PE-materiaal is bekend dat daaruit zoveel groeibevorderende stoffen diffunderen [14, 18] wat de kans op kolonisatie door en groei van opportunistische pathogenen vergroot.

PWN-experiment

Voor het PWN-experiment zijn temperaturen en materialen gekozen die ook worden gebruikt in fullscale platenwarmtewisselaars in het drinkwaterleidingnet: RVS-316 (platen) en EPDM (pakkingen,

afsluitrubbers) (Figuur 12). 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 afsluitrubbers gemaakt van synthetisch rubber (EPDM), wat 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 [14]. Ondanks het kleine contactoppervlak van EPDM in warmtewisselaars, kan EPDM vanwege de hoge concentratie afbreekbare stoffen toch relatief veel biofilmbiomassa veroorzaken waaronder dus mogelijk ook opportunistische pathogenen.



Figuur 12. Voorbeeld van een plaat uit een full-scale warmtewisselaar. De plaat zelf is gemaakt van RVS-316, de afsluitrubbers van EPDM.

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 (Tabel 2). Door verschillende oorzaken (beschreven in Bijlage I) is het PWN-experiment niet in de winter maar in het voorjaar en de zomer uitgevoerd. Voor het onderzoek konden de watertemperaturen ingesteld worden om zo de wintertemperaturen te benaderen, maar de biologische stabiliteit van het drinkwater van productielocatie Andijk is seizoenafhankelijk [19]. Dit kon niet aangepast worden in deze opstelling.

In Tabel 2 is een overzicht gegeven van de ingestelde drinkwatertemperaturen en materialen die gebruikt zijn voor het KWR- en PWN-experiment. Flowcel 1 dient als controle en vergelijking met de 'doorstromen'-flowcel van het KWR-experiment en heeft dezelfde plaatjes (PE) en temperaturen (30°C). Er was wel verschil in de waterkwaliteit van het gebruikte drinkwater (Vitens, ps. Tull en 't Waal vs PWN, ps. Andijk), waarbij bekend is dat het drinkwater van ps. Tull en 't Waal minder voedingsstoffen voor micro-organismen bevat dan drinkwater van ps. Andijk. Het was daarom de verwachting dat in het PWN-experiment meer groei op zal treden dan in het KWR-experiment, ondanks dat de materialen en temperaturen wel gelijk waren.

Met een ingaande drinkwatertemperatuur (water dat de flowcell ingaat) van 10°C werd de drinkwatertemperatuur in de winter nagebootst. Dit betekende dat het inkomende drinkwater uit de transportleiding van PWN afgekoeld moest worden. 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

opportunistische pathogenen onder bepaalde condities gaan groeien [11], maar of dit ook gebeurt onder de condities van een warmtewisselaar is nog onduidelijk.

Tabel 2. Ingestelde temperaturen voor drinkwater en materiaal waarvan de plaatjes in de flowcel zijn gemaakt.

* De ingestelde temperatuur van het ingaande drinkwater van flowcellen 2 – 5 is niet altijd gehaald omdat het drinkwater uit de transportleiding van PWN te warm was (beschreven in § 6.2).

Experiment	Flowcel	Naam in rapport	Materiaal	Ingestelde temperatuur [°C]	
				Ingaand	Uitgaand
KWR-experiment (13-4 t/m 12-8-2021)	Circulatie	Circulatie	PE	30	30
	Doorstromen	Doorstromen	PE	30	30
PWN-experiment (10-5 t/m 29-8-2022)	1	1 (PE, 30°C)	PE	30	30
	2	2 (RVS, 23°C)	RVS-316	10*	23
	3	3 (EPDM, 23°C)	EPDM	10*	23
	4	4 (RVS, 17°C)	RVS-316	10*	17
	5	5 (EPDM, 17°C)	EPDM	10*	17

4.4.2 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 hotspot te vormen. Om hier zekerheid over te krijgen, hebben beide 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.

Uitgaand water en plaatjes in de flowcel zijn bemonsterd op dag 0 (meteen na doseren van opportunistische pathogenen) en in de weken 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 na start van het experiment.

4.4.3 Doorstroming vs. circulatie

Tijdens het KWR-experiment is in één van de flowcellen het water continu gerecirculeerd, waarbij het water wekelijks werd ververs. De andere flowcel is, na een initiële twee weken waarbij het water is gerecirculeerd, continu doorstroomd met vers drinkwater van de juiste temperatuur. In het verleden is gebleken dat continue doorstroming, in tegenstelling tot recirculatie, de kolonisatie van opportunistische pathogenen in de biofilm bemoeilijkt [11, 12]. Door de flowcellen met continue recirculatie te vergelijken met de flowcellen waar na twee weken de recirculatie is omgezet naar continue doorstroming kon worden achterhaald of groei van opportunistische ziekteverwekkers in de flowcellen kan worden bereikt met recirculatie, met continue doorstroming of met allebei. Recirculatie is nodig om de gedoseerde opportunistische pathogenen de tijd te geven om zich aan de biofilm te hechten. Het onderzoek richt zich op groei van opportunistische pathogenen en niet op de hechting van deze organismen, vandaar dat deze recirculatie geen invloed heeft op de uitkomsten van het onderzoek (bijv. door ander gedrag van opportunistische pathogenen bij recirculatie in vergelijking met doorstroming).

In het geval van continue doorstroming zijn de flowcellen wel eerst twee weken op recirculatie gezet. Door de hoge gedoseerde concentratie opportunistische pathogenen in het drinkwater en de langere contacttijd met de biofilm zorgt deze recirculatie ervoor dat de opportunistische pathogenen tijd hebben om zich aan de biofilm te hechten zodat ze niet gelijk uit het systeem worden geflusht. Na deze twee weken zijn de flowcellen op doorstroming gezet zodat vers drinkwater wordt aangevoerd en de praktijk in het bedrijven van een full-scale warmtewisselaar wordt benaderd. In het PWN-experiment is het omschakelen van recirculatie naar doorstroming uitgevoerd na metingen in de biofilm om te bepalen of

de opportunistische pathogenen aanwezig waren. Door deze metingen uit te voeren, zijn de flowcellen in totaal 3 weken na dosering van de opportunistische pathogenen omgeschakeld.

Het drinkwater in de 'recirculatie'-flowcel van het KWR-experiment is na de eerste twee weken wekelijks ververs met nieuw drinkwater waarna dit drinkwater een week over de flowcel heeft gerecirculeerd.

Tijdens recirculatie zijn de temperaturen van het inkomende en uitgaande drinkwater gelijk gesteld, op 30°C (flowcell 1), 23°C (flowcell 2 en 3), 17°C (flowcell 4 en 5). Er was dus geen temperatuurverschil tussen het inkomende en uitgaande drinkwater, zoals wel bij doorstroming het geval was.

4.4.4 Biofilmopbouw in een warmtewisselaar

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

1. Nieuwe warmtewisselaar zonder aanwezige biofilm;
2. Biofilm wordt gevormd tijdens de eerste weken/maanden waarin de warmtewisselaar gebruikt wordt, dat resulteert in een toenemende biofilmconcentratie.
3. 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 (eind fase 2 en fase 3) en daarin groeien, terwijl anderen in staat zijn om oppervlakken zonder biofilm te koloniseren (fase 1 en begin 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 (eind fase 2 en fase 3).

In de KWR- en PWN-experimenten zijn de testen uitgevoerd met een al bestaande biofilm. Daarnaast is in het PWN-experiment tegelijkertijd een korte test uitgevoerd met plaatjes zonder biofilm om zo mogelijke vervollexperimenten (in een vervolgproject), die zich richten op pathogenen die nieuwe materialen kunnen koloniseren, beter in te richten.

4.5 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 3.

Tabel 3. Opportunistische ziekteverwekkers gebruikt in de studie.

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

4.5.1 Opkweken

P. aeruginosa en *A. fumigatus* zijn opgekweekt in entflessen conform werkinstructie W-009-B. De concentratie van de entflessen is bepaald met kweek (zie § 4.7.3). *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 LMB-071 met SYBRgreen en PI kleurstoffen.

Op basis hiervan is de juiste concentratie voor het aanenten van de flowcellen bepaald (§ 4.5.2).

4.5.2 Aanenten

Elk opportunistisch pathogeen is toegevoegd aan het recirculatievat met verschillende eindconcentraties per 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.

KWR-experiment

Een doseersuspensie van 50 ml met daarin 100 kve/ml per opportunistisch pathogeen is toegevoegd aan 5 liter drinkwater in het recirculatievat. Dit gaf een uiteindelijke concentratie van ongeveer 2×10^3 kve/l in de flowcel.

PWN-experiment

Tijdens het PWN-experiment zijn de opportunistische pathogenen drie keer aangeënt (zie Tabel 9 in Bijlage I):

1). 1 maart 2022

Een doseersuspensie van 50 ml met daarin 100 kve/ml per opportunistisch pathogeen is toegevoegd aan 5 liter drinkwater in het recirculatievat. Dit gaf een uiteindelijke concentratie van ongeveer 2×10^3 kve/l per opportunistisch pathogeen in de flowcel.

2). 23 maart 2022

Een doseersuspensie van 50 ml met daarin 1000 kve/ml per opportunistisch pathogeen is toegevoegd aan 5 liter drinkwater in het recirculatievat. Dit gaf een uiteindelijke concentratie van ongeveer 2×10^4 kve/l per opportunistisch pathogeen in de flowcel.

3). 10 mei 2022

Een doseersuspensie van 50 ml met daarin 1000 kve/ml per opportunistisch pathogeen is toegevoegd aan 5 liter drinkwater in het recirculatievat. Dit gaf een uiteindelijke concentratie van ongeveer 2×10^4 kve/l per opportunistisch pathogeen in de flowcel.

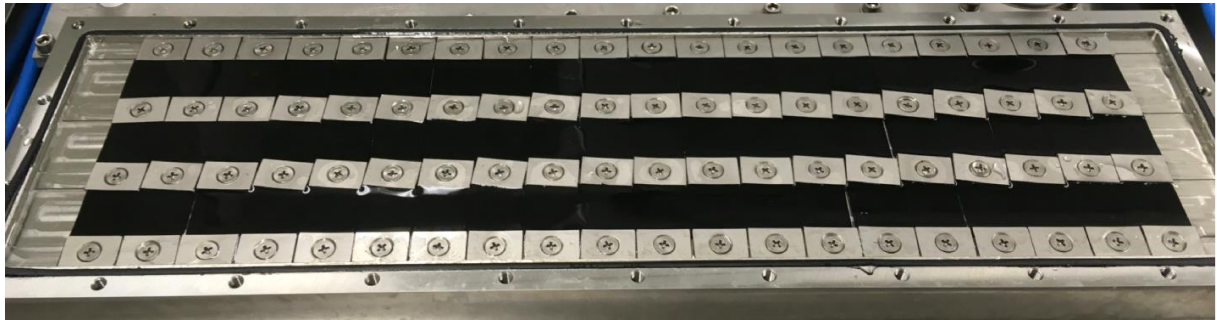
4.6 Monstername

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.

Elke flowcel bevat 20 rijen met elk drie plaatjes (Figuur 13). In Figuur 13 (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 9). De plaatjes zijn direct in steriele potjes met steriel drinkwater gedaan en koud vervoerd naar KWR. Bij KWR zijn de plaatjes verder behandeld en de betreffende analyses uitgevoerd. De plaatjes die uit de flowcel zijn gehaald zijn vervangen door nieuwe, schone plaatjes van hetzelfde materiaal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	reserve	reserve	wk 16	wk 12	wk 8	wk 6	wk 4	Dag 15	Dag 7	Dag 0	reserve	reserve	wk 16	wk 12	wk 8	wk 6	wk 4	Dag 15	Dag 7	Dag 0
B	reserve	reserve	wk 16	wk 12	wk 8	wk 6	wk 4	Dag 15	Dag 7	Dag 0	reserve	reserve	wk 16	wk 12	wk 8	wk 6	wk 4	Dag 15	Dag 7	Dag 0
C	reserve	reserve	wk 16	wk 12	wk 8	wk 6	wk 4	Dag 15	Dag 7	Dag 0	reserve	reserve	wk 16	wk 12	wk 8	wk 6	wk 4	Dag 15	Dag 7	Dag 0



Figuur 13. 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.

4.7 Laboratoriumanalyses

4.7.1 Biofilmbemonstering

De biofilm is van de plaatjes losgetrild met hoge energie sonificatie (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.

4.7.2 ATP

De ATP-concentratie van de biofilm op de PVC-P materiaalstukjes werd bepaald volgens NEN-EN 16421-2015.

4.7.3 Kweekmethoden

L. pneumophila en *L. anisa*

Het aantal *L. pneumophila* en *L. anisa* bacteriën werd bepaald conform NEN-EN-ISO 11731, volgens huisvoorschrift 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 LMB-050 bevestigd met PCR specifiek voor *L. anisa* en *L. pneumophila*.

P. aeruginosa

Het aantal kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* werd bepaald volgens 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.

4.7.4 DNA-isolatie en qPCR

DNA-isolatie

Het DNA is geïsoleerd met de PowerBiofilm™ kit volgens 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 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 en de qPCR voor *A. fumigatus* amplificeert specifiek het 28S rRNA gen. Details over de qPCR-methoden zijn eerder in meer detail beschreven [20, 21].

4.8 Statistische analyse

Per monsternamen zijn twee rijen bemonsterd. Van deze zijn apart van elkaar de hierboven beschreven analyses ingezet. Om na te gaan of de resultaten van de twee rijen niet verschillend van elkaar zijn, en dus gemiddeld kunnen worden voor verdere interpretatie van de data, zijn statistische analyses uitgevoerd. Eerst is met de Shapiro-Wilk test in het softwareprogramma R getest of de resultaten van de rijen normaal verdeeld zijn. Hiervoor zijn de datapunten per analysemethode (ATP, kweek *P. aeruginosa*, qPCR *P. aeruginosa*, etc) getest voor normaliteit. Tabel 4 geeft de resultaten van de Shapiro-Wilk test voor normaliteit per analysemethoden voor de vijf flowcellen van het PWN-experiment. De resultaten van de afzonderlijke flowcellen zijn niet getest voor normaliteit vanwege het lage aantal datapunten.

Omdat slechts één van de datasets normaal verdeeld is (*A. fumigatus* na Log₁₀-transformatie) is de non-parametrische Wilcoxon-Rank test (Wilcoxon Rank Sum test) gebruikt om statistisch te testen of per analysemethode de rijen van elkaar verschillen. Deze test is uitgevoerd via de website <http://www.sthda.com/english/rsthd/paired-wilcoxon.php>. De resultaten staan gegeven in Tabel 4. Hieruit blijkt dat van slechts enkele datasets (rood in Tabel 4) de resultaten van de twee rijen die per monsternamen geanalyseerd zijn significant van elkaar verschillen. Van deze datasets worden in het verdere rapport de resultaten van de afzonderlijke rijen (in de bijlage) en het gemiddelde met het SD (in het rapport zelf) van de rijen gegeven. Van de datasets waarvan de twee rijen per monsternamen niet significant verschillen wordt in grafieken het gemiddelde met SD gegeven.

Tabel 4. Resultaat van de statistische testen voor normale verdeling (Shapiro-Wilk) en significante verschillen tussen de rijen (Wilcoxon Rank Sum Test). Rood: p-waarde < 0,05.

		Normale verdeling		Wilcoxon test
		Normaal	Log10	Normaal
ATP	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			p>0,05
	FC3			p>0,05
	FC4			p>0,05
	FC5			p>0,05
	FC1-5	p<0,05	p>0,05	p>0,05
M. kansasii (qPCR)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			p>0,05
	FC3			p>0,05
	FC4			p>0,05
	FC5			p>0,05
	FC1-5	p<0,05	p<0,05	p>0,05
P. aeruginosa (qPCR)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			Niet berekend, te veel onder detectielimiet
	FC3			
	FC4			
	FC5			
	FC1-5	p<0,05	p>0,05	p>0,05
A. fumigatus (qPCR)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			p>0,05
	FC3			p>0,05
	FC4			p<0,05
	FC5			p>0,05
	FC1-5	p<0,05	p>0,05	p>0,05
L. anisa (qPCR)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			Niet berekend, te veel onder detectielimiet
	FC3			
	FC4			
	FC5			
	FC1-5	p<0,05	p<0,05	p>0,05
L. pneumophila (qPCR)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			p>0,05
	FC3			p>0,05
	FC4			Niet berekend, te veel onder detectielimiet
	FC5			
	FC1-5	p<0,05	p<0,05	p>0,05
L. pneumophila + L. anisa (culture)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			Niet berekend, te veel onder detectielimiet
	FC3			
	FC4			
	FC5			
	FC1-5	p<0,05	p<0,05	p>0,05
A. fumigatus (kweek)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			p>0,05
	FC3			Niet berekend, te veel onder detectielimiet
	FC4			
	FC5			
	FC1-5	p<0,05	p<0,05	p>0,05
P. aeruginosa (kweek)	FC1	Niet berekend, te weinig datapunten		p>0,05
	FC2			Niet berekend, te veel onder detectielimiet
	FC3			
	FC4			
	FC5			
	FC1-5	p<0,05	p<0,05	p>0,05

5 Resultaten KWR-experiment

5.1 Biofilmvorming

Gedurende de 16 weken van het KWR-experiment werd een biofilm op de PE-plaatjes gevormd. De biomassa van de biofilm (gemeten met ATP) nam vooral in de eerste 7-14 dagen toe tot ongeveer $800 - 1000 \text{ pg/cm}^2$ en daalde daarna naar 400 pg/cm^2 (circulatie) en ongeveer 600 pg/cm^2 (doorstroming) (Tabel 13 en Figuur 14). Dit was iets lager dan gemiddelden voor biofilm op de leidingen in het distributienet ($870 \pm 190 \text{ pg ATP/cm}^2$; [22]). De ATP-concentratie in het water dat door de flowcellen heen stroomde, $36 - 340 \text{ ng/l}$ (doorstroming) en $33 - 440 \text{ ng/l}$ (circulatie) (Tabel 11 en Figuur 14), was beduidend hoger dan normale ATP-concentraties voor drinkwater geproduceerd uit grondwater ($4-10 \text{ ng/l}$; [23]).

De hoge ATP-concentratie in het water bij circulatie was verwacht omdat allerlei micro-organismen zich in het water kunnen vermeerderen tot hoge aantallen en zo tot een hoge ATP-concentratie leidde. Dit was het geval voor de 'circulatie'-flowcel en de eerste twee weken van de 'doorstroming'-flowcel, in beide gevallen werd het water gecirculeerd. Echter, als de 'doorstroming'-flowcel continu met drinkwater werd doorstroomd, was de ATP-concentratie in het water nog steeds hoog. De ATP-concentratie start op $44-74 \text{ ng/l}$ en stijgt t/m dag 42 naar $310-340 \text{ ng/l}$, waarna het ATP-gehalte weer zakt tot $33-83 \text{ ng/l}$. De hoge startconcentratie laat zien dat het water in de proefhal van KWR al verhoogd is ten op zichte van de normale niveaus van $4-10 \text{ ng/l}$. Daarna daalt het ATP-gehalte weer, wat laat zien dat de flowcellen weinig invloed hebben op de ATP-concentratie van het water.

5.2 Opportunistische pathogenen

L. pneumophila

Kweekbare *L. pneumophila* groeide vooral tussen dag 0 en 14 in de biofilm van de circulatie-flowcel tot $2,7 \times 10^4 \text{ kve/cm}^2$ waarna de aantallen stabiel bleven rond $0,78 - 2,0 \times 10^4 \text{ kve/l}$ (Figuur 14 en Tabel 13). In het water namen de kweekbare *L. pneumophila*-aantallen toe tot $5,1 \times 10^6 \text{ kve/l}$ tussen dag 0 en 28 (Tabel 11 en Figuur 14). In de doorstroming-flowcel konden kweekbare *L. pneumophila*-bacteriën zich niet in de biofilm vestigen, alle keren waren de aantallen onder de detectielimiet (Figuur 14 en Tabel 13). In het water daalden de *L. pneumophila*-aantallen vanaf de ent op dag 0 totdat deze op dag 28 onder de detectielimiet waren (Tabel 11 en Figuur 14).

Met de qPCR-methode was ongeveer hetzelfde beeld zichtbaar: toename van het aantal genkopieën van *L. pneumophila* in de circulatie-flowcel in de eerste 14 – 28 dagen tot $8,1 \times 10^4 \text{ gk/cm}^2$ in de biofilm (Tabel 14 en Figuur 14) en $3,5 \times 10^7 \text{ gk/l}$ in het water (Tabel 12 en Figuur 14). Daarna bleef de concentratie min of meer stabiel. Het aantal genkopieën was echter hoger dan het aantal kolonievormende eenheden, maar dat wordt veroorzaakt doordat één *L. pneumophila* cel meerdere genkopieën kan bevatten [24]. In de doorstroming-flowcel werd *L. pneumophila* met de qPCR op één keer na op alle meetmomenten in het water aangetroffen ($<2200 - 3,3 \times 10^5 \text{ gk/l}$, Tabel 12 en Figuur 14). In de biofilm werd *L. pneumophila* slechts enkele keren aangetroffen in de biofilm en op een laag niveau ($<8.7 - 40 \text{ gk/cm}^2$; Tabel 14 en Figuur 14). Dit werd vermoedelijk veroorzaakt door de aanwezigheid van voornamelijk dode, of niet-kweekbare, *L. pneumophila*-bacteriën die aan de biofilm plakken en niet of nauwelijks groeiden. Daarnaast is de detectielimiet van de kweekmethode lager dan die van de qPCR-methode, waardoor met kweek lagere aantallen *L. pneumophila* aangetoond kunnen worden dan met qPCR.

Deze resultaten laten zien dat *L. pneumophila* zich kon vestigen in de circulatie-flowcel op PE-plaatjes bij 30°C, maar zich niet of nauwelijks kon vestigen in de doorstroming-flowcel onder dezelfde condities.

L. anisa

Kweekbare *L. anisa* groeide alleen in de doorstroming-flowcel, tussen dag 0 en 28 steeg het aantal kweekbare *L. anisa* tot $6,5 \times 10^4$ kve/cm² in de biofilm (Tabel 13 en Figuur 14) en $2,3 \times 10^6$ kve/l in het water (Tabel 11 en Figuur 14). Hierna daalde het aantal langzaam gedurende de rest van het experiment. In de circulatie-flowcel zijn geen kweekbare *L. anisa* aangetroffen (Tabel 11, Tabel 13 en Figuur 14). Met de qPCR-methode was min of meer hetzelfde beeld zichtbaar: *L. anisa* nam in de doorstroming-flowcel toe in de eerste 28 dagen tot $5,0 \times 10^8$ gk/l in het water (Tabel 12 en Figuur 14) en $6,5 \times 10^5$ gk/cm² in de biofilm (Tabel 14 en Figuur 14), waarna de concentratie langzaam daalde. In de circulatie-flowcel werd *L. anisa* nagenoeg wel elke keer in het water aangetroffen ($19,7 \times 10^2 - 8,8 \times 10^5$ gk/l; Tabel 12 en Figuur 14) al was de concentratie veel lager dan in de doorstroming-flowcel. In de biofilm van de circulatie-flowcel werd *L. anisa* slechts enkele keren aangetroffen, en altijd op een laag niveau ($< 11 - 1,2 \times 10^3$ gk/cm²; Tabel 14 en Figuur 14).

Deze resultaten laten zien dat *L. anisa* zich kon vestigen en vermeerderen in de doorstroming-flowcel op PE-plaatjes bij 30°C, maar dat het zich niet of nauwelijks kon vestigen in de circulatie-flowcel onder dezelfde condities. Dit was tegengesteld aan *L. pneumophila* die wel groeide in de circulatie-flowcel maar niet in de doorstroming-flowcel. Uit literatuur is bekend dat bij 30°C zowel *L. anisa* als *L. pneumophila* kunnen groeien en ze elkaar niet weg zouden moeten competieren [9, 10]. Bij hogere temperaturen was dit in genoemde referentie namelijk wel het geval.

A. fumigatus

Kweekbare *A. fumigatus* konden zich niet handhaven in de doorstroming-flowcel, zowel in het water als de biofilm daalden de aantallen na doseren snel tot onder de detectielimiet (Tabel 11, Tabel 13 en Figuur 14). In de circulatie-flowcel was *A. fumigatus* wel op een laag niveau aanwezig in de biofilm ($0,1 - 2,8 \times 10^1$ kve/cm²; Tabel 13 en Figuur 14), terwijl in het water de aantallen snel daalde maar wel nog werd aangetroffen ($6,0 \times 10^1 - 4,0 \times 10^4$ kve/l; Tabel 11 en Figuur 14). Met qPCR was in het water van beide flowcellen het beeld hetzelfde: de concentratie daalde vanaf het aanenten op dag 0, met uitzondering van dag 112 in de circulatie-flowcel waarin de concentratie hoger was (Tabel 12 en Figuur 14). In de biofilm was *A. fumigatus* continu op een laag niveau aanwezig wat wel langzaam daalde gedurende de 16 weken van het experiment (circulatie-flowcel: $2,3 - 7,6 \times 10^3$ gk/cm²; doorstroming-flowcel: $0,05 - 1,3 \times 10^4$ gk/cm²; Tabel 14 en Figuur 14). *A. fumigatus* bleef echter gedurende de meetperiode detecteerbaar.

De resultaten laten zien dat *A. fumigatus* zich kon vestigen in beide flowcellen, maar dit was op een laag niveau waarbij niet of nauwelijks groei leek plaats te vinden. Mogelijk was er beperkte groei in de circulatie-flowcel omdat het aantal kweekbare *A. fumigatus* lang min of meer constant bleef, en was de mate van groei gelijk aan de mate van afsterving.

P. aeruginosa

Kweekbare *P. aeruginosa* zijn in beide flowcellen slechts één keer in de biofilm ($5,2 - 5,7 \times 10^2$ kve/cm² op dag 6; Tabel 13 en Figuur 14) aangetroffen. DNA van *P. aeruginosa* is op dag 0 en 6 in de biofilm ($1,3 - 4,1 \times 10^1$ gk/cm²; Tabel 14 en Figuur 14) van beide flowcellen aangetroffen; en op dag 0 – 15 (circulatie: $0,016 - 1,9 \times 10^5$ gk/l) of dag 0 – 28 (doorstroming: $0,018 - 1,2 \times 10^5$ gk/l) in het water (Tabel 12 en Figuur 14).

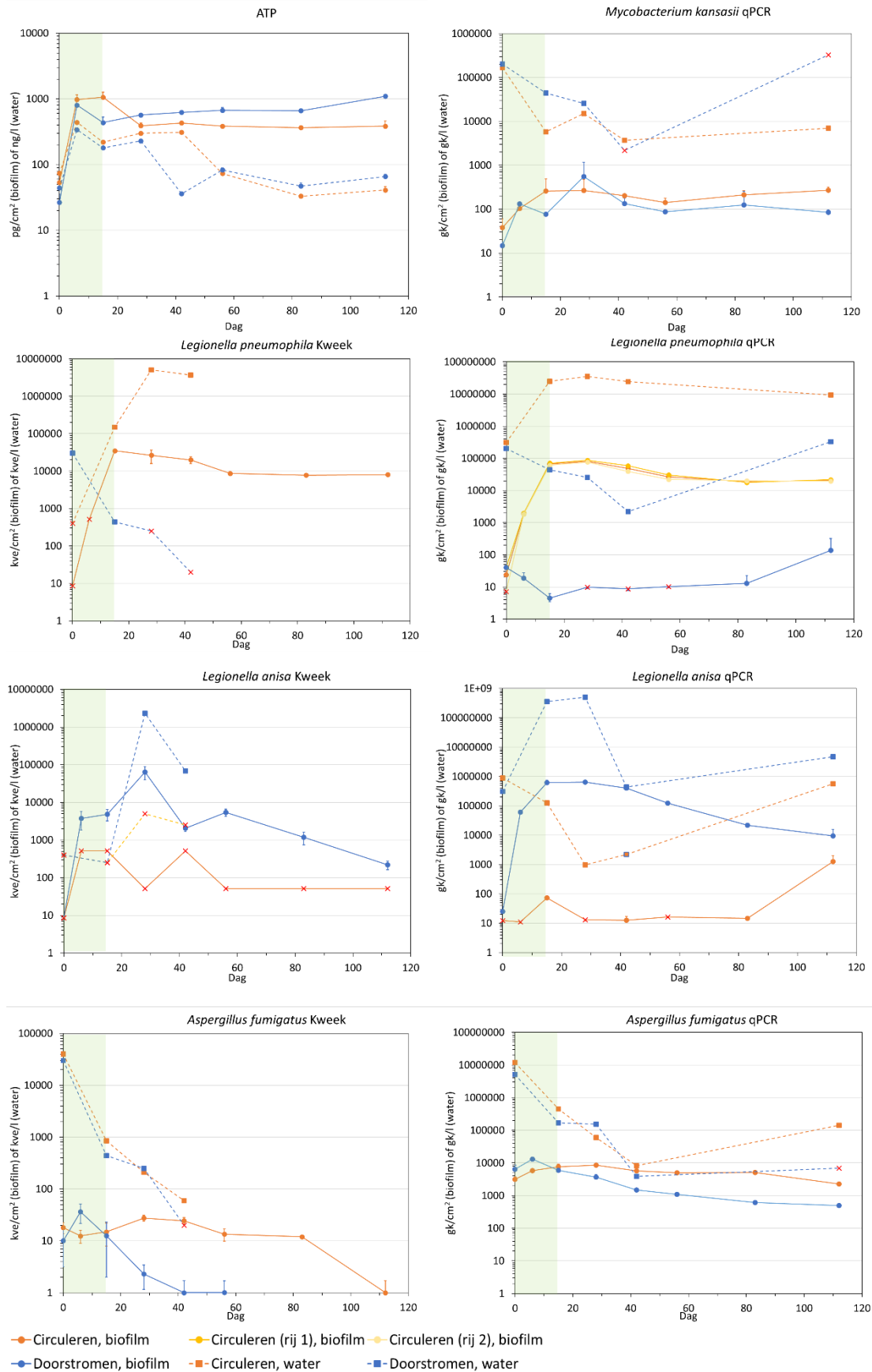
Dit laat zien dat *P. aeruginosa* zich niet kon vestigen en handhaven in beide flowcellen in aanwezigheid van een al bestaande biofilm. Van *P. aeruginosa* was inderdaad bekend dat deze bacterie voornamelijk

nieuwe, zich vormende, biofilms koloniseert en daarin groeit. Bij een volwassenere biofilm verliest *P. aeruginosa* de concurrentie van de andere aanwezige micro-organismen [25, 26].

M. kansasii

Van *M. kansasii* is geen kweekmethode beschikbaar bij KWR, maar alleen de qPCR-methode. *M. kansasii* kon zich in de biofilm vestigen en vermeerderen tot $2,7 \times 10^2$ gk/cm² (circulatie) en $5,6 \times 10^2$ gk/cm² (doorstroming) in de eerste 14 – 28 dagen (Tabel 14 en Figuur 14). Daarna bleef de concentratie in de biofilm stabiel waarbij er nauwelijks verschil was tussen beide flowcellen. De concentratie in het water daalde vanaf het enten op dag 0 tot dag 42 waarna deze stabiel bleef rond $0,4 - 1 \times 10^4$ gk/l (circulatie-flowcel) of zakte onder de detectielimiet (doorstroming-flowcel; Tabel 12 en Figuur 14).

Dit laat zien dat *M. kansasii* zich kon vestigen en vermeerderen in de biofilm van beide flowcellen, waarbij er nauwelijks verschil was tussen circulatie of doorstroming.



Figuur 14. Resultaten van het 'KWR-experiment' met twee flowcellen (doorstroming en circuleren). Als de twee rijen niet significant van elkaar verschillen, is het gemiddelde met SD gegeven van twee rijen met plaatjes. Met het groene vlak is

aangegeven wanneer de 'doorstroming'-flowcel nog op circulatie stond om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten. De 'circulatie'-flowcel stond gedurende het hele experiment op circuleren waarbij het water wekelijks is ververs. Absolute getallen zijn gegeven in Tabel 11 - Tabel 14.

6 Resultaten PWN-experiment

6.1 Opstart en afbreken van experimenten

Het experiment met de flowcellen bij PWN is in eerste instantie meerdere keren gestart en om diverse redenen gestopt. Dit staat uitgebreid beschreven in Bijlage I.

Hieronder is een korte samenvatting gegeven van de belangrijkste punten:

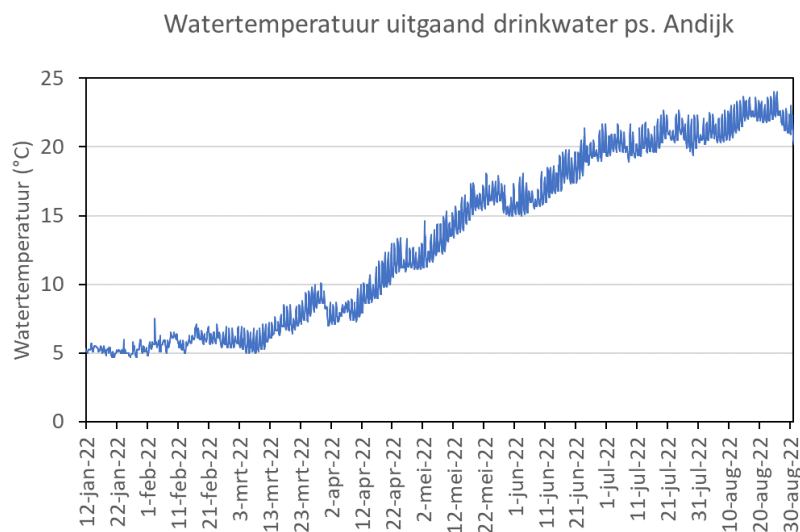
- 23 november 2021: flowcellen aangezet, start van biofilmvorming op de plaatjes;
- 11 januari 2022: nieuwe plaatjes in de flowcellen en nieuwe start opbouwen biofilm;
- 1 maart 2022: geënt met opportunistische pathogenen;
- 23 maart 2022: opnieuw geënt met opportunistische pathogenen omdat concentratie in de biofilm te laag was;
- 28 maart – 12 april 2022: stroomstoring waardoor temperatuur van drinkwater over de flowcellen niet werd gereguleerd. Na herstel stroomstoring zijn de juiste temperaturen ingesteld. De plaatjes zijn niet vervangen. Gedurende één maand is er (extra) biofilm gevormd of heeft deze de tijd gehad om zich aan te passen aan de juiste temperaturen;
- 28 april – 4 mei 2022: stroomstoring waardoor temperatuur van drinkwater over de flowcellen niet werd gereguleerd. Na herstel stroomstoring zijn de juiste temperaturen ingesteld;

Nadat op 4 mei de juiste temperaturen zijn ingesteld, zijn op 10 mei 2022 de flowcellen geënt met de opportunistische pathogenen en is het experiment daadwerkelijk van start gegaan. Op 16-17 mei 2022 was er nog wel een stroomstoring van één dag, maar besloten is om het experiment wel door te laten gaan. Na het enten op 1 en 23 maart 2022 zijn de plaatjes in de flowcel niet meer vervangen. Hierdoor waren op 10 mei 2022, bij de start van het echte experiment, in meer of mindere mate al opportunistische pathogenen aanwezig in de flowcellen en de biofilm op de plaatjes. Daarom is bij de start van het experiment op 10 mei 2022 voor het aanenten met opportunistische pathogenen de biofilm op de plaatjes bemonsterd en geanalyseerd zodat bekend was wat de startaantallen van de verschillende opportunistische ziekteverwekkers waren.

6.2 Temperaturen water en biofilm

6.2.1 Water

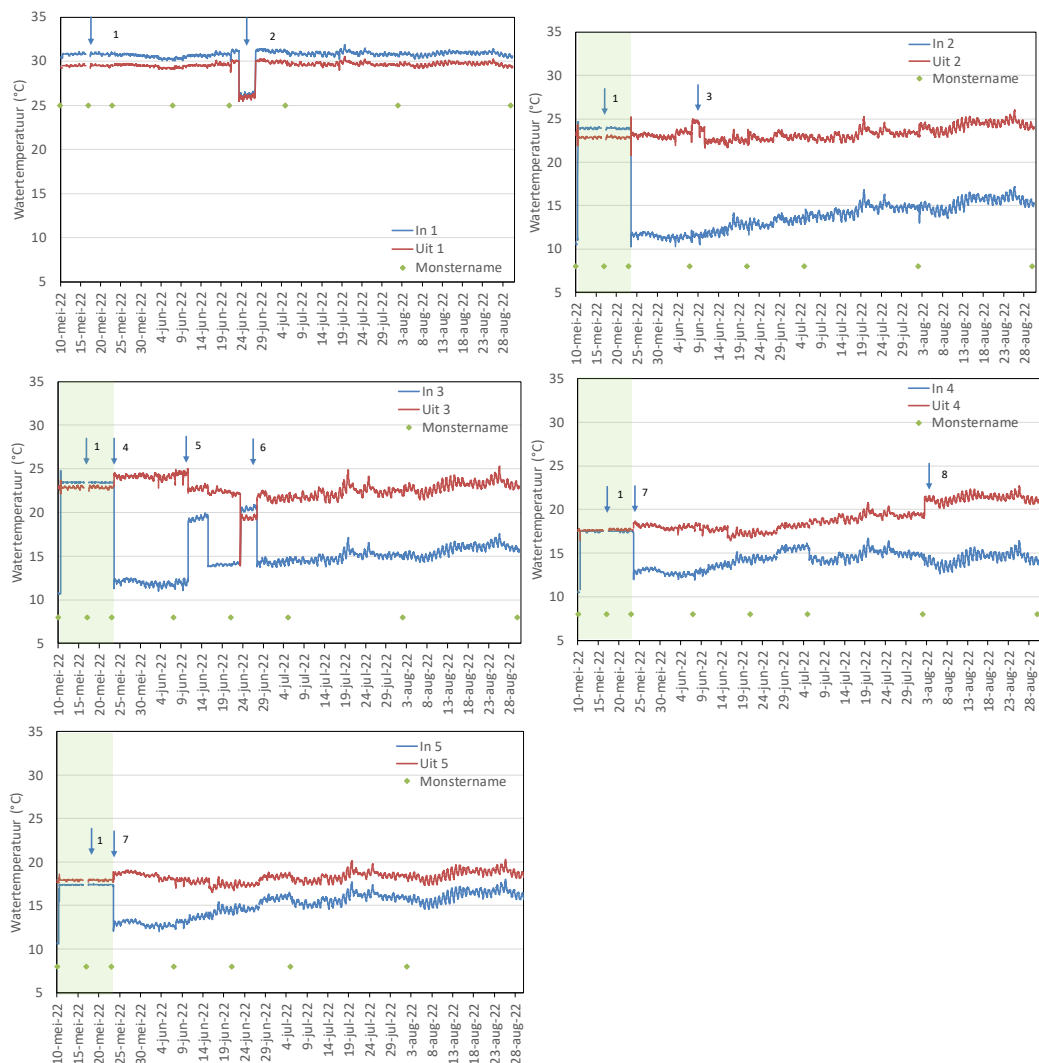
In het PWN-experiment was het drinkwater afkomstig van ps. Andijk, dat water produceert uit oppervlaktewater. Hierdoor was er sprake van een seizoeneffect op de watertemperatuur van het aangevoerde water. Bij de start van het experiment in januari 2022 was de temperatuur van het uitgaande drinkwater bij pompstation Andijk (niet de watertemperatuur bij de container, hiervan is slechts beperkt informatie beschikbaar) ongeveer 5°C, terwijl aan het einde van het experiment de temperatuur 22-23°C was (Figuur 15). Conform Tabel 2 zou het drinkwater dat de flowcellen ingaat op 10°C gesteld moeten worden. Dit betekent opwarming in januari – maart 2022, maar vanaf april 2022 afkoeling van het inkomende water.



Figuur 15. Watertemperatuur van het uitgaande drinkwater bij ps. Andijk. Informatie is afkomstig van PWN.

Van elke flowcel werd de temperatuur van het water dat de flowcel inkomt en uitgaat gelogd (Figuur 16, Tabel 5). Hieruit blijkt dat de temperatuur van het water dat vanaf ps. Andijk werd aangeleverd, een groot effect had op de watertemperatuur van het drinkwater dat de flowcellen in ging. De ingaande temperatuur van 10°C voor flowcellen 2 – 5 werd gemiddeld vanaf half mei 2022 niet meer gehaald. Dit betekent dat de ingaande temperatuur bij de proefinstallatie te hoog was voor de capaciteit van de waterbaden om het inkomende drinkwater terug te koelen naar de gewenste 10°C. De temperatuur van het ingaande drinkwater steeg vanaf dat moment langzaam naar ongeveer 15-16°C. De uitgaande watertemperatuur van 17°C en 23°C werd wel grotendeels gehaald, al liep ook die temperatuur tegen het einde van het experiment wat op naar respectievelijk 18-19°C en 24-25°C.

Door veranderingen in de temperatuur van het aangevoerde water, fluctuaties in de warmteoverdracht in de flowcellen en verschillende problemen met stroomstoringen is bijna wekelijks de temperatuur van de waterbaden die de temperatuur van het in- en uitgaande drinkwater regelen bijgesteld (Bijlage II). Dit leidde in meer of mindere mate tot fluctuaties in de watertemperatuur (Figuur 16). Veranderingen in temperatuur waarvan de oorzaak bekend is, staan aangegeven met pijltjes in Figuur 16 en beschreven in Tabel 5.



Figuur 16. Watertemperatuur van het in- en uitgaande water van de vijf flowcellen vanaf de start van het PWN-experiment op 10 mei. Moment van monstername (groene diamanten) en circulatie (lichtgroene vlakken) is aangegeven. Bij circulatie is de in- en uitgaande watertemperatuur van de flowcel gelijk gehouden. 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 5.

Tabel 5. Bekende oorzaken van vreemde fenomenen in de watertemperatuur. De nummers verwijzen naar de nummers in de grafieken van Figuur 16.

#	Periode in 2022	Oorzaak
1	18-19 mei	Stroomstoring 3 (2 dagen)
2	23-27 juni	Waterbad 4 (heatblock flowcel 3) stond deze periode mogelijk uitgeschakeld i.v.m. lekkage en te laag waterniveau in het waterbad.
3	7 en 9 juni	Bijstelling temperatuur van waterbad na monstername (7 juni) en extra bezoek (9 juni). Waterbad 3 (drinkwater flowcel 2) haalde ingestelde temperatuur niet meer omdat inkomende drinkwater te warm is (vanaf 7 juni).
4	Vanaf 23 mei	Waterbad 5 (drinkwater flowcel 3) haalde ingestelde temperatuur niet meer omdat inkomende drinkwater te warm is.
5	9-13 juni	Waterbad 5 (drinkwater flowcel 3) kapot (5 dagen)
6	23-27 juni	Waterbad 4 (heatblock flowcel 3) uitgeschakeld door lekkage (4 dagen)
7	Vanaf 23 mei	Waterbad 6 (drinkwater flowcel 4) haalde ingestelde temperatuur niet meer omdat inkomende drinkwater te warm is.

#	Periode in 2022	Oorzaak
8	Vanaf 2 augustus	Na monsternamen was de uitgaande drinkwatertemperatuur flowcel 4 verhoogd. Mogelijk is dit een onbedoelde bijstelling van waterbad 7 (heatblock flowcel 4)?

6.2.2 Biofilm

Het uitgevoerde experiment is gebaseerd geweest op een gewenste ingaande watertemperatuur van 10°C en gewenste uitgaande watertemperatuur van 17 of 23°C (Tabel 6). De temperatuur van het uitgaande water werd bepaald door de temperatuur van het heatblock (Figuur 6). Vanaf het heatblock werden de plaatjes en daarmee ook het langsstromende uitgaande water opgewarmd. Omdat de warmteoverdracht van het heatblock naar de PE-, EPDM- en RVS-plaatjes niet 100% is, maar de plaatjes een isolerende werking hebben, was de temperatuur van het heatblock ingesteld op relatief hoge temperaturen (Tabel 6, zie ook in Bijlage II vanaf 10 mei 2022) om de gewenste warmteoverdracht te realiseren bij de ingestelde volumestroom in de proefinstallatie.

Tabel 6. Temperatuur van het ingaande en uitgaande drinkwater van de flowcellen en van het heatblock waarmee de temperatuur van de plaatjes en daarmee de uitgaande drinkwatertemperatuur worden bepaald.

Experiment	Naam in rapport	Ingestelde drinkwatertemperatuur		Ingestelde temperatuur heatblock
		Ingaand	Uitgaand	
KWR-experiment (13-4 t/m 12-8-2021)	Circulatie	30	30	
	Doorstromen	30	30	
PWN-experiment (10-5 t/m 29-8-2022)	1 (PE, 30°C)	30	30	31°C
	2 (RVS, 23°C)	10*	23	52 – 60°C
	3 (EPDM, 23°C)	10*	23	48 – 64°C
	4 (RVS, 17°C)	10*	17	25 – 34°C
	5 (EPDM, 17°C)	10*	17	24 – 34°C

Een gevolg van de hoge temperaturen van de heatblocks is dat de plaatjes, en daarmee ook de biofilm op de plaatjes, veel warmer zijn geworden dan de uitgaande drinkwatertemperatuur. Oorzaak hiervan is de focus op sturing op de uitgaande temperatuur, zonder aanpassing van de volumestroom (bepaalt verblijftijd) in de flowcellen. Wat de exacte temperatuur van de biofilm is geweest, kan op basis van de beschikbare resultaten niet worden vastgesteld. Hiervoor zijn aanvullende experimenten nodig die niet in dit project zijn uitgevoerd. In ieder geval is onvoldoende gerealiseerd dat dergelijke hoge temperaturen van de heatblocks tot gevolg kan hebben dat de biofilm op de plaatjes van met name flowcellen 2 en 3 dermate hoog wordt dat dit tot afsterving van micro-organismen en de opportunistische pathogenen heeft geleid. Dit wordt hieronder verder besproken.

6.3 PWN-experiment met bestaande biofilm

6.3.1 Biofilmvorming

ATP

Voorafgaand aan het aanenten van de opportunistische pathogenen is op de plaatjes gedurende 9 weken een biofilm gevormd. Dit was terug te zien in de hoeveelheid ATP in de biofilm op dag 0, bij het aanenten met opportunistische pathogenen (de start van het experiment; Tabel 17, Figuur 17). De ATP-concentratie van de biofilm was het hoogst in de 17°C flowcellen (flowcellen 4 en 5; 250 – 25550 pg/cm²) en het laagst in de 23°C flowcellen (flowcellen 2 en 3: <5,2 – 10 pg/cm²). Gedurende de 16 weken na het aanenten met de opportunistische pathogenen werd meer biofilm op de plaatjes gevormd, waarbij de

meeste biofilm werd gevormd op EPDM (flowcellen 3 en 5) gevolgd door flowcellen 1 (PE, 30°C), 4 (RVS, 17°C) en 2 (RVS, 23°C). Daarnaast nam met name in de flowcellen 2 en 3 (RVS en EPDM 23°C) het ATP-gehalte na 16 weken nog steeds toen, er is dus nog geen stabiele biofilm gevormd. Daarnaast is de ATP-concentratie in de biofilm van flowcellen 2 en 3 (23°C) opvallend laag. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door een initiële remming of langere lagfase en dat door de hoge temperaturen de biofilm mogelijk grotendeels gevormd wordt door thermofiele micro-organismen (welke bij hoge temperaturen kunnen groeien), maar van nature in lage aantallen aanwezig zijn in drinkwater.

De ATP-concentratie in het water was in de eerste twee weken, als het water werd gecirculeerd, sterk verhoogd voor de EPDM flowcellen (flowcellen 3 en 5) maar niet voor de andere flowcellen (Tabel 15, Figuur 17). Na het omschakelen van circulatie naar doorstroming daalde de ATP-concentratie naar 2,7 – 11 ng/l ATP, wat normale waarden zijn voor drinkwater [23]. Dit laat zien dat ondanks dat in de flowcellen in meer of mindere mate een biofilm groeide, de biofilm niet in dusdanige hoeveelheden losliet en in het water terecht kwam dat dit terug te zien was in de ATP-concentraties van het water. Het water gaf daardoor geen goed beeld van het gedrag van de microbiologische parameters in de biofilm.

6.3.2 Opportunistische pathogenen

Voor geen van de opportunistische pathogenen zijn de aantallen in de eerste 14 dagen vergelijkbaar met wat verwacht zou kunnen worden op basis van de hoeveelheid opportunistische pathogenen die aan het systeem zijn gedoseerd. In nagenoeg alle flowcellen zijn de aantallen lager uitgevallen.

L. pneumophila en *L. anisa*

Kweekbare *L. pneumophila* waren alleen stabiel aanwezig in flowcel 1 (PE, 30°C), zowel in het water (<250 – 9,0x10⁴ kve/l; Tabel 15, Figuur 17) als de biofilm (0,17 – 1,4x10⁴ kve/cm²; Tabel 17, Figuur 17). Het DNA van *L. pneumophila* werd ook consequent in het water en de biofilm in flowcel 1 aangetroffen (PE, 30°C; Figuur 18, Tabel 16, Tabel 18). In het water en de biofilm van flowcellen 2 – 4 werd *L. pneumophila* DNA alleen in de eerste 14 dagen (tijdens circulatie) aangetroffen. Na die 14 dagen werd ook regelmatig lage concentraties *L. pneumophila* DNA (<21,3 – 5,7x10¹ gk/cm²) aangetroffen in de biofilm van flowcel 5 (EPDM, 17°C).

Kweekbare *L. anisa* zijn in geen enkele flowcel aangetroffen (Tabel 15, Tabel 17, Figuur 17). Het DNA van *L. anisa* werd sporadisch in het water en de biofilm van flowcel 1 (PE, 30°C), 3 (EPDM, 23°C) en 5 (EPDM, 17°C) gedetecteerd (Tabel 16, Tabel 18, Figuur 18).

Deze resultaten laten zien dat *L. pneumophila* zich kon handhaven en mogelijk ook groeien in flowcel 1 (PE, 30°C), en zich kon vestigen in flowcel 5 (EPDM, 17°C) maar niet of nauwelijks in de andere flowcellen. *L. anisa* heeft zich helemaal niet in de flowcellen kunnen vestigen.

A. fumigatus

Kweekbare *A. fumigatus* waren aanwezig in de biofilm van alle flowcellen, behalve in flowcel 3 (EPDM, 23°C) (Tabel 17, Figuur 17). In het water werd *A. fumigatus* echter slechts sporadisch aangetoond waarbij de aantallen rond de detectielimiet van 100 kve/l lagen. In flowcel 4 (RVS, 17°C) werden de hoogste aantallen *A. fumigatus* gemeten maar daalden deze langzaam in de tijd (van 23,4 naar 6,1 kve/cm²). DNA van *A. fumigatus* werd sporadisch gedetecteerd in het water van alle flowcellen (Tabel 16, Figuur 17), maar was consequent in de biofilm van alle flowcellen aanwezig (Tabel 18, Figuur 17). Alle flowcellen lieten hierin dezelfde trend zien: een stijging in de eerste 14 dagen en daarna (na omschakeling van circulatie naar doorstroming) eerst een daling van het aantal genkopieën wat daarna stabiel bleef.

A. fumigatus kon zich vestigen in de biofilm, maar vermeerdering leek vooral plaats te vinden in flowcel 4 (RVS, 17°C), aangezien hier de hoogste aantallen kweekbare *A. fumigatus* werden aangetroffen en deze slechts langzaam afnamen in de tijd. In de andere flowcellen was *A. fumigatus* niet in staat om zich te vestigen, of was alleen in zeer lage aantallen aanwezig. Vermeerdering vindt hierbij echter niet plaats.

P. aeruginosa

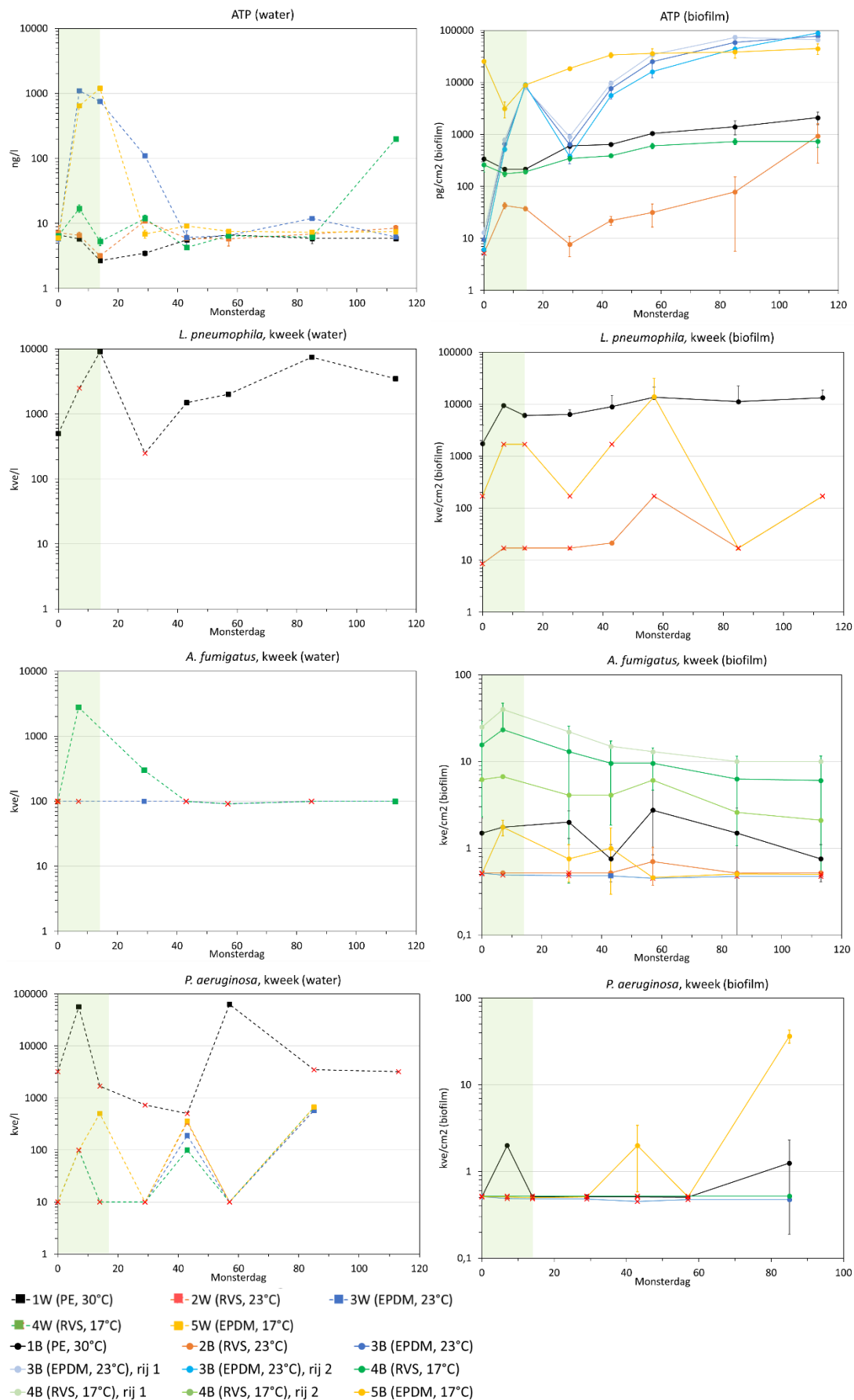
Kweekbare *P. aeruginosa* zijn sporadisch in de biofilm en het water van flowcellen 2 – 5 aangetroffen (Tabel 15, Tabel 17, Figuur 17). In flowcel 1 (PE, 30°C) werd *P. aeruginosa* iets vaker aangetroffen, maar nog steeds in lage concentraties in de biofilm ($<0.5 - 2.0$ kve/cm²) en iets variabelere concentraties in het water ($<10 - 3,2 \times 10^4$ kve/l). DNA van *P. aeruginosa* werd alleen in flowcel 1 (PE, 30°C) gedetecteerd in de eerste 29 dagen (Tabel 16, Tabel 18, Figuur 18), zowel in water ($<500 - 3,6 \times 10^5$ gk/l) als biofilm ($<7,6 - 8,9 \times 10^1$ gk/cm²).

Deze resultaten laten zien dat *P. aeruginosa* zich mogelijk wel kon vestigen in flowcel 1 (PE, 30°C), maar dat er geen vermenigvuldiging plaats vond. In de andere flowcellen kon *P. aeruginosa* zich mogelijk in hele lage aantallen vestigen, aangezien kweekbare *P. aeruginosa* sporadisch werden aangetroffen.

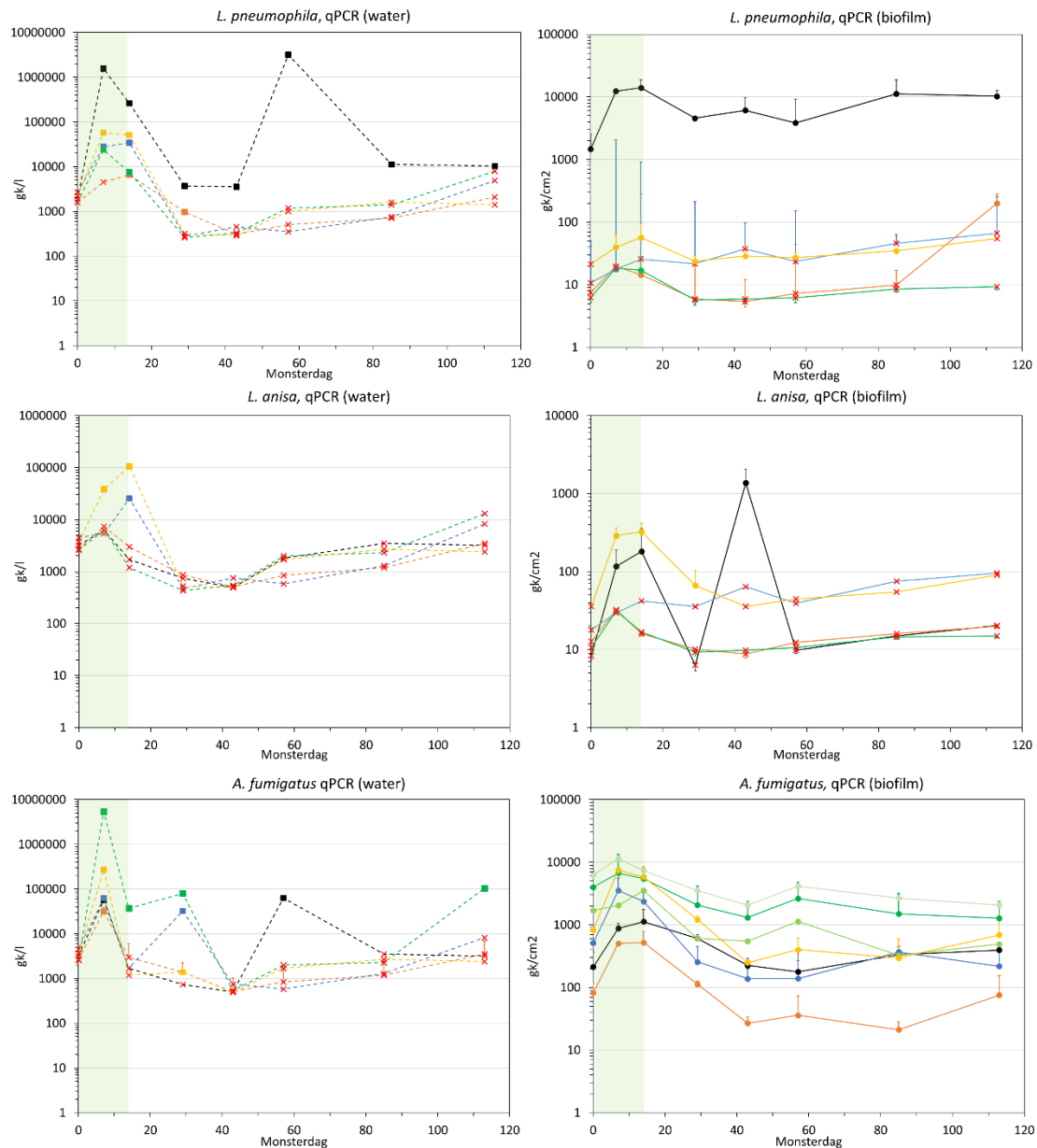
M. kansasii

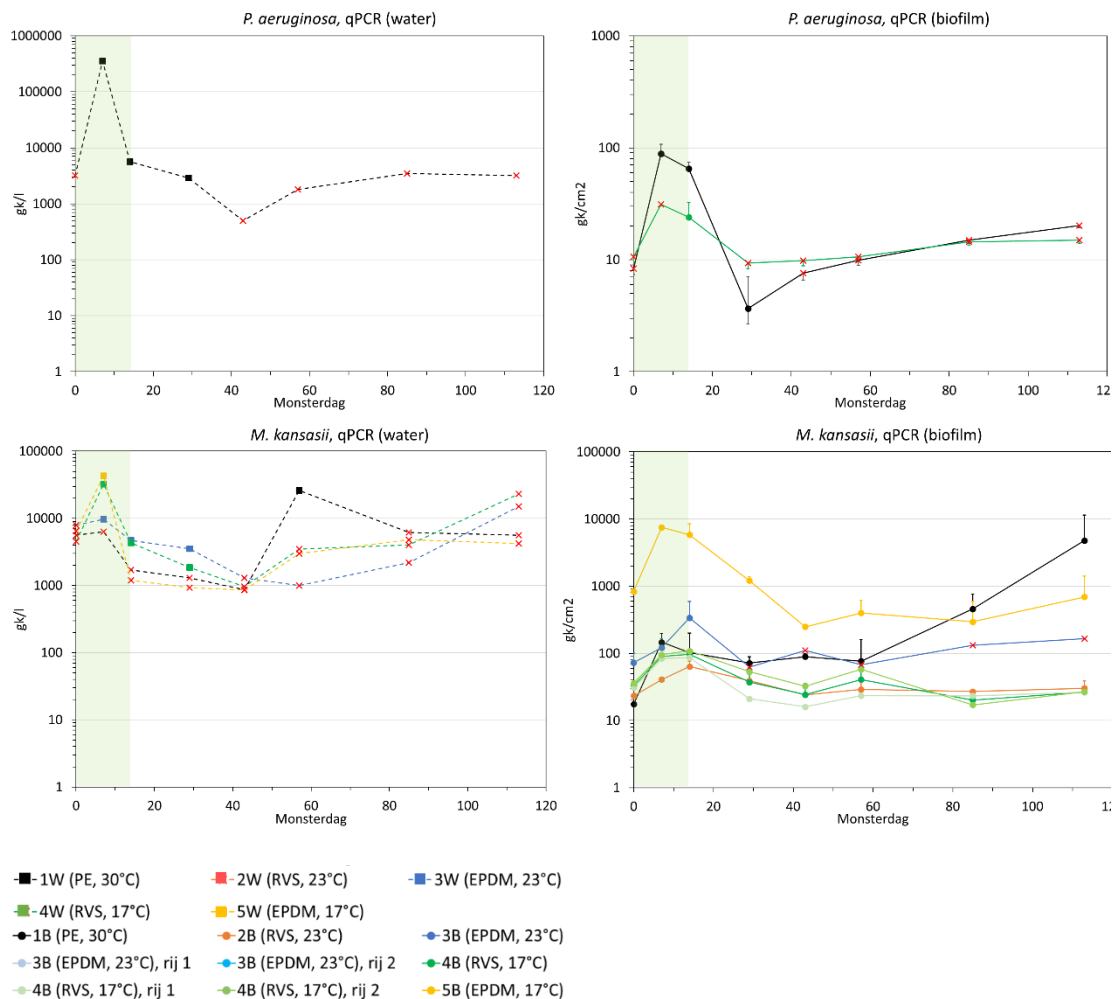
DNA van *M. kansasii* werd gevonden in de biofilm van alle flowcellen (Tabel 18, Figuur 18), maar slechts sporadisch in het water (Tabel 16, Figuur 18). Na een initiële toename in de eerste 14 dagen, daalde de concentratie in alle biofilms daarna in lichte (flowcellen 1 – 4) of in sterkere mate (flowcel 5). Daarna bleef de concentratie stabiel rond $1 \times 10^1 - 10^2$ gk/cm². Uitzondering was flowcel 1 (PE, 30°C) waar de concentratie in de biofilm na dag 57 sterkt toenam tot $4,8 \times 10^3$ gk/cm².

M. kansasii kon zich dus vestigen en vermeerderen in de biofilm in de eerste 14 dagen. Mogelijk vond ook op een laag niveau vermeerdering plaats in de biofilm van alle flowcellen. Alleen in flowcel 1 (PE, 30°C) kon *M. kansasii* zich in het tweede deel van het experiment echt vermeerderen.



Figuur 17. ATP-concentratie en aantallen opportunistische pathogenen in water en de biofilm, bepaald met de kweekmethode, van het experiment 'PWN met biofilm'. Als de resultaten van de twee bemonsterde rijen niet significant verschillen is het gemiddelde van twee rijen (N=2) met SD gegeven. Zo niet, dan is het resultaat van de afzonderlijke rijen en het gemiddelde gegeven. Absolute getallen zijn gegeven in Tabel 15 - Tabel 17, Tabel 18. 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, hierbij is de in- en uitgaande watertemperatuur van de flowcellen gelijk gehouden.





Figuur 18. Aantallen opportunistische pathogenen in de biofilm, bepaald met de qPCR, van het experiment 'PWN met biofilm'. Als de resultaten van de twee bemonsterde rijen niet significant verschillen is het gemiddelde van twee rijen (N=2) met SD gegeven. Zo niet, dan is het resultaat van de afzonderlijke rijen en het gemiddelde gegeven. Absolute getallen zijn gegeven in Tabel 16 en Tabel 18. 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, hierbij is de in- en uitgaande watertemperatuur van de flowcellen gelijk gehouden.

6.4 PWN-experiment zonder bestaande biofilm

6.4.1 Toelichting

Tegelijk met het PWN-experiment met bestaande biofilm is een kort experiment uitgevoerd waarvoor bij de start van het experiment een aantal plaatjes in de flowcel zijn vervangen door nieuwe plaatjes zonder biofilm. Zoals eerder beschreven kunnen sommige micro-organismen namelijk beter een zich vormende biofilm koloniseren en zich daarin vermenigvuldigen dan een al bestaande biofilm. Met dit korte 'tussenexperiment' is informatie verzameld om eventuele vervolgentoelichting met afwezigheid van al een bestaande biofilm beter in te richten. Hiervoor is één flowcel voorzien van enkele plaatjes zonder biofilm. Op dag 7 zijn de plaatjes met biofilm en de plaatjes zonder biofilm bemonsterd en geanalyseerd. De bemonsterde plaatjes zijn vervangen door schone plaatjes zonder biofilm, waarna het experiment vervolgd werd met biofilm. De verwachting is dat dit 'tussenexperiment' geen significante gevolgen heeft gehad voor het hoofdexperiment (mét biofilm) omdat in het algemeen de uitwisseling tussen water en

biofilm gering is. Zie ook de grafieken met ATP op biofilm en in het water; op de PE- en EPDM-plaatjes is veel ATP aanwezig, maar in het water is ATP laag en heeft een normale waarde voor Andijk-water.

De resultaten van het uitgaande water die hieronder worden besproken zijn hetzelfde als het PWN-experiment met biofilm, omdat de plaatjes met en zonder bestaande biofilm uit dezelfde flowcellen afkomstig zijn. Voor de duidelijkheid zijn de resultaten van het uitgaande water dus twee keer besproken.

6.4.2 Biofilmvorming

ATP

Bij de start van het experiment op dag 0 was de ATP-concentratie, en daarmee de actieve biomassa, in het bemonsterde water gelijk aan normale waarden voor drinkwater (4-20 ng/l, [23]). In de eerste twee weken, als alle flowcellen op circulatie stonden ingesteld, vond er sterke microbiële groei plaats in de flowcellen met EPDM (flowcellen 3 en 5) met ATP-concentraties tot 650 - 1200 ng/l in vergelijking tot 3,2 - 17 ng/l voor de flowcellen met RVS. Dit laat duidelijk zien dat EPDM stoffen bevat die vrijkomen in het water waarop de micro-organismen kunnen groeien. Nadat de flowcellen op doorstroming werden gezet daalde het ATP-gehalte weer naar normale waarden voor drinkwater. Op de EPDM-plaatjes (14000 – 68500 pg/cm²) werd veel meer biofilm gevormd dan op RVS-316 (61 – 270 pg/cm²) of PE (215 – 550 pg/cm²).

6.4.3 Opportunistische pathogenen

L. pneumophila en *L. anisa*

Kweekbare *L. pneumophila* werd alleen in flowcel 1 (PE, 30°C) aangetroffen. De concentratie varieerde weinig gedurende de 6 weken van het experiment (water: <250 – 1,5x10³ kve/l; biofilm: 3,3 – 6,6x10³ kve/cm²). *L. pneumophila* DNA werd wel in het water van alle flowcellen aangetroffen, maar alleen in de eerste vier weken en na de omschakeling van circulatie naar doorstroming niet meer. Alleen in flowcel 1 (PE, 30°C) is daarna ook nog *L. pneumophila* aangetroffen in het water. In de biofilm van flowcel 5 (EPDM, 17°C) werd *L. pneumophila* met qPCR in lage concentraties aangetroffen (<22,3 gk/cm²).

Kweekbare *L. anisa* zijn niet in de biofilm aangetroffen, en DNA van *L. anisa* is alleen in de biofilm van flowcel 1 (PE, 30°C) gevonden. In het water van de flowcellen is *L. anisa* sporadisch aangetroffen met qPCR, maar niet met de kweekmethode.

Het sporadisch voorkomen van *L. pneumophila* en *L. anisa* op plaatjes met een zich vormende biofilm komt overeen met historische kennis. *L. pneumophila* en waarschijnlijk ook *L. anisa* zijn voor vermeerdering afhankelijk van protozoa die in de biofilm leven. Zonder, of bij weinig biofilm, zijn er geen of minder protozoa aanwezig waarin *L. pneumophila* of *L. anisa* zich kan vermeerderen. Hierdoor hebben beide legionellasoorten het moeilijk om een nieuwe biofilm te koloniseren.

A. fumigatus

Kweekbare *A. fumigatus* is aangetroffen in de biofilm van flowcel 1 (PE, 30°C), 2 (RVS, 23°C) en 4 (RVS, 17°C). Alleen in flowcel 4 (RVS, 17°C) waren de aantallen verhoogd (76 – 85 kve/cm²). Met qPCR is *A. fumigatus* wel in alle flowcellen aangetroffen, waarbij met name de aantallen in flowcel 4 (RVS, 17°C) hoog waren (0,77 – 1,5x10⁴ gk/cm² vs 0,25 – 5,8x10² gk/cm² in de andere flowcellen). In het water is *A. fumigatus* sporadisch in lage concentraties aangetroffen met de kweekmethode (100 – 570 kve/l), met uitzondering van flowcel 1 (PE, 30°C) waarin hogere aantallen werden gevonden (10 – 3,2x10⁴ kve/l).

In het experiment zonder bestaande biofilm kon *A. fumigatus* zich dus vestigen in de biofilm van alle flowcellen, maar het lijkt hier vooral (behalve flowcel 4) om vestiging of hechting te gaan en niet om groei

aangezien het aantal kweekbare *A. fumigatus* erg laag was en vaak zelf niet gedetecteerd kon worden en de aantallen dus onder de detectielimiet liggen.

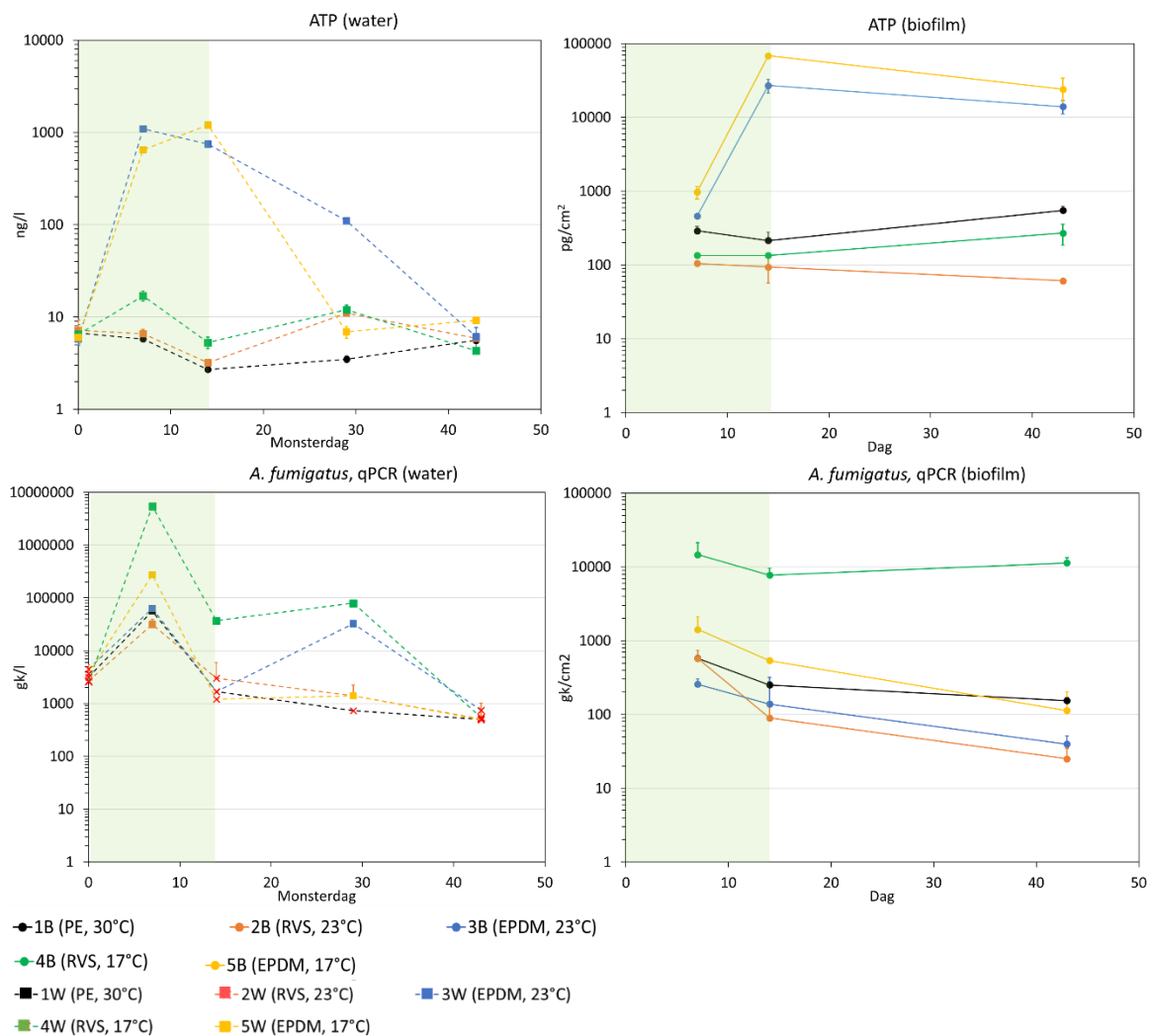
P. aeruginosa

Kweekbare *P. aeruginosa* zijn sporadisch in lage aantallen aangetroffen in het water van alle flowcellen en in de biofilm van de flowcellen met PE of EPDM plaatjes (flowcellen 1, 3, 5). Het DNA van *P. aeruginosa* is alleen in het water en de biofilm van flowcel 1 (PE, 30°C) aangetroffen en niet in de andere flowcellen.

In dit korte experiment lijkt *P. aeruginosa* zich dus (nog) niet te kunnen vestigen en vermeerderen in de biofilm. Ondanks dat van *P. aeruginosa* bekend is dat het vooral een zich vormende en niet een al bestaande biofilm koloniseert.

M. kansasii

DNA van *M. kansasii* is sporadisch en in lage aantallen gevonden in alle flowcellen. Alleen in de biofilm van flowcel 1 (PE, 30°C) lijkt *M. kansasii* zich te hebben kunnen vestigen en mogelijk ook groeien. De getallen waren echter laag het is onduidelijk of *M. kansasii* echt is gaan groeien.



Figuur 19. Resultaten van het 'PWN-experiment' zonder bestaande biofilm. Alleen van ATP en *A. fumigatus* is een grafiek gemaakt aangezien van de andere opportunistische pathogenen nagenoeg alle meetpunten onder de detectielimiet zijn. Als de twee rijen die per monstername zijn geanalyseerd niet significant van elkaar verschillen, is het gemiddelde met SD gegeven van twee rijen

met plaatjes. Met het groene vlak is aangegeven wanneer de flowcellen op circulatie stonden om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten, hierbij is de in- en uitgaande watertemperatuur van de flowcellen gelijk gehouden. Absolute getallen zijn gegeven in Tabel 19 en Tabel 20.

7 Discussie

7.1 Inleiding

Het doel van het hier beschreven onderzoek was om te bepalen wat het effect is van een warmtewisselaar op de drinkwaterkwaliteit die in het drinkwaterleidingnet wordt geplaatst. Hierbij spelen meerdere factoren een rol: temperatuur van het drinkwater, de temperatuur van het water in het secundaire circuit, materialen gebruikt in de warmtewisselaar, waterkwaliteit, kolonisatie van de biofilm en vermeerdering daarin van opportunistische pathogenen.

7.2 Representativiteit dosering micro-organismen

De opzet van het onderzoek: dosering van relatief hoge aantallen en recirculatie van 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 de biofilms zoals die in de praktijk aanwezig zijn. 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 hier een worstcase scenario nagebootst met hoge aantallen opportunistische pathogenen en recirculatie, zodat zeker is dat de opportunistische pathogenen de biofilm hebben kunnen koloniseren om zich vervolgens daarin te vermeerderen waarmee de praktijk is nagebootst. Indien niet gedoseerd wordt, of met heel lage aantallen, en daarnaast ook met doorstroming in plaats van recirculatie wordt 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 (meer representatieve) opzet zouden nauwelijks uitspraken gedaan kunnen worden over het mogelijk risico van warmtewisselaren in combinatie met materiaal en temperatuur. Voor de uitkomst van de studie is met name de eventuele vestiging en toename van opportunistische pathogenen in de biofilm van belang en in mindere mate de absolute aantallen. De absolute aantallen zijn wel belangrijk om de uitkomsten van de proef te vergelijken met eerder uitgevoerde proeven (zie ook Tabel 8). Hiermee kan extra informatie worden verkregen over het gedrag en mogelijk risico van opportunistische pathogenen in warmtewisselaren vergeleken met andere, voor drinkwater relevante, systemen.

7.3 Effect temperatuur en materiaal op groei micro-organismen

7.3.1 Inleiding

De temperaturen van de flowcellen waren afgesteld op gewenste temperaturen van het uitgaande water. Om de betreffende uitgaande watertemperaturen (17°C en 23°C) te halen is de temperatuur van het heatblock, dat het secundaire circuit nabootst (Figuur 6), ingesteld op respectievelijk 24-34°C en 48-64°C. Dit heeft tot gevolg gehad dat de temperatuur van de onderzijde van de plaatjes (die het heatblock raken) nagenoeg deze temperatuur heeft. De bovenkant van de plaatjes, met daarop de biofilm die aan het langsstromende drinkwater wordt blootgesteld, is minder warm dan het heatblock maar de exacte temperatuur van de biofilm is onbekend. Dit maakt interpretatie van de resultaten lastig. Uit voorgaande studies is bekend wat de minimale, optimale en maximale temperaturen zijn waarbij de hier geteste opportunistische pathogenen kunnen groeien in een drinkwaterbiofilm (Figuur 5). De maximumtemperatuur van *A. fumigatus*, *P. aeruginosa* en *M. kansasii* in een drinkwaterbiofilm is nog niet

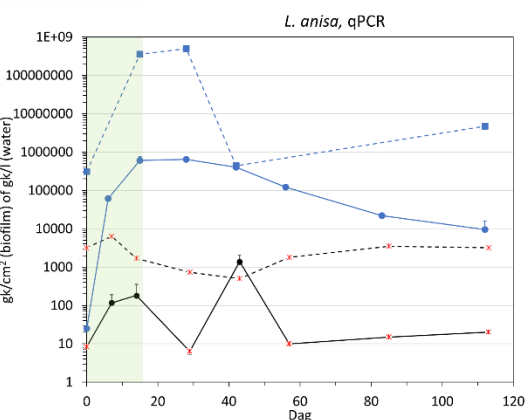
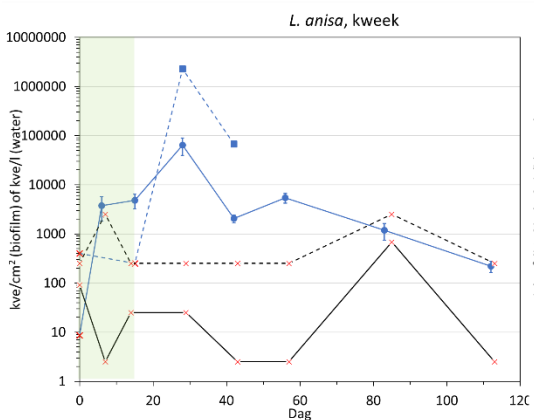
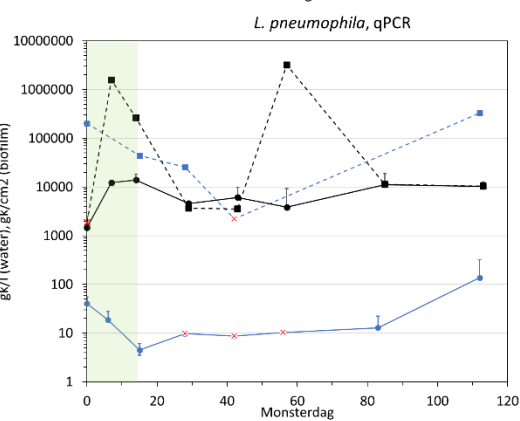
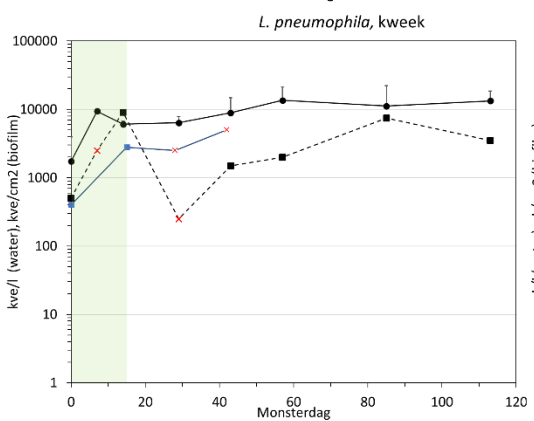
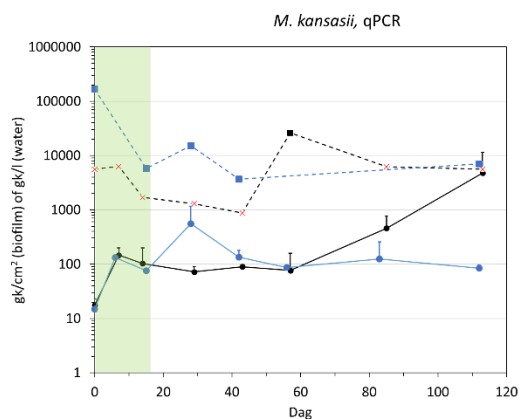
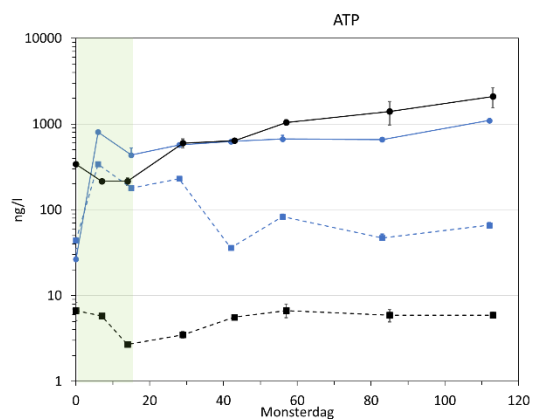
bekend, aangezien alle drie bij de hoogste geteste temperaturen (30°C) nog groeiden. De maximumtemperatuur van *L. pneumophila* (42-43°C) en *L. anisa* (38-39°C) is wel bekend. De temperatuur van de warmste heatblocks (flowcellen 2 en 3) ligt zeer waarschijnlijk boven de maximumtemperatuur van vier van de vijf onderzochten opportunistische pathogenen. Terwijl de optimale temperatuur van deze micro-organismen (gemiddeld 25 – 45°C) in de range van het koudere heatblock ligt (flowcellen 4 en 5).

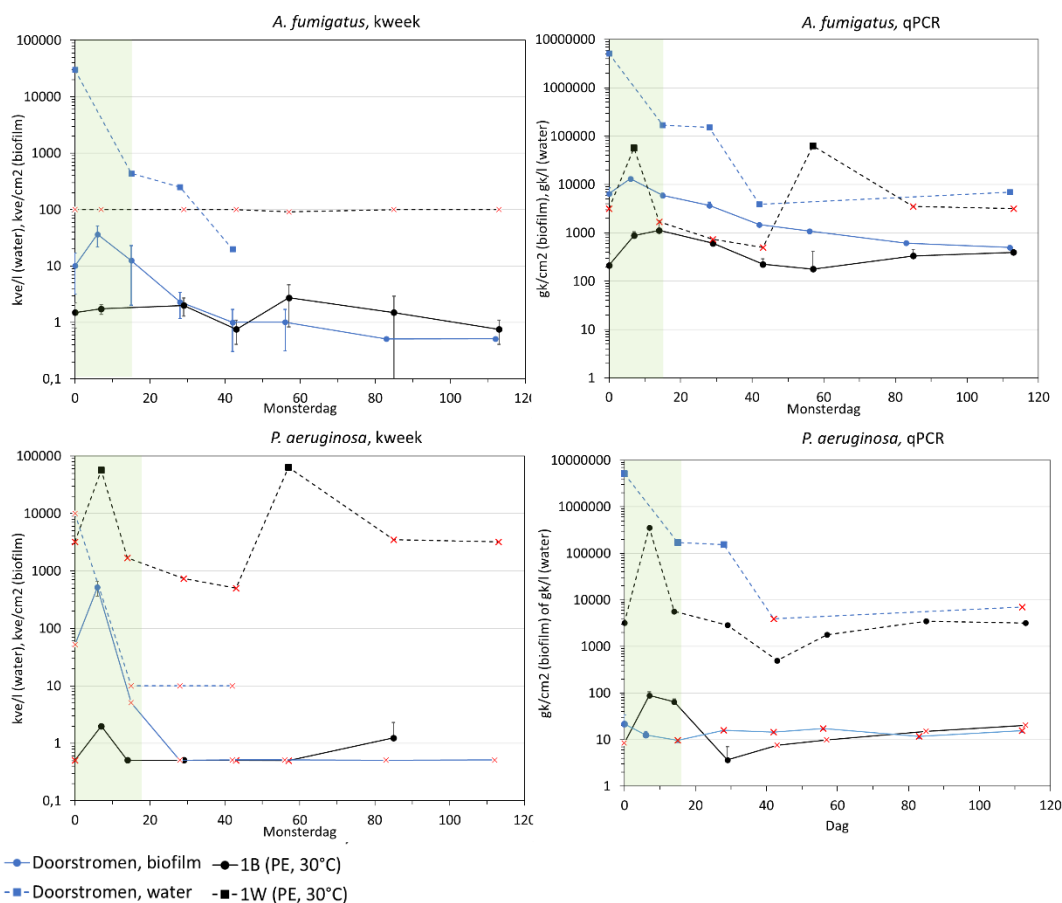
7.3.2 Vergelijking 1 (PE, 30°C) met KWR doorstroming

In het KWR-experiment bevatten beide flowcellen PE-plaatjes en was de in- en uitgaande temperatuur ingesteld op 30°C, waarbij één flowcel ingesteld stond op continue doorstroming en de andere op circulatie. In flowcel 1 (PE, 30°C) van het PWN-experiment met biofilm zijn dezelfde condities (PE, 30°C, doorstroming) gebruikt, zodat de twee experimenten met elkaar vergeleken konden worden. Eén van de verschillen tussen de experimenten is de waterkwaliteit. Het is bekend dat het drinkwater van KWR (Vitens, ps. Tull en 't Waal) minder nutriënten bevat (biologisch stabiel water) dan het drinkwater van PWN van ps. Andijk (biologisch minder stabiel water). Een lagere biologische stabiliteit van het water vergroot het risico op vestiging en groei van opportunistische pathogenen in het drinkwaterleidingnet. Omdat in het KWR-experiment de meeste opportunistische pathogenen in beide flowcellen groeiden, was de verwachting dat dit ook voor het PWN-experiment zo zou zijn. Een ander verschil tussen het KWR-doorstroming experiment en flowcel 1 (PE, 30°C) van het PWN-experiment met biofilm is dat er andere waterbaden zijn gebruikt voor het op temperatuur brengen van het drinkwater en het heatblock. In het PWN-experiment is de temperatuur van het drinkwater continu gemeten en opgeslagen, in het KWR-experiment is dit niet gedaan. Het is dus mogelijk dat er kleine temperatuurverschillen tussen beide experimenten zijn. Of er ook echt temperatuurverschillen waren, kon niet achterhaald worden. Als dit wel het geval was, zal het KWR-experiment enkele graden kouder zijn geweest dan het PWN-experiment (b.v. 28°C vs 30°C).

In Figuur 20 zijn de beide flowcellen met elkaar vergeleken. Hieruit blijkt dat een min of meer vergelijkbare hoeveelheid biofilm werd gevormd. Terwijl *L. pneumophila* in het PWN-experiment zich kon vestigen in de biofilm en ook beperkt kon groeien, zichtbaar door een stijging in het aantal kweekbare *L. pneumophila* bacteriën, kon *L. pneumophila* zich in het KWR-experiment mogelijk wel vestigen maar niet groeien. Voor *L. anisa* geldt het tegenovergestelde, wel vestiging en enige groei in het KWR-experiment, maar niet in het PWN-experiment. Dit kan mogelijk veroorzaakt zijn door de hierboven beschreven kleine temperatuurverschillen tussen beide experimenten. *L. pneumophila* kan vanaf 30°C groeien, maar *L. anisa* al vanaf 25°C (Figuur 5). In dat geval zou de KWR-flowcel iets kouder geweest moeten zijn dan flowcel 1 in het PWN-experiment. Het is echter niet uit te sluiten dat het verschil in waterkwaliteit de oorzaak is van het verschil tussen groei van *L. pneumophila*/*L. anisa* in het KWR- en PWN-experiment.

De resultaten voor *A. fumigatus* waren zeer vergelijkbaar tussen beide flowcellen, vooral het aantal kweekbare *A. fumigatus*. Slechts één opportunistisch pathogeen, *P. aeruginosa*, kon zich in geen van de flowcellen goed vestigen. Deze vergelijking laat zien dat de resultaten van de twee flowcellen min of meer vergelijkbaar zijn.





Figuur 20. Vergelijking van groei van opportunistische pathogenen in de 'doorstroming'-flowcel van het KWR-experiment en flowcel 1 (PE, 30°C) in het PWN-experiment. 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, hierbij is de in- en uitgaande watertemperatuur van de flowcellen gelijk gehouden. Deze resultaten zijn eerder getoond in Figuur 14, Figuur 17 en Figuur 18.

7.3.3 Totale biomassa

Uit de resultaten bleek dat de biomassa van de biofilm varieert afhankelijk van: i) de temperatuur van het drinkwater en het heatblock, ii) het materiaal van de plaatjes waarop de biofilm is gevormd en iii) de waterkwaliteit van het drinkwater (Tabel 7). In Tabel 7 zijn de gemiddelde en 95 percentielwaarden van de ATP-concentratie van de biofilm gegeven voor dag 21 – 112 van het PWN-experiment, de periode waarin de ATP-concentratie van de biofilm onder de meeste condities niet meer sterk toeneemt (met uitzondering van flowcel 3 (EPDM, 23°C)).

Het verschil in waterkwaliteit tussen ps. Andijk (PWN) en ps. Tull en 't Waal (Vitens, drinkwater KWR) liet een duidelijk verschil zien in de hoeveelheid biomassa die op de PE-plaatjes werd gevormd. De hoeveelheid biomassa op PE-plaatjes was lager in het KWR-experiment (gemiddeld: 391 pg/cm² (circuleren) en 764 pg/cm² (doorstroming) ; 95-percentiel respectievelijk 422 pg/cm² en 1014 pg/cm²) vergeleken met het PWN-experiment (gemiddeld: 1157 pg/cm²; 95-percentiel: 1960 pg/cm²). In het PWN-experiment is op drie materialen een biofilm gegroeid: PE, RVS-316 en EPDM. Voor RVS-316 en EPDM is dit op vergelijkbare temperaturen gedaan (de 17°C en 23°C flowcellen). Dit bevestigt resultaten uit eerdere studies, dat op EPDM meer biofilm gevormd wordt dan op RVS-316 [14]. Het effect van temperatuur op de hoeveelheid gevormde biomassa is lastiger vast te stellen. Uit literatuur is bekend dat bij een hogere temperatuur, die in de temperatuurrange voor groei van micro-organismen ligt, een lagere hoeveelheid biomassa wordt gevormd. Dit is in het algemeen voor bacteriële groei beschreven in 1942 [27], maar ook recenter in relatie tot het drinkwaterdistributiesysteem [11, 28, 29]. In

de flowcellen is de temperatuur van het in- en uitgaande drinkwater en het heatblock bekend. Door de verschillen in temperaturen van het drinkwater en het heatblock is de biofilm aan de onderkant warm, maar aan de waterzijde kouder. De hoge temperatuur van het heatblock van flowcellen 2 en 3 (48 – 64°C), leidde tot een hogere temperatuur van de biofilm dan watertemperatuur van 23°C. Maar de exacte temperatuur is onbekend. Desondanks, is het zeer waarschijnlijk dat deze hoge temperaturen dusdanig hoog zijn dat een deel van de micro-organismen die normaal in drinkwatersystemen aanwezig zijn, zich niet meer kunnen vermeerderen en er dus een negatief effect is op biofilmvorming. Het effect op de biofilm blijkt echter niet duidelijk uit Tabel 7 en Figuur 17. Het enige verschil tussen de 17°C en 23°C-flowcellen is dat van de 17°C flowcellen de hoeveelheid biofilm stabiel is gedurende het experiment, terwijl voor de 23°C-flowcel de concentratie gedurende het experiment blijft toenemen (Figuur 17). Het effect van de temperatuur op groei van opportunistische pathogenen wordt later besproken.

Tabel 7. Gemiddelde ATP-gehalte van de biofilm (dag 21 – 112, bij doorstroming van flowcellen) in het PWN-experiment vergeleken met de condities van de flowcellen. Thermometers van het uitgaande drinkwater zijn wel gekalibreerd, die van het inkomende drinkwater en uitgaande heatblock niet. * De waterbaden voor het drinkwater en het heatblock zijn ingesteld op 30°C, de daadwerkelijke temperatuur is echter niet gecontroleerd met een thermometer en is vermoedelijk een paar graden lager.

	Materiaal	Drinkwater-temperatuur [°C]		Heatblock-temperatuur uitgaand [°C]	Temperatuur waterbad voor heatblock [°C]	ATP biofilm (pg/cm ²)	
		In	Uit			Gemiddelde met SD (dag 21 – 112)	95-perc.
1B (PE, 30°C)	PE	30,6	29,5	32,5	31	1157 ± 620	1960
2B (RVS, 23°C)	RVS	14,8	23,4	42,4	52-60	215 ± 446	764
3B (EPDM, 23°C)	EPDM	15,8	22,7	gg	48-64	33848 ± 33103	73700
4B (RVS, 17°C)	RVS	14,6	19,0	gg	25-34	558 ± 182	729
5B (EPDM, 17°C)	EPDM	15,3	18,2	24,5	24-34	34200 ± 9680	43300
Circuleren, biofilm	PE	<30*	<30*	<30*	<30*	391 ± 28	422
Doorstromen, biofilm	PE	<30*	<30*	<30*	<30*	764 ± 225	1014

In voorgaande studies zijn van twee fullscale warmtewisselaars de warmtewisselaarplaten bemonsterd en is o.a. de hoeveelheid biofilm gemeten. In de warmtewisselaar in Hoogeveen, welke meerdere jaren in gebruik was op een zijstroom van de reinwaterkelder, bevatte de biofilm een hoge ATP-concentratie (1,3 – 2,9x10⁴ pg ATP/cm²; [13]). In de full-scale warmtewisselaar van Tilburg, geplaatst in het distributienet bij een Hogeschool en bemonsterd 6-18 maanden na ingebruikname, was de ATP-concentratie een stuk lager (3 – 340 pg ATP/cm²; [14]). In een andere proefopstelling waarin het effect van een warmtewisselaar (koude oogsten uit water waardoor het water opwarmt) op de microbiologische waterkwaliteit is getest, bevatte de biofilm 38 weken na ingebruikname van de warmtewisselaar 475 pg ATP/cm² [30]. Daarnaast is uit metingen in het distributienet bekend dat de biofilm op een drinkwaterleiding gemiddeld 870 ± 190 pg ATP/cm² bevat [22]. De hoeveelheid ATP in de biofilm van de flowcellen komt dus overeen met nieuw gevormde biofilms in warmtewisselaren, zowel op RVS (deze studie en Tilburg [14]) als op titanium ([30]), en komt overeen met de biofilm op de buiswand in het distributiesysteem.

7.3.4 Opportunistische pathogenen

Er zijn enkele onderzoeken beschikbaar waarin in een drinkwatermilieu is gekeken naar het effect van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen. De condities van deze onderzoeken zijn gegeven in Tabel 8.

Tabel 8. Overzicht van onderzoeken naar de invloed van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in een drinkwatermilieu. Gegeven zijn de condities en naam van het onderzoek.

Naam	Temperatuur	Methode	Doorstroming	Duur (dagen)	Biofilm	<i>A. fumigatus</i>	<i>L. anisa</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>	Referentie
25°C project	15 – 30°C	Batchflessen met PVC-P ringen	Nee	112	Nieuw	X				X	X	X	[11]
Biofilmmonitor <i>Legionella</i>	16 – 38,5°C	Biofilmmonitor met PVC-P ringen	Ja	300	Beiden		X	X					[9, 10]
Biofilmmonitor opportunistische pathogenen	17,2 – 40,0°C	Biofilmmonitor met PVC-P ringen	Ja	92	Nieuw	X			X		X		[12]
KWR-experiment	30°C	Flowcel met plaatjes	Ja	112	Bestaand	X	X	X		X	X		Hfd 5
PWN met biofilm	17 – 23°C	Flowcel met plaatjes	Ja	112	Bestaand	X	X	X		X	X		Hfd 6.3
PWN zonder biofilm	17 – 23°C	Flowcel met plaatjes	Ja	43	Nieuw	X	X	X		X	X		Hfd 6.4

Hieronder wordt de kolonisatie en groei van opportunistisch pathogenen in de flowcellen van dit experiment vergeleken met bovenstaande studies.

P. aeruginosa

Maximale aantallen

In een eerder onderzoek werden maximale aantallen van *P. aeruginosa* van ongeveer 1×10^3 – 2×10^6 kve/cm² en 3×10^6 – 1×10^9 gk/cm² behaald na 7-14 dagen waarna de aantallen daalden [11]. Dit onderzoek werd uitgevoerd onder statische condities (waarbij het drinkwater wekelijks werd ververs) met PVC-P als materiaal. In dat onderzoek leidden hogere temperaturen (15 – 30°C) tot hogere aantallen *P. aeruginosa*. In de biofilmmonitor kon *P. aeruginosa* zich niet vestigen en was het sporadisch aanwezig in lage aantallen (max 12 kve/cm² en 198 gk/cm²), ongeacht de temperatuur (17,2 – 40,0°C). De resultaten van het huidige onderzoek kwamen sterk overeen met het eerdere doorstromingsexperiment: *P. aeruginosa* kon zich onder doorstroomcondities niet goed vestigen in een al aanwezige of nieuw te vormen biofilm. De aantallen waarmee *P. aeruginosa* sporadisch werd aangetroffen waren vergelijkbaar met eerder onderzoek (max 89 kve/cm² en 36,5 gk/cm²).

Invloed temperatuur

In eerder onderzoek is aangetoond dat *P. aeruginosa* in ieder geval kan groeien bij ≤15°C tot ≥30°C (Figuur 5). Uitgaande van deze groeitemperaturen en de temperaturen van het uitgaande water van de flowcellen en de heatblocks (Tabel 7), zou *P. aeruginosa* in ieder geval in flowcellen 1, 4 en 5 kunnen groeien. Voor flowcell 2 en 3 is dat niet aan te geven, omdat zowel de temperatuur van het heatblock en daarmee de biofilm als ook de maximale groeitemperatuur onbekend zijn. Gezien de relatief hoge temperatuur van het heatblock bij deze twee flowcellen is het echter mogelijk dat de temperatuur in de biofilm te hoog was voor groei van *P. aeruginosa*. In dit onderzoek treedt geen groei op bij 30°C in het

KWR-experiment en komt *P. aeruginosa* sporadisch voor in flowcell 1 (30 – 31°C), 4 en 5 (uitgaand water: 18 – 19°C, heatblock: 24-35°C). Op basis van deze resultaten kan geen betrouwbare conclusie worden getrokken over de invloed van temperatuur op groei van *P. aeruginosa* in de flowcellen.

A. fumigatus

Maximale aantallen

Maximale aantallen van ongeveer 5×10^1 – 5×10^2 kve/cm² en $1,1 \times 10^7$ – $1,0 \times 10^9$ gk/cm² werden behaald in het eerdere onderzoek onder statische condities en met PVC-P [11]. Bij doorstroming in de biofilmmonitor kon geen stabiele populatie *A. fumigatus* in de biofilm worden gevormd. *A. fumigatus* werd alleen bij 24,2°C regelmatig aangetroffen, maar bij de andere temperaturen slechts sporadisch. In de PWN- en KWR-experimenten kon *A. fumigatus* zich wel goed vestigen in de biofilm (5×10^2 – $8,6 \times 10^3$ gk/cm² en $< 0,51 \times 10^0$ – $7,5 \times 10^3$ kve/cm²), maar trad groei alleen op tussen dag 0 – 14 waarna de concentratie stabiel bleef. In tegenstelling tot de experimenten in de biofilmmonitor, heeft *A. fumigatus* in de flowcellen dus wel een stabiele populatie gevormd. Ongeacht het materiaal van de plaatjes en de temperatuur.

Invloed temperatuur

In eerder onderzoek is aangetoond dat *A. fumigatus* in ieder geval kan groeien bij 25°C tot $\geq 30^\circ\text{C}$ (Figuur 5). Uitgaande van deze groeitemperaturen en de temperaturen van het uitgaande water van de flowcellen en de heatblocks (Tabel 7), zou *A. fumigatus* in ieder geval in flowcellen 1, 4 en 5 kunnen groeien. De kweekmethode voor *A. fumigatus* (§ 4.7.3) bevat een incubatiestap bij 50°C gedurende 48 uur. Dit maakt het waarschijnlijk dat *A. fumigatus* ook in flowcel 2 en 3 zou moeten kunnen groeien, al blijft dit onzeker omdat de temperatuur van het heatblock en daarmee de biofilm onbekend zijn. In dit onderzoek werd *A. fumigatus* DNA in alle flowcellen aangetroffen, met de hoogste aantallen in flowcel 4. Kweekbare *A. fumigatus* werden vooral in flowcellen 4, 1 en 5 aangetroffen wat suggereert dat de temperatuur van het heatblock van flowcel 2 en 3 (tussen 48 – 64°C, zie Tabel 7) misschien toch te hoog is voor *A. fumigatus*. Een temperatuur tussen 18 – 34°C in flowcellen 4 en 5 is dus wel een temperatuur waarbij *A. fumigatus* zich in de biofilm kan vestigen en vermeerderen.

M. kansasii

Maximale aantallen

Onder stagnante condities in het eerder onderzoek varieerden de maximale aantallen tussen ongeveer 1×10^7 en $1,1 \times 10^8$ gk/cm² [11]. Vanaf 20°C leidden hogere temperaturen tot hogere aantallen. In de biofilmmonitor is *M. kansasii* niet eerder getest. In het huidige onderzoek werden aanmerkelijk lagere aantallen genkopieën gevonden: $< 0,15 \times 10^0$ – $4,8 \times 10^3$ gk/cm² in het KWR- en PWN-experiment. Ook namen in de meeste flowcellen de aantallen niet toe in de tijd, met uitzondering van flowcel 1 (PE, 30°C).

Invloed temperatuur

In eerder onderzoek is aangetoond dat *M. kansasii* in ieder geval kan groeien bij 20°C tot $\geq 30^\circ\text{C}$. Uitgaande van deze groeitemperaturen en de temperaturen van het uitgaande water van de flowcellen en de heatblocks (Tabel 7), zou *M. kansasii* in ieder geval in flowcellen 1, 4 en 5 kunnen groeien. In het PWN-experiment met biofilm is *M. kansasii* aanwezig in flowcellen 1, 2, 4 en 5, maar zijn de aantallen het hoogst bij in de flowcel op 17°C (flowcel 5) en de flowcel op 30°C (flowcel 1). Dit komt min of meer overeen met wat bekend is over groeitemperaturen van *M. kansasii*.

L. anisa

Maximale aantallen

In eerder onderzoek zijn in biofilmmonitoren maximale *L. anisa*-aantallen gevonden tot ongeveer 5×10^6 kve/cm², bij een temperatuur tussen 27°C en 37,7°C. Bij hogere temperaturen kan *L. anisa* niet overleven

en bij lagere temperaturen trad er geen groei op [9, 10]. Daarnaast werd in dat eerder onderzoek waargenomen dat als *L. anisa* eenmaal aanwezig was in de biofilm, bleef *L. anisa* ook aanwezig bij 25,3°C. In dit onderzoek zijn de aantallen een stuk lager: 1×10^3 – 1×10^4 kve/cm² (KWR-experiment) en is *L. anisa* slechts sporadisch aangetroffen in beide PWN-experimenten. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat er lagere aantallen *L. anisa* zijn gedoseerd aan de proefopstelling en dat *L. anisa* in een andere vorm (in suspensie in het huidige experiment en in de biofilm in het eerder onderzoek met de biofilmmonitor) is gedoseerd. Ook kan het gebruikte materiaal (PVC-P vs EPDM en RVS-316) een belangrijke rol spelen. Zo leidt PVC-P over het algemeen tot hogere biofilmconcentraties, wat een rol kan spelen bij vermeerdering van *L. anisa* wanneer het organisme zich in gastheerprotozoa vermeerderd. Deze gastheerprotozoa zijn namelijk weer afhankelijk van de biofilmconcentratie.

Invloed temperatuur

In eerder onderzoek is aangetoond dat *L. anisa* in ieder geval kan groeien vanaf 25°C tot een maximale temperatuur van 39°C. Uitgaande van deze groeitemperaturen en de temperaturen van het uitgaande water van de flowcellen en de heatblocks (Tabel 7), zou *L. anisa* in ieder geval in flowcell 1 moeten kunnen groeien. Van flowcellen 4 en 5 is de temperatuur van de biofilm waarschijnlijk in deze groeirange of wat te laag en voor flowcellen 2 en 3 is de temperatuur van de biofilm waarschijnlijk te hoog. *L. anisa* wordt inderdaad alleen aangetroffen in flowcellen 1 (30°C) en flowcell 5 (17°C), wat suggereert dat de temperatuur van de biofilm in flowcellen 2 en 3 boven de 39°C was.

L. pneumophila

Maximale aantallen

In het eerdere onderzoek met de biofilmmonitoren waren de maximale *L. pneumophila*-aantallen hoger dan 10^7 kve/cm² [9, 10]. Deze hoge aantallen werden vooral gevonden als PVC-P ringen in de biofilmmonitor werden gebruikt. Bij een al bestaande biofilm groeide *L. pneumophila* vanaf ongeveer 34°C en namen de maximale aantallen in de biofilm toe van 1×10^4 tot 1×10^6 kve/cm². Bij lagere temperaturen (<30°C) wint *L. anisa* de competitie van *L. pneumophila* en kan *L. pneumophila* zich niet of veel minder goed vermeerderen. In het huidige onderzoek zijn niet alleen de *L. anisa* aantallen een stuk lager dan voorgaand onderzoek, maar ook de aantallen *L. pneumophila*: maximaal $2,0 \times 10^4$ kve/cm² (KWR experiment), $1,4 \times 10^4$ kve/cm² (PWN met biofilm), $6,6 \times 10^3$ kve/cm² (PWN zonder biofilm). Ook hier is de verklaring mogelijk dat in het huidige onderzoek een lagere doseerconcentratie is gebruikt, de *Legionella*-bacteriën in een andere vorm zijn gedoseerd en dat RVS-316 en EPDM-materiaal is gebruikt in vergelijking met PVC-P in de biofilmmonitor. De materiaalkeuze beïnvloedt o.a. de hoeveelheid biofilm die op het materiaal gevormd wordt en van *L. pneumophila* is bekend dat de maximale aantallen 100x hoger zijn bij 10x zo veel biofilm. De biofilm op het PVC-P in de biofilmmonitor bevatte na één maand 29 – 120 ng ATP/cm². Terwijl in dit onderzoek de ATP-concentratie na één maand varieerde tussen 0,365 – 0,430 ng ATP/cm² (circulatie, KWR-experiment), 0,625 – 1,1 ng ATP/cm² (doorstroming, KWR-experiment), 0,34 – 2,1 ng ATP/cm² (PE, PWN-experiment), 0,052 – 0,935 ng ATP/cm² (RVS, PWN-experiment) en 0,64 – 77,5 ng ATP/cm² (EPDM, PWN-experiment). De ATP-concentratie in de biofilm van de flowcellen is dus in de meeste gevallen ongeveer een factor 10 tot 1000 lager, wat de ook de lagere *L. pneumophila*-aantallen kan verklaren.

Invloed temperatuur

In eerder onderzoek is aangetoond dat *L. pneumophila* kan groeien tussen 30°C en 43°C. Uitgaande van deze groeitemperaturen en de temperaturen van het uitgaande water van de flowcellen en de heatblocks (Tabel 7), zou *L. pneumophila* in flowcell 1 (30°C) van het PWN-experiment en beide flowcellen in het KWR-experiment moeten kunnen groeien. Of groei in de andere flowcellen van het PWN-experiment mogelijk is, is niet met zekerheid te zeggen op basis van de beschikbare informatie over de temperaturen: flowcellen 2 en 3 zijn mogelijk te warm en flowcellen 4 en 5 mogelijk te koud. In flowcel 1 (PWN-

experiment) zijn kweekbare *L. pneumophila* inderdaad constant aanwezig in flowcel 1 en de circulatie-flowcel, maar het DNA wordt ook vrij consequent in flowcel 5 aangetroffen zonder dat de DNA-concentratie toeneemt. Dit wijst er op dat de temperatuur van flowcellen 2 en 3 hoger is dan 43°C en dat de temperatuur van de biofilm in flowcel 5 kolonisatie door *L. pneumophila* mogelijk maakt maar dat er geen groei plaats vindt. Wat opvalt is dat *L. pneumophila* in het KWR-experiment alleen in de circulatie-flowcel aanwezig is en *L. anisa* in de doorstroming-flowcel. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door de heatblocks van beide flowcellen in serie geschakeld staan. Het warme water stroomt vanuit het waterbad eerst naar de circulatie-flowcel en daarna gelijk naar de doorstroming flowcel. De circulatie-flowcel zal dus iets warmer zijn, waardoor de temperatuur mogelijk hoog genoeg is voor groei van *L. pneumophila*. Terwijl in de doorstroming-flowcel de temperatuur van het heatblock enkele graden lager zal zijn (exacte temperatuur is onbekend) wat voordelig is voor groei van *L. anisa* en deze legionellasoort daardoor misschien de competitie wint van *L. pneumophila*.

Invloed materiaal op groei opportunistische pathogenen

Het verschil in gebruikte materialen (RVS en EPDM in het huidige onderzoek vergeleken met PVC-P in eerdere onderzoeken) verklaren waarschijnlijk voor een groot deel de verschillen in maximale aantallen opportunistische pathogenen die in de biofilm zijn aangetroffen. In eerdere onderzoeken is vaak uitgegaan van een worst-case scenario waarbij PVC-P (zacht PVC) is gebruikt. Hiervan is bekend dat er veel biofilm op groeit omdat er veel nutriënten uit vrijkomen. Een dikkere biofilm is een gunstigere omgeving voor de opportunistische pathogenen om in te groeien. Het verschil in hoeveelheid biomassa dat op verschillende materialen gevormd wordt, blijkt ook uit dit onderzoek: PVC-P biofilmmonitor (29 – 120 ng ATP/cm²), circulatie KWR-experiment (0,365 – 0,430 ng ATP/cm²), doorstroming KWR-experiment (0,625 – 1,1 ng ATP/cm²), PE PWN-experiment (0,34 – 2,1 ng ATP/cm²), RVS PWN-experiment (0,052 – 0,935 ng ATP/cm²) en EPDM PWN-experiment (0,64 – 77,5 ng ATP/cm²). Het verschil in biofilm tussen EPDM en PVC-P is in sommige gevallen beperkt. Het is daarmee waarschijnlijk dat ook andere factoren een rol spelen in het verschil in maximale aantallen tussen de verschillende onderzoeken.

8 Conclusies en aanbevelingen

8.1 Conclusies

Hieronder zijn puntsgewijs de conclusies uit het onderzoek weergegeven.

- Met het ontwikkelde systeem van flowcellen kan de invloed van temperatuur op biofilmvorming en groei van vijf opportunistische pathogenen bepaald worden onder vergelijkbare condities als in warmtewisselaren.
- In de studie is, naast het gedrag van opportunistische pathogenen, ook de groei (massa) van biofilm onderzocht. Op EPDM-materiaal wordt de meeste biofilm gevormd, gevolgd door PE en RVS-316. De hoeveelheid biofilm (in ATP) is ongeveer een factor 60-150x hoger op EPDM dan op RVS-316.
- Van de geteste opportunistische pathogenen kunnen *L. pneumophila*, *L. anisa*, *A. fumigatus* en *M. kansasii* zich in meer of mindere mate in de flowcellen vestigen en vermeerderen. *P. aeruginosa* kan zich niet of nauwelijks vestigen en vermeerderen in de experimenten waar al een biofilm op de plaatjes is gevormd.
- In de waterfase is het ATP-gehalte vergelijkbaar met normale waarden voor drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater. De mate van biofilmvorming op de plaatjes is niet zichtbaar door het ATP-gehalte in het water te meten. Hetzelfde geldt voor vestiging en groei van opportunistische pathogenen in de biofilm, dit is niet of nauwelijks meetbaar in het uitgaande water. Het is daarom belangrijk om de biofilm te bemonsteren en te analyseren om inzicht te krijgen in het mogelijke risico van warmtewisselaren op groei van opportunistische pathogenen en de volksgezondheid.
- *P. aeruginosa* is sporadisch aangetroffen in de biofilm, maar kon zich onder doorstroomcondities niet goed vestigen in een al aanwezige of nieuw te vormen biofilm. Omdat *P. aeruginosa* zich niet heeft kunnen vestigen, kan geen conclusie worden getrokken over de invloed van temperatuur op groei van *P. aeruginosa* in de flowcellen.
- *A. fumigatus* kon zich vestigen in alle flowcellen en heeft een stabiele populatie gevormd. Echter, er trad alleen groei op tussen dag 0 – 14 waarna de concentratie stabiel bleef. Het materiaal van de plaatjes en de temperatuur leken geen grote rol in te spelen in de maximale aantallen die zijn aangetroffen. Hieruit wordt geconcludeerd dat *A. fumigatus* zich waarschijnlijk op het EPDM en RVS in de warmtewisselaren kan vestigen als de ingestelde temperatuur hoog genoeg is. Bij welke temperatuur ze in staat zijn zich te vestigen is niet op te maken uit de experimenten, doordat de temperatuur van de biofilm tijdens de experimenten onbekend is.
- *M. kansasii* kon zich in de meeste flowcellen vestigen en de aantallen waren het hoogst in de flowcel op 17°C (flowcel 5) en de flowcel op 30°C (flowcel 1). De aantallen namen niet verder toe in de tijd, met uitzondering van flowcel 1 (PE, 30°C). Hieruit wordt geconcludeerd dat *M. kansasii* zich waarschijnlijk op het EPDM in de warmtewisselaren kan vestigen als de ingestelde temperatuur hoog genoeg is. Bij welke temperatuur ze in staat zijn zich te vestigen is niet op te maken uit de experimenten, doordat de temperatuur van de biofilm tijdens de experimenten onbekend is.
- *L. anisa* werd sporadisch aangetroffen in beide PWN-experimenten, met name in flowcellen 1 (PE, 30°C) en 5 (EPDM, 17°C) maar was wel in de circulatie flowcel van het KWR-experiment constant aanwezig. Kweekbare *L. pneumophila* was alleen constant aanwezig in flowcel 1 (PE, 30°C), maar het DNA werd ook vrij consequent in flowcel 5 (EPDM, 17°C) aangetroffen. In flowcellen waarin *L. pneumophila* relatief hoog was, was *L. anisa* afwezig en andersom. Hieruit wordt geconcludeerd dat *L. anisa* en *L. pneumophila* zich waarschijnlijk op het EPDM in de warmtewisselaren kunnen vestigen als de ingestelde temperatuur hoog genoeg is. Bij welke temperatuur ze in staat zijn zich te vestigen is

niet op te maken uit de experimenten, doordat de temperatuur van de biofilm tijdens de experimenten onbekend is.

Maximale aantallen opportunistische pathogenen die in het huidige onderzoek in de biofilm zijn gevonden zijn lager dan in voorgaande experimenten (genoemd in Tabel 8).

Dit kan meerdere oorzaken hebben:

- Verschil in gebruikte materialen (RVS en EPDM in het huidige onderzoek vergeleken met PVC-P in eerdere onderzoeken). In eerdere onderzoeken is vaak uitgegaan van een worst-case scenario met PVC-P waarvan bekend is dat er veel biofilm op groeit omdat er veel nutriënten uit vrijkomen. Een dikkere biofilm is een gunstigere omgeving voor de opportunistische pathogenen om in te groeien.
- Een lagere doseerconcentratie in het huidige onderzoek.
- De wijze van doseren van opportunistische pathogenen: in het huidige onderzoek als oplossing in water, in voorgaande onderzoeken vaak als onderdeel van materiaal met biofilm.
- Verschillen in hydraulische condities: in het huidige onderzoek is de flow continu 0,19 m/s, in voorgaande onderzoeken was er wel continue doorstroming (biofilmmonitor) maar op een lagere snelheid. In andere onderzoeken was er geen doorstroming (batch-experimenten).

Bij het aansturen van de proefinstallatie is de keuze gemaakt om (i) te sturen op de temperatuur van het uitgaande water en (ii) deze sturing alleen te regelen door aanpassing van de secundaire temperatuur (het heatblock) en niet door aanpassing van de volumestromen in de flowcellen (om de verblijftijd te verhogen). Hierdoor is het heatblock (secundaire circuit) in sommige gevallen erg warm geworden (> 43°C). Bij deze temperaturen kunnen de meeste opportunistische pathogenen niet overleven, waardoor twee van de vijf flowcellen niet representatief zijn voor de praktijk. De exacte temperatuur van het heatblock is voor de meeste flowcellen echter niet bekend, waardoor op basis van deze deelstudie nog geen uitspraak kan worden gedaan over welke temperaturen veilig zijn in het gebruik van warmtewisselaren. Wel is duidelijk dat sommige opportunistische pathogenen zich bij de geteste temperaturen konden vestigen in de flowcellen en konden groeien. Een warmtewisselaar kan daardoor, bij te hoge temperaturen, een hotspot vormen voor één of meer opportunistische pathogenen.

8.2 Wat betekenen deze resultaten voor de praktijk?

Vanwege de onduidelijkheid over de temperatuur van de flowcellen, heatblocks en biofilm kan op basis van deze deelstudie geen maximale temperatuur voor het gebruik van warmtewisselaren voor TED vastgesteld worden. In het nu lopende vervolgonderzoek (de zogenaamde 'wintermeting', voorjaar 2023) zijn deze onduidelijkheden opgelost en kan naar verwachting wél een betrouwbare uitspraak worden gedaan over effecten van TED op de groei van opportunistische pathogenen bij drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater.

Het onderzoek laat zien dat de temperatuur van het secundaire circuit een constante en zeer grote invloed heeft op de biofilm. Deze invloed is veel groter dan de invloed op het drinkwater dat opgewarmd wordt. Het – al dan niet – groeien van opportunistische pathogenen in de biofilm in deze studie onderschrijft deze conclusie. Hieruit kan afgeleid worden dat het onverstandig is om bij (het ontwerp van) aquathermie/ TED alleen de uitgaande temperatuur van het drinkwater te beschouwen en dat de temperaturen van tegenstromen van het secundaire medium beperkt moeten worden.

Uit deze deelstudie (en eerder onderzoek) blijkt dat het gebruik van EPDM als afsluitrubbers van de platen aandacht vergt. Op EPDM wordt meer biofilm gevormd dan op RVS of PE, waardoor de niche voor opportunistische pathogenen om zich te vestigen en te vermenigvuldigen groter is. Ook worden sommige

opportunistische ziekteverwekkers aangetroffen op de EPDM-plaatjes, maar niet op de RVS-plaatjes. De temperatuur is dan nog steeds een zeer bepalende factor of de opportunistische pathogenen gaan groeien, maar als die hoog genoeg is kan het EPDM een hotspot gaan vormen. Het zou daarom verstandig zijn om materialen te gebruiken in warmtewisselaars die een lage groeibevorderende eigenschap hebben.

8.3 Aanbevelingen voor vervolgonderzoek

Vervolgexperimenten om het effect van warmtewisselaars op de microbiologische kwaliteit van drinkwater te bepalen moeten aangepast worden om de resultaten makkelijker te interpreteren en daarmee toepasbaar te maken. Dit geldt met name voor de temperatuur van het water, biofilm en het heatblock. De belangrijkste aanpassing hiervoor is dat het systeem van flowcellen zo wordt aangepast dat de temperatuur van het heatblock niet boven 35°C uitkomt, maar dat de uitgaande watertemperatuur wel nog steeds verhoogd. De uitgaande watertemperatuur moet daarbij representatief zijn voor hoe full-scale warmtewisselaren bedreven worden of hoe drinkwaterbedrijven deze graag zouden willen bedrijven. Deze aanpassingen zijn ondertussen doorgevoerd en momenteel worden de PWN-experimenten herhaald met dit nieuwe systeem.

Voor materiaalgebruik in de warmtewisselaar wordt aanbevolen om de inzet van EPDM-typen met lage BPP-waarde of andere alternatieve materialen met een lage BPP-waarde te onderzoeken. Bij een lage BPP-waarde komen weinig groeibevorderende stoffen vrij en kan er minder biofilm gevormd worden. De BPP-waarde kan in een laboratoriumtest voor elk materiaal en elke batch van bepaald materiaal bepaald worden.

9 Referenties

1. Agudelo-Vera, C.M., et al., *Drinking water temperature around the globe: understanding, policies, challenges and opportunities (Open Access)*. Water, 2020. **12**(4): p. art. no. 1049.
2. Agudelo-Vera, C.M., et al., *Identifying (subsurface) anthropogenic heat sources that influence temperature in the drinking water distribution system*. Drinking Water Engineering and Science, 2017(10): p. 83-91.
3. van der Wielen, P. and D. van der Kooij, *Opportunistic ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater*. 2011, KWR: Nieuwegein. p. 70.
4. van der Wielen, P.W. and D. van der Kooij, *Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(3): p. 825-34.
5. van der Wielen, P. *Opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater: betekenis voor de drinkwatersector*. in *BTO congres*. 2014. Nieuwegein.
6. Wullings, B., *Genetische typering van drinkwaterstammen van opportunistische ziekteverwekkers*. 2017, KWR: Nieuwegein. p. 56.
7. Van der Wielen, P.W.J.J. and B.A. Wullings. *Genotype analyses of Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia and Aspergillus fumigatus isolates from drinking water reveal similar genotypes with patient strains*. in *20th International Symposium on Health Related Water Microbiology*. 2019. Vienna, Austria: IWA.
8. Glasmacher, A., S. Engelhart, and M. Exner, *Infections from HPC organisms in drinking-water amongst the immunocompromised*, in *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety*, J. Bartram, et al., Editors. 2003, World Health Organization: Cornwall, UK. p. 137-145.
9. van der Kooij, D., A.J. Brouwer-Hanzens, and H. Veenendaal, *Invloed van de watertemperatuur op de groei van Legionella pneumophila en Legionella anisa in biofilms*. 2009, KWR: Nieuwegein. p. 44.
10. van der Kooij, D., A.J. Brouwer-Hanzens, and H. Veenendaal, *Invloed van de temperatuur op de groei van Legionella pneumophila in een vloeibaar medium en in biofilms*. 2010, KWR: Nieuwegein. p. 36.
11. van der Wielen, P.W.J.J., *Invloed van temperatuur op groei van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater*. 2020, KWR: Nieuwegein. p. 40.
12. van der Wielen, W.J.J., *Rol van drinkwater, biofilm en temperatuur op groei van opportunistische pathogenen*. 2014, KWR: Nieuwegein. p. 37.
13. van Bel, N., et al., *Verdieping Warmte en Koude uit Drinkwater*. 2017, KWR: Nieuwegein. p. 112.
14. Moerman, A., N. van Bel, and L.J.P. Snij, *Aquathermie in Tilburg: warmte en koude uit drinkwater. Evaluatie TED-installatie bij Fontys Hogeschool* 2019, KWR: Nieuwegein p. 67.
15. Imtiaz Ahmad, J., *Thermal Energy Recovery from Drinking Water Distribution Systems. A study into microbial water quality and potential energy*. 2022, TU Delft.
16. van Bel, N., *Literatuuronderzoek naar de invloed van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in drinkwater*. 2017, KWR: Nieuwegein. p. 23.
17. de Fockert, A., et al., *WarmingUp - Aquathermie configuraties. Overzicht TEO, TED en TEA door middel van factsheets, kostenkanten en beslisbomen*. 2021. p. 88.
18. Learbuch, K., *Variatie in biomassa-productiepotentie (BPP) van PE-materialen die door drinkwaterbedrijven worden gebruikt* 2018, KWR: Nieuwegein. p. 27.
19. van der Kooij, D., et al., *Improved biostability assessment of drinking water with a suite of test methods at a water supply treating eutrophic lake water*. Water Research, 2015. **87**: p. 347-55.
20. van der Wielen, P.W.J.J. and D. van der Kooij, *Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands*. Applied and Environmental Microbiology, 2013. **79**(3): p. 825-834.
21. van der Wielen, F.W.M. and M. Uytewaal- Aarts, *Non-tuberculeuze mycobacteriën in drinkwater*. 2013, KWR: Nieuwegein. p. 66.

22. Learbuch, K. and B. Wullings, *Indicator voor biofilm in het drinkwater- distributiesysteem*. 2018, KWR: Nieuwegein. p. 68.
23. van der Kooij, D. and P. van der Wielen, *Invloed van watersamenstelling, afstand en seizoen op ATP in water en sediment uit het leidingnet van zes pompstations*. 2009, KWR: Nieuwegein. p. 63.
24. Wullings, B. and L. Heijnen, *Bepalen van de relatie tussen het aantal DNA-kopieën (qPCR) en het aantal bacteriecellen*. 2016, KWR: Nieuwegein. p. 33.
25. Bressler, D., et al., *Persistence of Pseudomonas aeruginosa in drinking-water biofilms on elastomeric material*. Wat. Sci. Tech., 2009. **9**(1): p. 81-87.
26. Doğruöz, N., et al., *Pioneer colonizer microorganisms in biofilm formation on galvanized steel in a simulated recirculating cooling-water system*. Journal of Basic Microbiology, 2009. **49**(S1): p. S5-S12.
27. Monod, J., *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. 1942.
28. Farhat, N.M., et al., *Effect of water temperature on biofouling development in reverse osmosis membrane systems*. Water Res, 2016. **103**: p. 149-159.
29. van der Kooij, D., et al., *Assessment of the microbial growth support potential of products in contact with drinking water (CPDW): Development of a harmonised test to be used in the European Acceptance Scheme concerning CPDW*. 2003.
30. Ahmad, J.I., et al., *Effects of cold recovery technology on the microbial drinking water quality in unchlorinated distribution systems*. Environmental Research, 2020. **183**: p. 109175.

Bijlage I Logboek van container en flowcellen

Tabel 9. Logboek van werkzaamheden en activiteiten in de container in de ZOB en met de flowcellen.

Week Experiment	Week Kalender	Datum	Activiteit	Aanentent met opportunistische pathogenen	Monsternamen
	47	23-11-2021	Start meetserie 1. Aangeent met opp. Pathogenen + monsternamen water. Alle flowcellen (FC) op circuleren		
	47	25-11-2021	Waterbad 5 (drinkwater FC3) in storing door te lage waterstand. Bijgevoeld en aangezet.		
	49	8-12-2021	Waterbad 5 (drinkwater FC3) staat uit. Waterbad 2 heeft te laag water, staat wel nog aan. UV lamp op uitgaande drinkwater (dat wordt geloosd) gemonteerd.		
	50	13-12-2021	Alle slangen en leidingen geïsoleerd. Druksensor wordt gelogd.		
	51	22-12-2021	Steeklans is vervangen. Waterbad 4 (heatblock FC3) bijgevoeld. Bovenkant van FC1, 2 en 3 geïsoleerd. Te weinig inkomend drinkwater FC1, opnieuw afgesteld. Temperatuur diverse waterbaden opnieuw ingesteld		
	1	7-1-2022	Waterbad 2 (heatblock FC1) in storing, water bijgevoeld en aangezet.		
	2	11-1-2022	Nieuwe plaatjes (RVS-316, EPDM, PE) in alle flowcellen. Systemen op doorstromen om biofilm te gaan vormen. Start biofilmvorming 1		
	2	14-1-2022	Extra verwarmingselement in waterbad 1 (drinkwater FC1) geplaatst.		
	3	21-1-2022	Stroomgroepen doorgemeten;		
	8	21-2-2022	Nieuwe data logger + calibratie		
	8	23-2-2022	Loggers vervangen. Flowcellen omzetten van doorstroming naar circulatie lukt niet omdat temperaturen blijven oplopen. De waterbaden werken elkaar tegen (koud water flowcell in, warm water uit: moet steeds weer teruggekoeld en opgewarmd worden).		
0	9	1-3-2022	Flowcellen op circuleren met gelijke temperaturen voor ingaand drinkwater en heatblock!	Aanentent 1 ●	
1	10	7-3-2022	Ventilatie gaten gemaakt in de container. Gordijnen in container geplaatst.		
1	10	8-3-2022	Gordijnen weggehaald ivm te hoge temp tussen de apparatuur.		X
2	11	15-3-2022			X
3	12	23-3-2022	Flowcellen leeg maken, nieuw water erin.	Aanentent 2 ● Opnieuw aanentent omdat concentratie opportunistische pathogenen in biofilm na eerste ent niet hoog genoeg is.	Monsternamen FC1 + FC2.
4	13	28-3-2022	Stroomstoring 1. Geen flow.		
4	13	1-4-2022	Nog geen stroom. Flowcellen op doorstromen gezet (zonder opwarming/afkoeling van drinkwater en heatblocks)		
5	15	12-4-2022	Stroomstoring 1 opgelost: elektriciteit hersteld. Flowcell op doorstromen en temperaturen waterbaden weer ingesteld. Start biofilmvorming 2.		
6	16	20-4-2022	Waterbad FC1 (drinkwater) uitgegaan door te lage waterstand.		
6	16	22-4-2022	Waterbad FC1 (drinkwater) bijgevoeld en aangezet.		
7	17	28-4-2022	Stroomstoring 2. Hoofdschakelaar uitgevallen. Flowcellen blijven op doorstromen, maar zonder opwarming/afkoeling van drinkwater en heatblocks.		
8	18	4-5-2022	Stroomstoring 2 opgelost. Hoofdschakelaar aangezet. Waterbaden weer aangezet.		
0	19	10-5-2022	Flowcellen op circuleren met gelijke temperatuur drinkwater en heatblock. Deel plaatjes vervangen door nieuwe plaatjes (experiment zonder biofilm).	Aanentent 3 ●	X (experiment met biofilm)
	20	16-5-2022	Stroomstoring 3.		
1	20	17-5-2022	Stroomstoring 3 opgelost. Waterbaden aangezet.		X (experiment met en zonder biofilm)
2	21	23-5-2022	Flowcellen op doorstromen. Waterbaden 5 en 6 (drinkwater FC 3 en 4) kunnen drinkwater niet ver genoeg terugkoelen.		X (experiment met en zonder biofilm)
3	22	3-6-2022	Aardlek buitenkast verwijderd, paar uur geen electriciteit. Daarna waterbaden weer aangezet.		

4	23	7-6-2022	Flowcellen op doorstromen. Waterbaden 3 (drinkwater FC 2) kan drinkwater niet ver genoeg terugkoelen.		X (experiment met biofilm)
4	23	10-6-2022	Waterbad 5 uitgezet i.v.m. storing produceert waterbad te veel warmte. Risico op oververhitting. Extra ventilator geplaatst		
5	24	15-6-2022	Extra ventilator geplaatst. Waterbad 5 vervangen.		
6	25	21-6-2022			X (experiment met en zonder biofilm)
6	25	23-6-2022	Waterbad 4 uit door lekkage.		
6	25	24-6-2022	Container wit geschilderd.		
7	26	27-6-2022	Waterbad 4 weer aangezet.		
8	27	5-7-2022	Flow FC4 te laag (60 i.p.v. 100 L/uur).		X (experiment met biofilm)
12	31	2-8-2022	Flow FC4 te laag (60 i.p.v. 100 L/uur).		X (experiment met biofilm)
15	34	22-8-2022	Flow FC4 te laag (40 i.p.v. 100 L/uur).		
16	35	30-8-2022	Flow FC4 te laag (40 i.p.v. 100 L/uur). Waterbaden en airco uitgezet.		X (experiment met biofilm)
-	36	7-9-2022	Airco en ventilator aangezet om vocht in container tegen te gaan.		

Stroomstoring

Circulatie water over flowcellen. Geen doorstroming.

Bijlage II Instellingen en optimalisatie temperatuur flowcellen, experiment PWN

Tabel 10. Instellingen van de waterbaden (niet van de watertemperatuur) om het inkomende drinkwater en het heatblock (en daarmee het uitgaande drinkwater) op de juiste temperatuur te krijgen.

Week Experiment	Week Kalender	Datum	Ingestelde temp.									
			FC 1		FC 2		FC 3		FC 4		FC 5	
			1	2	3	9	5	4	6	7	6	8
	2	14-1-2022						45		36,4		
	3	17-1-2022						48	8,7	40	8,7	
	3	18-1-2022								44		
	3	21-1-2022								45,5		
	4	28-1-2022	29,1			55		60		43		53
	5	31-1-2022				62		65				
	6	11-2-2022						63		42		52
	8	21-2-2022	41,2	29,1	8,9	62	8,6	63	9,7	42	9,7	52
	8	23-2-2022	41,2	30	8,9	62	8,6	58	9,7	40	9,7	46
0	9	1-3-2022	30	30	23	23	23	23	17	17	17	17
5	15	12-4-2022	38	30	8,3	62	8,3	64	9,7	40	9,7	40
6	16	22-4-2022	36	30	7,2	62	7,2	64	9,2	38	9,2	38
7	17	28-4-2022	36	31	7,2	62	7,2	64	9,2	38	9,2	38
8	18	4-5-2022	36	31	7,2	62	7,2	64	9,2	38	9,2	38
0	19	10-5-2022	29	30	21,5	23	23	23	17	17	17	15,5
2	21	23-5-2022	33	31	6	57	6	64	8	34	8	34
3	22	3-6-2022	33	31	6	60	6	64	8	34	8	34
4	23	7-6-2022	33	31	5	60	6	62	8	32	8	32
		9-6-2022	33	31	5	58	6	60	8	32	8	32
		10-6-2022	33	31	5	54	x	35	8	29	8	29
5	24	15-6-2022	33	31	5	52	6	48	8	25	8	24
Circulatie, watertemperatuur drinkwater en secundaire circuit gelijk aan elkaar												
Waterbad staat op maximaal koelen, maar door de hoge temperatuur van inkomende drinkwater wordt het drinkwater niet voldoende teruggekoeld naar gewenste temperatuur												
Problemen met stroomstoringen												
Storing waterbad. Waterbad 5 uitgezet i.v.m. oververhitting apparatuur. Waterbad vervangen en op 15-6-22 weer aangezet.												
Nummer waterbad voor inkomend drinkwater												
Nummer waterbad voor secundaire circuit om temperatuur heatblock in te stellen												

Bijlage III Tabellen KWR-experiment van resultaten opp. pathogenen

Tabel 11. ATP-concentratie en aantallen opportunistische pathogenen in water, bepaald met de kweekmethode, van het KWR-experiment bij 30°C. Gegeven is het resultaat van een enkelvoudige meting. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet. De detectielimiet is gegeven.

	Datum	Dag	ATP (ng/l)		Kweek (kve/l)			
			Gem.	SD	L. pneumophila	L. anisa	A. fumigatus	P. aeruginosa
Circulatie	13-4-2021	0	74	1,5	<400	<400	4,0E+04	<10000
	19-4-2021	6	440	4,7				
	28-4-2021	15	220	3,8	1,5E+05	<250	8,5E+02	<10
	11-5-2021	28	300	0,15	5,1E+06	<5000	2,1E+02	<10
	25-5-2021	42	310	11	3,7E+06	<2500	6,0E+01	<10
	8-6-2021	56	73	1,0				
	5-7-2021	83	33	0,15				
	2-8-2021	112	41	4,9				
Doorstroming	13-4-2021	0	44	2,8	4,0E+02	<400	3,0E+04	<10000
	19-4-2021	6	340	23				
	28-4-2021	15	180	2,1	2,8E+03	<250	4,4E+02	<10
	11-5-2021	28	230	7,1	<2500	2,3E+06	2,5E+02	<10
	25-5-2021	42	36	2,1	<5000	6,8E+04	<20	<10
	8-6-2021	56	83	5,9				
	5-7-2021	83	47	5,3				
	2-8-2021	112	66	5				

Tabel 12. Aantallen opportunistische pathogenen in water, bepaald met de qPCR, van het KWR-experiment bij 30°C. Gegeven is het resultaat van een enkelvoudige meting. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet. De detectielimiet is gegeven

	Datum	Dag	qPCR (gk/l)				
			L. pneumophila	L. anisa	A. fumigatus	P. aeruginosa	M. kansasii
Circulatie	13-4-2021	0	3,1E+05	8,8E+05	1,2E+07	1,9E+05	6,4E+05
	19-4-2021	6					
	28-4-2021	15	2,5E+07	1,3E+05	4,5E+05	1,6E+03	1,3E+05
	11-5-2021	28	3,5E+07	9,7E+02	6,0E+04	<850	4,5E+03
	25-5-2021	42	2,4E+07	<2200	8,3E+03	<2200	4,2E+03
	8-6-2021	56					
	5-7-2021	83					
	2-8-2021	112	9,3E+06	5,7E+05	1,4E+05	5,3E+03	1,1E+04
Doorstroming	13-4-2021	0	2,0E+05	3,1E+05	5,1E+06	1,2E+05	1,7E+05
	19-4-2021	6					
	28-4-2021	15	4,4E+04	3,6E+08	1,7E+05	5,2E+03	5,8E+03
	11-5-2021	28	2,6E+04	5,0E+08	1,5E+05	1,8E+03	1,5E+04
	25-5-2021	42	<2200	4,4E+05	3,9E+03	<3700	<3700
	8-6-2021	56					
	5-7-2021	83					
	2-8-2021	112	3,3E+05	4,7E+06	<7000	<7000	<7000

Tabel 13. ATP-concentratie en aantallen opportunistische pathogenen in biofilm, bepaald met de kweekmethode, van het KWR-experiment bij 30°C. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet. De detectielimiet is gegeven

	Datum	Dag	Kweek (kve/cm2)									
			ATP (pg/cm2)		L. pneumophila		L. anisa		A. fumigatus		P. aeruginosa	
			ATP	sd	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD
Circulatie	13-4-2021	0	54	23	<8,6		<8,6		1,8E+01	4,2E+00	<51	
	19-4-2021	6	980	170	<517		<517		1,3E+01	3,5E+00	5,7E+02	7,1E+01
	28-4-2021	15	1060	198	3,5E+04	0,0E+00	<517		1,5E+01	7,1E+00	<5,1	
	11-5-2021	28	390	42	2,7E+04	1,1E+04	<51		2,8E+01	3,5E+00	<0,51	
	25-5-2021	42	430	14	2,0E+04	4,2E+03	<515		2,5E+01	3,5E+00	<0,52	
	8-6-2021	56	385	7	8,7E+03	9,9E+02	<51		1,4E+01	3,5E+00	<0,51	
	5-7-2021	83	365	7	7,8E+03	0,0E+00	<51		1,2E+01	0,0E+00	<0,51	
Doorstroming	2-8-2021	112	385	78	8,1E+03	3,5E+02	<51		1,0E+00	7,0E-01	<0,51	
	13-4-2021	0	27	9			<8,7		1,0E+01	6,9E+00	<52	
	19-4-2021	6	805	21			3,8E+03	1,9E+03	3,7E+01	1,5E+01	5,2E+02	1,5E+02
	28-4-2021	15	435	92			4,9E+03	1,6E+03	1,3E+01	1,1E+01	<5,1	
	11-5-2021	28	570	28			6,5E+04	2,5E+04	2,3E+00	1,1E+00	<0,51	
	25-5-2021	42	625	21			2,1E+03	3,5E+02	1,0E+00	7,0E-01	<0,52	
	8-6-2021	56	670	71			5,5E+03	1,2E+03	1,0E+00	6,9E-01	<0,52	
	5-7-2021	83	660	14			1,2E+03	4,5E+02	<0,51		<0,51	
	2-8-2021	112	1100	0			2,2E+02	5,7E+01	<0,515		<0,52	

Tabel 14. Aantallen opportunistische pathogenen in biofilm, bepaald met de qPCR-methode, van het KWR-experiment bij 30°C. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet. De detectielimiet is gegeven. Groene vlakken: de twee rijen die per keer bemonsterd zijn, verschillen significant van elkaar. Het hier gegeven gemiddelde moet daarom met voorzichtigheid worden gebruikt.

	Datum	Dag	qPCR (gk/l)									
			L. pneumophila		L. anisa		A. fumigatus		P. aeruginosa		M. kansasii	
			Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD
Circulatie	13-4-2021	0	2,4E+01	2,3E+01	<12,3		3,1E+03	5,9E+02	4,1E+01	3,8E+01	3,8E+01	2,2E+01
	19-4-2021	6	1,9E+03	1,0E+02	<11,0		5,8E+03	9,3E+02	1,6E+01	7,3E+00	1,0E+02	2,7E+01
	28-4-2021	15	6,6E+04	6,9E+03	7,3E+01	2,6E+00	7,6E+03	1,4E+03	<9,8		2,6E+02	2,3E+02
	11-5-2021	28	8,1E+04	7,3E+03	<13,1		8,6E+03	7,9E+02	<13,1		2,7E+02	2,0E+02
	25-5-2021	42	4,9E+04	1,4E+04	1,2E+01	4,6E+00	5,7E+03	1,6E+03	<14,6		2,0E+02	6,1E+00
	8-6-2021	56	2,6E+04	5,9E+03	<16,2		5,0E+03	3,8E+02	<16,2		1,4E+02	3,8E+01
	5-7-2021	83	1,9E+04	1,5E+03	1,5E+01	9,8E-01	5,1E+03	7,9E+02	<13,1		2,1E+02	5,2E+01
Doorstroming	2-8-2021	112	2,1E+04	1,6E+03	1,2E+03	7,7E+02	2,3E+03	3,3E+02	<15,1		2,7E+02	4,6E+01
	13-4-2021	0	4,0E+01	1,5E+01	2,5E+01	1,2E+01	6,5E+03	2,1E+03	2,2E+01	1,2E+01	1,5E+01	2,8E+00
	19-4-2021	6	1,9E+01	9,1E+00	6,2E+04	5,8E+03	1,3E+04	1,3E+03	1,3E+01	2,5E+00	1,3E+02	5,1E+00
	28-4-2021	15	4,5E+00	1,6E+00	6,1E+05	1,3E+05	6,0E+03	6,5E+02	<9,8		7,6E+01	1,1E+00
	11-5-2021	28	<9,8		6,5E+05	5,6E+04	3,7E+03	6,4E+02	<15,9		5,6E+02	6,1E+02
	25-5-2021	42	<8,7		4,0E+05	3,9E+03	1,5E+03	1,4E+01	<14,6		1,3E+02	4,5E+01
	8-6-2021	56	<10,3		1,2E+05	8,8E+03	1,1E+03	4,4E+01	<17,2		8,7E+01	8,6E+00
	5-7-2021	83	1,3E+01	9,4E+00	2,2E+04	1,2E+03	6,2E+02	2,6E+01	<11,8		1,3E+02	1,3E+02
	2-8-2021	112	1,4E+02	1,8E+02	9,5E+03	6,4E+03	5,0E+02	4,6E+01	<15,7		8,4E+01	1,3E+01

Bijlage IV Resultaten opportunistische pathogenen in PWN-experiment met biofilm

Tabel 15. ATP-gehalte en aantallen opportunistische pathogenen in het uitgaande water, bepaald met kweek, van het experiment 'PWN zonder biofilm' en 'PWN met biofilm'. Gegeven is het resultaat van één meting (N=1). Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet, hierbij is de detectielimiet gegeven. Geen resultaten van *A. fumigatus* op 23-5-2022 beschikbaar i.v.m. storing in de incubatiestoof. Hierdoor kan als resultaat alleen aan- of afwezigheid worden gegeven. Geen resultaten van *P. aeruginosa* op 29-8-2022 beschikbaar i.v.m. gebruik van het verkeerde kweekmedium.

Monstername			ATP (ng/l)		Kweek (kve/l)			
	Datum	Dag	ATP	SD	L. pneumophila	L. anisa	P. aeruginosa	A. fumigatus
1 (PE, 30°C)	10-5-2022	0	6,7	1,6	5,0E+02	<250	10	<100
	17-5-2022	7	5,8	0,2	<250	<2500	3,20E+04	<100
	23-5-2022	14	2,7	0,0	9,0E+03	<250	<10	<100
	7-6-2022	29	3,5	0,3	<250	<250	1,80E+03	<100
	21-6-2022	43	5,6	0,2	1,5E+03	<250	<10	<100
	5-7-2022	57	6,7	1,2	2,0E+03	<250	30	<91
	2-8-2022	85	5,9	1,0	7,5E+03	<2500	570	<100
	29-8-2022	113	5,9	0,4	3,5E+03	<250		<100
2 (RVS, 23°C)	10-5-2022	0	7,2	2,1	<250	<250	<10	100
	17-5-2022	7	6,6	0,7	<2500	<2500	<100	<100
	23-5-2022	14	3,2	0,2	<250	<250	<10	<100
	7-6-2022	29	11	0,6	<2500	<2500	<10	<100
	21-6-2022	43	5,9	0,7	<250	<250	340	<100
	5-7-2022	57	5,8	1,3	<2500	<2500	<10	<91
	2-8-2022	85	6,9	0,4	<2500	<2500	590	<100
	29-8-2022	113	8,5	0,9	<250	<250		<100
3 (EPDM, 23°C)	10-5-2022	0	5,8	0,9	<250	<250	<10	<100
	17-5-2022	7	1100	30	<2500	<2500	<100	<100
	23-5-2022	14	750	18	<2500	<2500	<10	<100
	7-6-2022	29	110	0,3	<2500	<2500	<10	100
	21-6-2022	43	6,1	1,6	<250	<250	190	<100
	5-7-2022	57	6,6	0,4	<2500	<2500	<10	<91
	2-8-2022	85	12	0,7	<2500	<2500	570	<100
	29-8-2022	113	6,2	0,0	<250	<250		<100
4 (RVS, 17°C)	10-5-2022	0	6,5	1,0	<250	<250	<10	<100
	17-5-2022	7	17	2,2	<2500	<2500	<100	2,80E+03
	23-5-2022	14	5,3	0,7	<250	<250	<10	<100
	7-6-2022	29	12	1,5	<250	<250	<10	300
	21-6-2022	43	4,3	0,0	<250	<250	100	<100
	5-7-2022	57	6,5	0,9	<2500	<2500	<10	<91
	2-8-2022	85	6,2	0,3	<2500	<2500	660	<100
	29-8-2022	113	200	6,4	<250	<250		100
5 (EPDM, 17°C)	10-5-2022	0	6	0,3	<250	<250	<10	<100
	17-5-2022	7	650	19	<2500	<2500	<100	<100
	23-5-2022	14	1200	7	<250	<250	500	<100
	7-6-2022	29	6,9	1,0	<2500	<2500	<10	<100
	21-6-2022	43	9,2	0,4	<250	<250	360	<100
	5-7-2022	57	7,6	0,4	<250	<250	<10	<91
	2-8-2022	85	7,4	0,3	<2500	<2500	670	<100
	29-8-2022	113	7,5	0,7	<250	<250		<100

Tabel 16. Concentratie opportunistische pathogenen in het water, bepaald met de qPCR, van beide PWN-experimenten. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet. De detectielimiet is gegeven.

	Monstername		qPCR (gk/l)				
	Datum	Dag	L. pneumophila	L. anisa	A. fumigatus	P. aeruginosa	M. kansasii
1 (PE, 30°C)	10-5-2022	0	<1900	<3200	<3200	<3200	<5600
	17-5-2022	7	1,6E+06	<6300	5,7E+04	3,6E+05	<6300
	23-5-2022	14	2,6E+05	<1700	<1700	5,7E+03	<1700
	7-6-2022	29	3,7E+03	<740	<740	2,9E+03	<1300
	21-6-2022	43	3,6E+03	<500	<500	<500	<870
	5-7-2022	57	3,2E+06	<1800	6,3E+04	<1800	2,6E+04
	2-8-2022	85	1,1E+04	<3500	<3500	<3500	<6200
	29-8-2022	113	1,0E+04	<3200	<3200	<3200	<5600
2 (RVS, 23°C)	10-5-2022	0	<1600	<2700	<2700	<2700	<4800
	17-5-2022	7	<4500	<7400	3,2E+04	<7400	<7400
	23-5-2022	14	6,7E+03	<3000	<3000	<3000	<3000
	7-6-2022	29	9,8E+02	<860	1,4E+03	<860	<1500
	21-6-2022	43	<310	<510	<510	<510	<900
	5-7-2022	57	<510	<840	<840	<840	<1500
	2-8-2022	85	<710	<1200	<1200	<1200	<2100
	29-8-2022	113	<2100	<3500	<3500	<3500	<6200
3 (EPDM, 23°C)	10-5-2022	0	<2700	<4500	<4500	<4500	<7900
	17-5-2022	7	2,8E+04	<5400	6,3E+04	<5400	9,7E+03
	23-5-2022	14	3,4E+04	2,6E+04	<1700	<1700	4,7E+03
	7-6-2022	29	<280	<470	3,3E+04	<470	3,5E+03
	21-6-2022	43	<450	<750	<750	<750	<1300
	5-7-2022	57	<350	<580	<580	<580	<1000
	2-8-2022	85	<760	<1300	<1300	<1300	<2200
	29-8-2022	113	<4900	<8200	<8200	<8200	<15000
4 (RVS, 17°C)	10-5-2022	0	<1600	<2600	<2600	<2600	<4500
	17-5-2022	7	2,4E+04	<6300	5,4E+06	<6300	3,2E+04
	23-5-2022	14	7,6E+03	<1200	3,7E+04	<1200	4,3E+03
	7-6-2022	29	<260	<430	8,0E+04	<430	1,9E+03
	21-6-2022	43	<330	<540	<540	<540	<960
	5-7-2022	57	<1200	<2000	<2000	<2000	<3500
	2-8-2022	85	<1400	<2300	<2300	<2300	<4000
	29-8-2022	113	<7900	<13000	1,0E+05	<13000	<23000
5 (EPDM, 17°C)	10-5-2022	0	<2200	<3700	<3700	<3700	<6500
	17-5-2022	7	5,8E+04	3,8E+04	2,7E+05	<5700	4,3E+04
	23-5-2022	14	5,2E+04	1,1E+05	<1200	<1200	<1200
	7-6-2022	29	<320	<530	1,4E+03	<530	<930
	21-6-2022	43	<290	<490	<490	<490	<860
	5-7-2022	57	<1000	<1700	<1700	<1700	<3000
	2-8-2022	85	<1600	<2700	<2700	<2700	<4800
	29-8-2022	113	<1400	<2400	<2400	<2400	<4200

Tabel 17. ATP-concentratie en aantallen opportunistische pathogenen in de biofilm, bepaald met de kweekmethode, van het experiment 'PWN met biofilm'. Gegeven is het gemiddelde van twee rijen (N=2) met SD. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet. De detectielimiet is gegeven. Groene vlakken: de twee rijen die per keer bemonsterd zijn, verschillen significant van elkaar. Het hier gegeven gemiddelde moet daarom met voorzichtigheid worden gebruikt. In bijlage XXX zijn de resultaten van de afzonderlijke rijen gegeven. Geen resultaten van *A. fumigatus* op 23-5-2022 beschikbaar i.v.m. storing in de incubatiestoof. Hierdoor kan als resultaat alleen aan- of afwezigheid worden gegeven. Geen resultaten van *P. aeruginosa* op 29-8-2022 beschikbaar i.v.m. gebruik van het verkeerde kweekmedium.

	Monstername				Kweek (kve/cm2)							
			ATP (pg/cm2)		L. pneumophila		L. anisa		P. aeruginosa		A. fumigatus	
	Datum	Dag	ATP	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD
1 (PE, 30°C)	10-5-2022	0	340	14	1,7E+03	2,2E+03	<91,5		<0,5		1,5	0,71
	17-5-2022	7	215	7,1	9,4E+03	2,8E+02	<2,5		2,0	0,00	1,8	0,35
	23-5-2022	14	215	21	6,1E+03	6,4E+02	<25		0,5	0,00		
	7-6-2022	29	600	71	6,4E+03	1,5E+03	<25		0,5	0,00	2,0	0,71
	21-6-2022	43	640	42	8,9E+03	5,8E+03	<2,5		<0,5		0,8	0,35
	5-7-2022	57	1045	78	1,4E+04	7,7E+03	<2,5		<0,5		2,8	1,91
	2-8-2022	85	1400	424	1,1E+04	1,1E+04	<683		1,3	1,06	1,5	1,41
	29-8-2022	113	2100	566	1,3E+04	5,2E+03	<2,5				0,8	0,35
2 (RVS, 23°C)	10-5-2022	0	<5,2		<8,6		<8,6		<0,5		<0,5	
	17-5-2022	7	43	5,7	<17		<17		<0,5		0,5	0,00
	23-5-2022	14	38	3,5	<17		<17		<0,5			
	7-6-2022	29	8	3,3	<17		<17		<0,5		<0,5	
	21-6-2022	43	22	4,2	2,2E+01	6,4E+00	<21,5		<0,5		0,5	0,00
	5-7-2022	57	32	15	<170		<170		<0,5		0,7	0,33
	2-8-2022	85	79	73	<17		<17		<0,5		0,5	0,01
	29-8-2022	113	935	658	<170		<170				0,5	0,00
3 (EPDM, 23°C)	10-5-2022	0	10	4,9	<17		<17		<0,5		<0,5	
	17-5-2022	7	655	191	<88		<88		<0,5		<0,5	
	23-5-2022	14	8500	707	<880		<880		<0,5		<0,5	
	7-6-2022	29	640	368	<88		<88		<0,5			
	21-6-2022	43	7600	2828	<160		<160		<0,5		0,5	0,00
	5-7-2022	57	25000	12728	<1650		<1650		<0,5		<0,5	
	2-8-2022	85	58500	20506	<16		<16		0,5	0,01	<0,5	
	29-8-2022	113	77500	16263	<160		<160				<0,5	
4 (RVS, 17°C)	10-5-2022	0	260	71	<17		<17		<0,5		15,6	13,29
	17-5-2022	7	175	21	<17		<17		<0,5		23,4	23,55
	23-5-2022	14	190	0	<17		<17		<0,5			
	7-6-2022	29	345	35	<17		<17		<0,5		13,1	12,66
	21-6-2022	43	390	28	<93,5		<93,5		<0,5		9,6	7,71
	5-7-2022	57	600	71	<93,5		<93,5		<0,5		9,6	4,88
	2-8-2022	85	725	92	<17		<17		0,5	0,00	6,3	5,23
	29-8-2022	113	730	170	<170		<170				6,1	5,59
5 (EPDM, 17°C)	10-5-2022	0	25500	2121	<170		<170		<0,5		<0,5	
	17-5-2022	7	3150	1061	<1700		<1700		<0,5		1,8	0,35
	23-5-2022	14	8850	495	<1700		<1700		<0,5			
	7-6-2022	29	18500	707	<170		<170		<0,5		0,8	0,35
	21-6-2022	43	33500	3536	<1700		<1700		2,0	1,41	1,0	0,71
	5-7-2022	57	36000	8485	1,4E+04	1,7E+04	<863		<0,5		0,5	0,00
	2-8-2022	85	38500	9192	<17		<17		36,5	6,36	0,5	0,01
	29-8-2022	113	44500	10607	<170		<170				<0,5	

Tabel 18. Aantallen opportunistische pathogenen in de biofilm, bepaald met de qPCR, van het experiment 'PWN met biofilm'. Gegeven is het gemiddelde van twee rijen (N=2) met SD. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet. De detectielimiet is gegeven. Groene vlakken: de twee rijen die per keer bemonsterd zijn, verschillen significant van elkaar. Het hier gegeven gemiddelde moet daarom met voorzichtigheid worden gebruikt. In bijlage XXX zijn de resultaten van de afzonderlijke rijen gegeven. Blauwe vlakken: getallen zijn indicatief.

	Monstername		qPCR (gk/cm2)									
			L. pneumophila		L. anisa		A. fumigatus		P. aeruginosa		M. kansasii	
	Datum	Dag	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD
1 (PE, 30°C)	10-5-2022	0	1,5E+03	1,1E+03	<8,4		2,1E+02	1,5E+02	<8,4		1,8E+01	5,4E+00
	17-5-2022	7	1,2E+04	6,2E+02	1,2E+02	7,4E+01	8,8E+02	1,8E+02	8,9E+01	1,9E+01	1,5E+02	5,2E+01
	23-5-2022	14	1,4E+04	4,6E+03	1,8E+02	1,7E+02	1,1E+03	6,3E+02	6,5E+01	9,4E+00	1,0E+02	9,7E+01
	7-6-2022	29	4,6E+03	1,9E+02	<6,3		6,1E+02	9,2E+01	3,7E+00	3,4E+00	7,2E+01	1,8E+01
	21-6-2022	43	6,1E+03	3,5E+03	1,4E+03	6,8E+02	2,2E+02	6,7E+01	<7,6		9,0E+01	8,8E+00
	5-7-2022	57	3,9E+03	5,3E+03	<9,9		1,8E+02	2,4E+02	<9,9		7,7E+01	8,3E+01
	2-8-2022	85	1,1E+04	7,6E+03	<14,9		3,3E+02	1,2E+02	<15,0		4,6E+02	3,0E+02
	29-8-2022	113	1,0E+04	2,4E+03	<20,3		4,0E+02	3,2E+01	<20,3		4,8E+03	6,6E+03
2 (RVS, 23°C)	10-5-2022	0	<7,5		<12,7		8,2E+01	3,4E+01	<12,7		2,3E+01	2,2E+00
	17-5-2022	7	<19,6		<32,6		5,0E+02	2,1E+01	<32,6		4,1E+01	3,3E+00
	23-5-2022	14	1,4E+01	1,2E+00	<16,0		5,2E+02	2,7E+02	<16,0		6,4E+01	1,3E+01
	7-6-2022	29	<5,9		<10,1		1,1E+02	1,5E+01	<10,1		3,9E+01	1,1E+01
	21-6-2022	43	<5,4		<8,8		2,7E+01	6,6E+00	<8,8		2,4E+01	1,2E+01
	5-7-2022	57	<7,2		<12,4		3,6E+01	3,7E+01	<12,4		2,9E+01	1,1E+01
	2-8-2022	85	<9,8		<16,0		2,1E+01	7,3E+00	<16,0		2,7E+01	1,9E+00
	29-8-2022	113	2,0E+02	2,7E+02	<19,9		7,6E+01	7,8E+01	<19,9		3,0E+01	8,3E+00
3 (EPDM, 23°C)	10-5-2022	0	<10,8		<18,0		5,1E+02	3,9E+01	<18,0		7,3E+01	2,7E+01
	17-5-2022	7	1,8E+01	1,1E+00	<29,6		3,5E+03	2,0E+03	<29,6		1,2E+02	4,5E+01
	23-5-2022	14	<25,6		<41,8		2,4E+03	8,8E+02	<41,8		3,4E+02	2,5E+02
	7-6-2022	29	<21,5		<35,8		2,6E+02	1,9E+02	<35,8		<62,6	
	21-6-2022	43	<37,3		<63,9		1,4E+02	6,0E+01	<63,9		<110	
	5-7-2022	57	<23,5		<39,3		1,4E+02	1,3E+02	<39,3		<67,6	
	2-8-2022	85	<45,6		<75,1		3,7E+02	1,7E+01	<75,1		<133	
	29-8-2022	113	<66,4		<95,2		2,2E+02	1,9E+02	<95,2		<165	
4 (RVS, 17°C)	10-5-2022	0	<6,2		<10,6		4,0E+03	3,3E+03	<10,6		3,3E+01	3,6E+00
	17-5-2022	7	<18,6		<31,3		6,7E+03	6,6E+03	<31,3		9,0E+01	8,0E+00
	23-5-2022	14	1,7E+01	1,1E+01	<16,8		5,5E+03	2,7E+03	2,4E+01	8,3E+00	9,8E+01	1,6E+01
	7-6-2022	29	<5,7		<9,3		2,1E+03	2,1E+03	<9,3		3,7E+01	2,3E+01
	21-6-2022	43	<5,9		<9,8		1,3E+03	1,1E+03	<9,8		2,4E+01	1,2E+01
	5-7-2022	57	<6,2		<10,6		2,6E+03	2,1E+03	<10,6		4,1E+01	2,4E+01
	2-8-2022	85	<8,5		<14,5		1,5E+03	1,7E+03	<14,5		2,0E+01	4,4E+00
	29-8-2022	113	<9,3		<15,0		1,3E+03	1,1E+03	<15,0		2,7E+01	3,7E-01
5 (EPDM, 17°C)	10-5-2022	0	<21,3		<35,8		8,3E+02	2,1E+01	<35,8		1,1E+02	5,0E+01
	17-5-2022	7	4,0E+01	2,4E+01	2,9E+02	7,6E+01	7,5E+03	4,4E+02	<33,3		5,4E+02	2,0E+02
	23-5-2022	14	5,7E+01	3,7E+01	3,3E+02	9,0E+01	5,8E+03	2,7E+03	<36,1		4,1E+02	1,3E+02
	7-6-2022	29	2,4E+01	5,2E+00	6,6E+01	3,7E+01	1,2E+03	1,8E+02	<36,1		1,9E+02	6,2E+01
	21-6-2022	43	2,9E+01	1,3E+01	<35,6		2,5E+02	1,0E-01	<35,6		1,7E+02	5,2E+01
	5-7-2022	57	2,7E+01	5,5E+00	<44,3		4,0E+02	2,1E+02	<44,3		9,9E+01	1,2E+01
	2-8-2022	85	3,5E+01	1,1E+00	<55,1		3,0E+02	3,0E+02	<55,1		1,0E+02	1,5E+00
	29-8-2022	113	<54,9		<90,2		6,9E+02	7,1E+02	<90,2		<160	2,1E+01

Bijlage V Resultaten opportunistische pathogenen in PWN-experiment zonder biofilm van

Tabel 19. ATP-concentratie en aantallen opportunistische pathogenen in biofilm, bepaald met kweek, van het experiment 'PWN zonder biofilm'. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet, hierbij is de detectielimiet gegeven. Geen resultaten van *A. fumigatus* op 23-5-2022 beschikbaar i.v.m. storing in de incubatiestoof. Hierdoor kan als resultaat alleen aan- of afwezigheid worden gegeven. Geen resultaten van *P. aeruginosa* op 29-8-2022 beschikbaar i.v.m. gebruik van het verkeerde kweekmedium.

	Monsternamen		ATP		Kweek (kve/cm2)							
					L. pneumophila		L. anisa		A. fumigatus		P. aeruginosa	
	Datum	Dag	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD
1 (PE, 30°C)	17-5-2022	7	290	42	6,4E+03	2,5E+03	<6350		1,5	1,41	1,0E+00	7,0E-01
	23-5-2022	14	215	64	3,3E+03	4,5E+03	<3335				7,5E-01	3,5E-01
	21-6-2022	43	550	71	6,6E+03	2,1E+03	<6600		1,8	0,35	<0,51	
2 (RVS, 23°C)	17-5-2022	7	105	7	<17		<17		0,5	0,00	<0,52	
	23-5-2022	14	94	37	<13		<13				<0,52	
	21-6-2022	43	61	1	<21,5		<21,5		<0,65		<0,65	
3 (EPDM, 23°C)	17-5-2022	7	460	14	<17		<17		<0,52		<0,52	
	23-5-2022	14	27000	5657	<170		<170				<0,52	
	21-6-2022	43	14000	2828	<16,5		<16,5		<0,50		2,9E+00	3,5E+00
4 (RVS, 17°C)	17-5-2022	7	135	7	<170		<170		86,0	48,08	<0,52	
	23-5-2022	14	135	7	<13		<13				<0,52	
	21-6-2022	43	270	85	<17		<17		76,0	31,11	<0,52	
5 (EPDM, 17°C)	17-5-2022	7	970	184	<170		<170		<0,76		5,0E+00	6,3E+00
	23-5-2022	14	68500	2121	<17		<17				<0,515	
	21-6-2022	43	24000	9899	<93,5		<93,5		<0,51		6,5E+01	9,2E+01

Tabel 20. Aantallen opportunistische pathogenen in biofilm, bepaald met qPCR, van het experiment 'PWN zonder biofilm'. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD. Rode getallen: resultaat onder de detectielimiet, hierbij is de detectielimiet gegeven. Blauwe vlakken: getallen zijn indicatief.

	Monsternamen		qPCR (gk/cm2)									
			L. pneumophila		L. anisa		A. fumigatus		P. aeruginosa		M. kansasii	
	Datum	Dag	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD	Gem.	SD
1 (PE, 30°C)	17-5-2022	7	5,7E+03	7,7E+02	47462732		5,8E+02	4,5E+01	1,6E+01	2,7E+00	7,1E+01	6,2E+01
	23-5-2022	14	4,2E+03	1,4E+03	1,2E+01	9,3E+00	2,5E+02	2,3E+01	2,2E+01	5,1E+00	3,4E+01	1,8E+00
	21-6-2022	43	4,1E+03	1,1E+03	2,8E+02	1,3E+02	1,5E+02	1,6E+01	<9,4		1,1E+02	3,7E+00
2 (RVS, 23°C)	17-5-2022	7	<7,5		<12,2		5,7E+02	1,7E+02	<12,2		2,4E+01	6,5E+00
	23-5-2022	14	<8,4		<13,7		9,0E+01	3,7E+01	<13,7		3,3E+01	3,1E+00
	21-6-2022	43	<6,0		<10,1		2,5E+01	9,6E+00	<10,1		<17,6	
3 (EPDM, 23°C)	17-5-2022	7	<15,3		<25,0		2,6E+02	4,6E+01	<25,0		<44,3	
	23-5-2022	14	<7,5		<12,3		1,4E+02	1,8E+02	<12,3		<22,0	
	21-6-2022	43	<18,0		<29,8		4,0E+01	1,2E+01	<29,8		<52,4	
4 (RVS, 17°C)	17-5-2022	7	<7,5		<12,2		1,5E+04	6,6E+03	<12,2		2,5E+01	5,8E+00
	23-5-2022	14	<5,0		<8,5		7,7E+03	1,8E+03	<8,5		<15,0	
	21-6-2022	43	<9,6		<16,0		1,1E+04	2,0E+03	<16,0		<27,7	
5 (EPDM, 17°C)	17-5-2022	7	9,7E+00	3,8E+00	<12,8		1,4E+03	6,8E+02	<12,8		6,4E+01	4,7E+01
	23-5-2022	14	1,1E+01	1,1E+00	<17,0		5,4E+02	2,6E+01	<17,0		<30,3	
	21-6-2022	43	<22,3		<37,3		1,1E+02	8,9E+01	<37,3		<65,1	

Adres

Princetonlaan 6
3584 CB Utrecht

Postadres

Postbus 80015
3508 TA Utrecht

Telefoon

088 866 42 56

E-mail

contact@warmingup.info

Website

www.warmingup.info