



Bart Wullings, KWR Watercycle Research Institute

Harm Veenendaal, KWR Watercycle Research Institute

Dick van der Kooij, KWR Watercycle Research Institute

Legionella pneumophila komt sporadisch voor in Nederlands oppervlaktewater

Legionella pneumophila werd slechts incidenteel aangetroffen bij een onderzoek van 14 verschillende oppervlaktewaterlocaties in het voorjaar en zomer van 2007. Bij dit onderzoek werd de recent ontwikkelde Q-PCR-methode toegepast. De relatief lage watertemperatuur (maximaal 21°C) in de periode van onderzoek verhinderde waarschijnlijk de groei van *L. pneumophila*. In het Veluwemeer bij Harderwijk werd *L. pneumophila* echter steeds in hoge concentraties waargenomen. Het effluent van de rwzi van Harderwijk bleek de oorzaak. Verder onderzoek is nodig naar de temperatuur waarbij *L. pneumophila* zich kan vermeerderen in oppervlaktewater en de herkomst van *L. pneumophila* in het effluent van rwzi's.

De rol van *Legionella pneumophila* bij het veroorzaken van legionellapneumonie ('veteranen-ziekte') is alom bekend. Besmetting kan optreden na inademing van aerosolen met *L. pneumophila*. Dit organisme kan zich vermeerderen in leidingwater bij temperaturen tussen 25 en 43°C. Daarom is wettelijk voorgeschreven dat leidingwater van collectieve leidingwaterinstallaties periodiek wordt onderzocht met een gestandaardiseerde kweekmethode op de aanwezigheid van legionellabacteriën¹⁾. Ook drinkwater moet na productie en bij distributie periodiek worden geanalyseerd en het aantal kweekbare legionellabacteriën moet kleiner zijn dan 100 kolonievormende eenheden (kve) per liter. Legionellabacteriën kunnen ook aanwezig zijn in koeltorens en in bepaalde typen proceswater, maar periodiek onderzoek is niet voorgeschreven. Oppervlaktewater wordt gebruikt voor de bereiding van drinkwater en als koelwater; over de aanwezigheid van *L. pneumophila* in Nederlands oppervlaktewater is echter weinig bekend²⁾. Onderzoek van oppervlaktewater is moeilijk uitvoerbaar omdat de aanwezigheid van veel andere bacteriën de analyse met de gangbare kweekmethode verstoort. Met moleculaire technieken, gebaseerd op de PCR-reactie, is dergelijk onderzoek wel mogelijk. Met behulp van een moleculaire methode is aangetoond dat niet- kweekbare legionellabacteriën, die meestal behoorden tot

nog niet beschreven soorten, algemeen voorkomen in het oppervlaktewater in Nederland in concentraties van 10⁴ tot maximaal 10⁶ DNA-kopieën per liter³⁾. *L. pneumophila* werd echter niet

waargenomen bij dit onderzoek, dat is uitgevoerd in een periode met lage watertemperaturen (<10°C). In de Verenigde Staten en Puerto Rico is de bacterie met behulp van microscopische technieken en

De Q-PCR-methode is gebaseerd op de polymerase kettingreactie (PCR), waarin in korte tijd met behulp van een enzymatische reactie en onder invloed van temperatuurwisselingen (cycli) een specifiek DNA-fragment tot hoge aantallen kan worden vermenigvuldigd. Voor de vermenigvuldiging van dit DNA-fragment worden korte synthetische DNA-moleculen (primers) gebruikt. De basenvolgorde in deze primers is zodanig gekozen dat deze primers selectief binden aan het DNA van het te detecteren organisme. Na deze binding komt een enzymatische kettingreactie op gang en wordt het DNA-fragment tussen de primers tijdens elke temperatuurcyclus vermenigvuldigd. Bij Real-time PCR wordt bij elke temperatuurcyclus de vorming van het vermenigvuldigde DNA gemeten door gebruik te maken van een synthetische DNA-probe, gelabeld met een fluorescente kleurstof. De fluorescentie treedt pas op nadat het DNA is gevormd. Er is een duidelijk verband tussen de oorspronkelijke DNA-concentratie van *L. pneumophila* en het aantal verdubbingscycli dat nodig is om een DNA-signaal boven de detectiegrens uit te laten komen (C_T-waarde). Op basis van de CT-waarde en een referentielijn met bekende DNA-concentraties kan de oorspronkelijke DNA-concentratie worden bepaald. In elke legionellabacterie is het gedetecteerde specifieke DNA-fragment in één kopie aanwezig, waardoor de concentratie DNA-kopieën gelijk gesteld kan worden aan het aantal legionellabacteriën. De Q-PCR-methode met een interne controle is bij KWR ontwikkeld en gevalideerd en zal dit voorjaar worden gepubliceerd als ontwerp NEN 6254.

L. pneumophila en het aantal verdubbingscycli dat nodig is om een DNA-signaal boven de detectiegrens uit te laten komen (C_T-waarde). Op basis van de CT-waarde en een referentielijn met bekende DNA-concentraties kan de oorspronkelijke DNA-concentratie worden bepaald. In elke legionellabacterie is het gedetecteerde specifieke DNA-fragment in één kopie aanwezig, waardoor de concentratie DNA-kopieën gelijk gesteld kan worden aan het aantal legionellabacteriën. De Q-PCR-methode met een interne controle is bij KWR ontwikkeld en gevalideerd en zal dit voorjaar worden gepubliceerd als ontwerp NEN 6254.

fluorescerende antilichamen in vrijwel alle onderzochte meren en rivieren aangetoond in concentraties van 10^4 tot 10^8 bacteriën per liter^{4,5}). De temperatuur van het onderzochte oppervlaktewater was relatief hoog door een hoge omgevingstemperatuur (Puerto Rico) en door warmwaterlozingen van elektriciteitscentrales (Verenigde Staten). De watertemperatuur is waarschijnlijk de bepalende factor voor de groei van *L. pneumophila* in oppervlaktewater. Bovendien kan de bacterie lang overleven in water bij lage temperaturen, zonder dat vermeerdering optreedt.

In Nederland stijgt de oppervlaktewatertemperatuur in de zomer soms tot boven 25°C. In de zomer van 2006 werd in de Rijn bij Lobith een maximumtemperatuur van 27,5°C geregistreerd. Recent is een gevalideerde Q-PCR-methode beschikbaar gekomen voor de kwantitatieve detectie van *L. pneumophila* in water⁶). Deze methode is toegepast om de aanwezigheid van *L. pneumophila* te analyseren in enkele rivieren en meren, waaronder locaties voor inname van water voor de drinkwaterbereiding, in de periode van april tot september 2007. Doelen van dit onderzoek waren: bepalen in welke mate¹) *L. pneumophila* aanwezig is in diverse typen oppervlaktewater en nagaan of de watertemperatuur hierop van invloed is. Bij dit onderzoek zijn tevens analyses uitgevoerd van het totale aantal legionellabacteriën en van *Legionella anisa*. *L. anisa* wordt relatief vaak met de kweekmethode aangetoond in leidingwater, maar dit organisme is vrijwel niet ziekteverwekkend voor de mens⁷).

Opzet van het onderzoek

In de lente en in de zomer van 2007 is het water van twaalf oppervlaktewaterlocaties onderzocht (zie tabel 1). Mogelijke seizoensinvloeden zijn bepaald door elke locatie vijfmaal te analyseren (in april, mei, juli, augustus en september). Analyses met Q-PCR-methoden voor de detectie van alle

Legionella-soorten en voor *L. anisa* zijn alleen uitgevoerd in water bemonsterd in april (laagste temperatuur) en in juli (hoogste temperatuur). Van elk watermonster is de temperatuur gemeten en zijn de concentraties bepaald van actieve biomassa (ATP) en van chlorofyl-a. Naar aanleiding van de meetresultaten is in januari 2008 ook het effluent van zes rwzi's en het water van drie locaties aan het Veluwemeer onderzocht.

L. pneumophila is slechts enkele malen waargenomen in de verschillende typen oppervlaktewater, in een concentratie net boven de detectiegrens van 600 DNA-kopieën per liter (zie tabel). Een uitzondering hierop vormen de resultaten van de watermonsters afkomstig uit het Veluwemeer bij Harderwijk. Bij deze locatie is *L. pneumophila* steeds aangetoond in relatief hoge concentraties (tot $3,8 \times 10^5$ DNA-kopieën per liter). Analyse van de concentratie van legionellasoorten bevestigde eerdere waarnemingen dat deze bacteriën overall algemeen voorkomen in het oppervlaktewater in Nederland³). *L. anisa* is echter niet aangetroffen. Uit tabel 1 blijkt dat de aanwezigheid van *L. pneumophila* in het Veluwemeer bij Harderwijk niet het gevolg is van een afwijkende watertemperatuur of van verhoogde concentraties van ATP en/of chlorofyl-a. Een verklaring voor deze aanwezigheid bracht Google Earth. De luchtfoto op de volgende pagina laat duidelijk de waterstroom zien van het effluent van de rwzi te Harderwijk. De bemonstering van het water van het Veluwemeer bleek te hebben plaatsgevonden in deze stroom. In januari 2008 is het effluent van de rwzi van Harderwijk onderzocht op de aanwezigheid van *L. pneumophila*. Tevens is het effluent van een vijftal andere rwzi's onderzocht (zie tabel 2). Bij vier van de zes rwzi's is *L. pneumophila* in het effluent aangetroffen. De concentratie in het effluent van

Harderwijk ($2,2 \times 10^6$ DNA-kopieën per liter) was veruit het hoogste en een factor 10 hoger dan in het water van het Veluwemeer op de locatie weergegeven in de foto op de volgende pagina.

Invlod temperatuur

Uit het onderzoek komt naar voren dat *L. pneumophila* in de lente en in de zomer van 2007 vrijwel niet in aantoonbare mate aanwezig was in het onderzochte oppervlaktewater. De watertemperatuur op de bemonsterde locaties was maximaal 21°C. Bij deze temperatuur kunnen niet-kweekbare legionellasoorten goed groeien. Kennelijk zijn *L. pneumophila* en *L. anisa* niet in staat om zich bij deze temperatuur in het water te vermeerderen, ondanks de aanwezigheid van algen en bacteriën die de groei van protozoa bevorderen. In de zomer van 2007 werd in de Rijn bij Lobith een maximum watertemperatuur van 23°C geregistreerd⁸).

Tabel 2: Legionella pneumophila in effluent van rwzi bepaald met de Q-PCR-methode. Datum bemonstering 12 januari 2008. De Q-PCR-resultaten gecorrigeerd met rendement van interne controle.

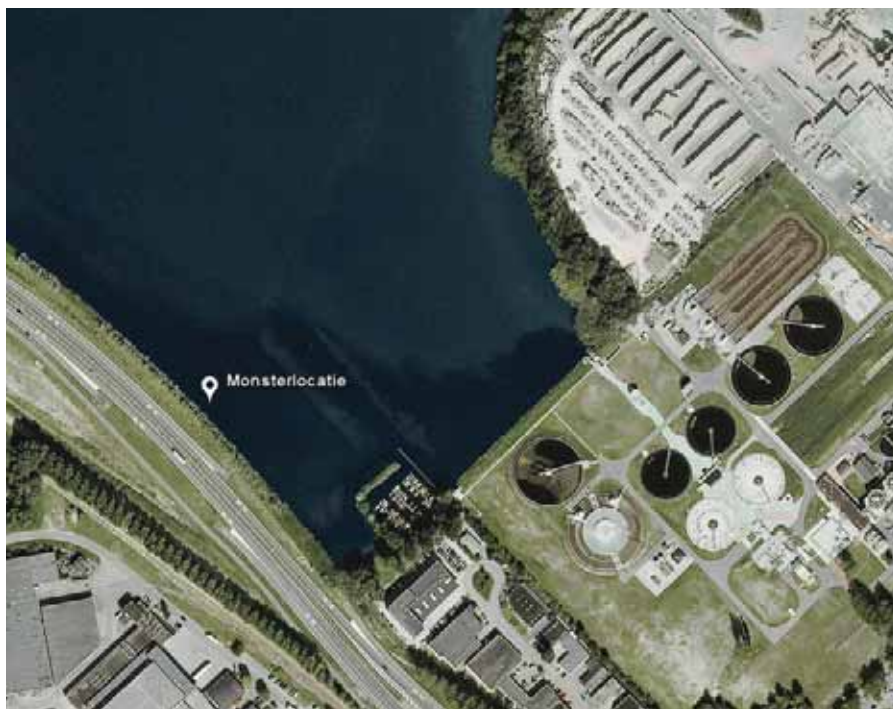
rwzi	<i>L. pneumophila</i> (n mip DNA kopieën/l)
Arnhem	$<7,7 \times 10^2$
Ede	$5,0 \times 10^5$
Harderwijk	$2,2 \times 10^{6a)}$
Houten	$8,4 \times 10^{2b)}$
Nijmegen	$<7,2 \times 10^2$
IJsselstein	$1,4 \times 10^4$

a) Concentratie *L. pneumophila* is indicatief door zeer laag aantal DNA kopieën aangetoond in PCR.
b) Concentratie *L. pneumophila* indicatief door (te) laag rendement van de interne controle.

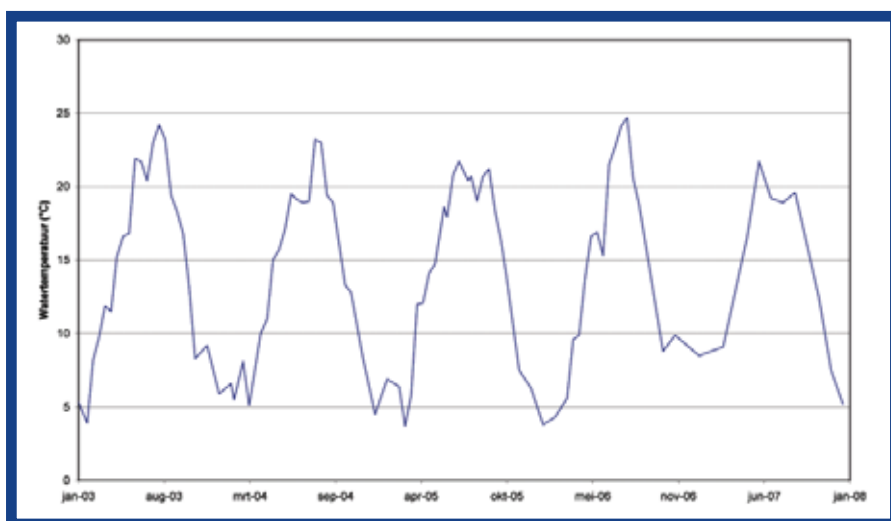
Tabel 1: Legionella pneumophila in oppervlaktewater bepaald met de Q-PCR methode.

oppervlaktewater	analyses temperatuur (°C)	chlorofyl (µg/l)	ATP (ng/l)	<i>Legionella</i> spp. (n DNA kopieën/l) ^{3),5)}	<i>L. pneumophila</i> (n mip DNA kopieën/l) ⁵⁾
Maas, Keizersveer	12,7 - 20,3	3,0 - 16,0	161 - 343	$5,5 \times 10^5, 9,1 \times 10^5$	$<6 \times 10^2$
Waal, Nijmegen	13,5 - 21,0	$<2 - 12,0$	130 - 343	$1,0 \times 10^6, 3,6 \times 10^5$	$<6 \times 10^2 - 2,2 \times 10^{32)}$
Lekkanaal	13,1 - 20,4	2,0 - 11,0	107 - 225	$1,4 \times 10^6, 1,6 \times 10^5$	$<6 \times 10^2$
IJssel	13,0 - 21,0	$<2 - 9,0$	98 - 206	$1,3 \times 10^6, 3,3 \times 10^5$	$<6 \times 10^2$
Renkumse beek	12,1 - 14,8	<2	46 - 314	$2,0 \times 10^6, 6,3 \times 10^6$	$<6 \times 10^2$
Heelsumse beek	11,9 - 17,9	$<2 - 14,0$	66 - 397	$3,6 \times 10^6, 1,3 \times 10^7$	$<6 \times 10^2$
IJsselmeer	11,2 - 19,4	34,0 - 57,0	561 - 1569	$3,5 \times 10^5, 9,1 \times 10^6$	$<6 \times 10^2$
Loosdrechtse Plassen	12,9 - 19,6	15,0 - 22,0	471 - 1509	$9,7 \times 10^5, 4,6 \times 10^6$	$<6 \times 10^2$
Randmeer Harderwijk	6,2 - 19,9	17,0 - 25,0	584 - 1012	$2,3 \times 10^6, 2,8 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4 - 3,8 \times 10^5$
Randmeer Strand Nulde ⁴⁾	4,6 - 19,0	8,0 - 12,0	465 - 954	$7,1 \times 10^5$	$<6 \times 10^2 - 1,6 \times 10^3$
Randmeer Huizen ⁴⁾	5,6 - 19,6	11,0 - 27,0	179 - 579	$2,6 \times 10^5$	$<6 \times 10^2$
Bufferbak Weesperkarspel ¹⁾	10,9 - 19,7	<2	12 - 16	$1,7 \times 10^6, 3,9 \times 10^5$	$<6 \times 10^2$
Oranjekom Leiduin ¹⁾	14,1 - 18,4	6,0 - 25,0	337 - 929	$2,8 \times 10^5, 7,9 \times 10^5$	$<6 \times 10^2$
Verzamelkom Andijk ¹⁾	10,0 - 19,0	18,0 - 45,0	370 - 659	$9,4 \times 10^5, 9,4 \times 10^6$	$<6 \times 10^2$

1) opvangbassin van oppervlaktewater voor bereiding van drinkwater
2) monster van 31 mei 2007
3) monsters genomen in respectievelijk april en juli 2007
4) Watermonsters van de locaties Randmeer strand Nulde en Huizen zijn bemonsterd in januari 2008.
5) Q-PCR-resultaten gecorrigeerd met rendement van interne controle



Opname (Google Earth) van de RWZI van Harderwijk met de effluentstroom in het Veluwemeer en de locatie van bemonstering



Afb. 2: Temperatuur van de Maas bij Keizersveer van 2003 tot begin 2008 (bron: Rijkswaterstaat).

Deze temperatuur ligt beneden het niveau waarbij groei van *L. pneumophila* kan optreden in water en is waarschijnlijk ook te laag voor *L. anisa*, die zich kan vermeerderen in leidingwaterinstallaties bij temperaturen van ongeveer 25°C⁹⁾. In de VS werd *L. pneumophila* wel aangetroffen in het water van meren bij temperaturen beneden 20°C⁴⁾. Deze aanwezigheid kan worden toegeschreven aan overleving na groei in de zomerperiode en/of groei in het warme koelwater, in combinatie met geen of een geringe waterafvoer. Onbekend is of *L. pneumophila* aanwezig is in warm koelwater dat op de Rijn of de Maas wordt geloosd, maar indien dit al het geval was dan leidde dit niet tot aantoonbare concentraties in het rivierwater. De temperatuur van het oppervlaktewater in Puerto Rico is bijna het gehele jaar boven 25°C en bereikt niveaus tot boven 30°C⁵⁾. Bij deze temperaturen kan *L. pneumophila* zich vermeerderen. Het oppervlaktewater in Puerto Rico was

op alle onderzochte locaties echter sterk verontreinigd met afvalwater. Hierdoor is onduidelijk in welke mate de aanwezigheid van *L. pneumophila* een gevolg is van groei en/of overleving in het oppervlaktewater. In de zomer van 2006 bereikte het water van de Rijn bij Lobith een maximum temperatuur van bijna 28°C en werd een temperatuur van 25°C gedurende 30 dagen overschreden⁸⁾. Ook de temperatuur van het Maaswater dat bij Keizersveer werd ingenomen voor behandeling tot drinkwater bereikte in de zomermaanden bijna 25°C (afbeelding 2). Door de klimaatverandering zal de wassertemperatuur waarschijnlijk verder stijgen, met als mogelijk gevolg de aanwezigheid van *L. pneumophila* in het oppervlaktewater. Bij aerosolvorming bij bepaalde vormen van watergebruik of bij de behandeling van water voor de drinkwaterbereiding bestaat dan een risico op besmetting met *L. pneumophila*. Een mogelijk groter nadeel van de opwarming is een stijging van de temperatuur van het

water in het leidingnet tot boven 25°C. Onder welke omstandigheden hierbij groei van *L. pneumophila* kan optreden wordt onderzocht in het onderzoek dat KWR uitvoert voor de Nederlandse waterbedrijven.

L. pneumophila in rwzi-effluent

De analyseresultaten laten duidelijk zien dat *L. pneumophila* in het water van het Veluwemeer bij Harderwijk afkomstig was uit het effluent van de rwzi van Harderwijk. Dit werd bevestigd door de afwezigheid van *L. pneumophila* in twee van de drie monsters genomen bij strand Nulde op ca. tien km van Harderwijk. In eerder onderzoek was al aangetoond dat *L. pneumophila* aanwezig is in water van rwzi's¹⁰⁾. Onduidelijk is nog wat de herkomst is van *L. pneumophila* in de rwzi. Groei bij de waterbehandeling ligt niet voor de hand omdat de temperatuur van het rioolwater meestal lager is dan 25°C. Mogelijkheden zijn: vermenigvuldiging in de installatie voor de thermische vergisting van slib en aanwezigheid van *L. pneumophila* in het ongezuiverde afvalwater. De aanwezigheid van hoge aantallen *L. pneumophila* in het effluent van een rwzi kan een gezondheidsrisico vormen bij de bedrijfsvoering van de installatie, maar blootstelling aan pathogene micro-organismen van fecale herkomst vormt eveneens een risico⁷⁾. Nader onderzoek van rwzi's en van het rioolwater kan duidelijkheid geven over de herkomst van *L. pneumophila* in behandeld afvalwater.

LITERATUUR

- 1) VROM (2004). Besluit van 26 oktober 2004 tot wijziging van het Waterleidingbesluit en het Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen (preventie van *Legionella* in leidingwater). Staatsblad 576:1-50.
- 2) Berbee R. (1999). *Legionella* in oppervlaktewater, in koelwater, in RWZI's, in ; waarin eigenlijk niet? RIZA-rapport 99.057.
- 3) Wullings B. en D. van der Kooij (2006). Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 72, nr. 1, pag. 157-166.
- 4) Fliermans C., W. Cherry, L. Orrison, S. Smith, D. Tison en D. Pope (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 41, nr. 1, pag. 9-16.
- 5) Ortiz-Roque C. en T. Hazen (1987). Abundance and distribution of Legionellaceae in Puerto Rican waters. Appl. Environ. Microbiol. Vol 53, nr. 9, pag. 2231-2236.
- 6) Wullings B., G. Wubbels, H. Veenendaal en D. van der Kooij (2007). Snelle, kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* met Q-PCR. H₂O nr. 5, pag. 39-41.
- 7) Van der Kooij D., G. Wubbels en G. Veenendaal (2007). Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort *Legionella anisa*. H₂O nr. 5, pag. 33-35.
- 8) Waterbase.nl: database die beheerd wordt door ministerie van Verkeer en Waterstaat met daarin de gegevens van de monitoring van Nederlandse rijkswateren.
- 9) Scheffer W. (2004). Stadsverwarming jaagt de temperatuur van leidingwater op. Intech K&S pag. 14-17.
- 10) Medema G.-J., P. Roeleveld, B. Wullings en D. van der Kooij (2003). *Legionella* bij rwzi's. H₂O nr. 8, pag. 15-17.