

Biofilmvorming en groei van Legionella op leidingmaterialen in een experimentele warmtapwaterinstallatie

D. VAN DER KOOIJ, KIWA WATER RESEARCH
 H. VEENENDAAL, KIWA WATER RESEARCH
 W. SCHEFFER, UNETO-VNI

Beheersing van meerdere risicofactoren biedt de meeste zekerheid op beperking van groei van Legionella pneumophila in leidingwatersystemen. Van de risicofactoren (een watertemperatuur tussen 20 en 45°C, onvoldoende doorstroming van het water en aanwezigheid van biofilm en sediment) zijn de eerste twee relatief gemakkelijk traceerbaar en lenen zich bovendien goed voor preventieve maatregelen bij ontwerp en beheer van de installatie. Vorming van biofilm en sediment vormt een moeilijker hanteerbare risicofactor.

Biofilms ontstaan door groei van micro-organismen op een oppervlak in contact met water. De voedingsstoffen voor deze micro-organismen worden aangevoerd met het langstromende water, maar kunnen tevens afkomstig zijn uit het leidingmateriaal waarop biofilmvorming plaatsvindt. De groei van Legionella-bacteriën is indirect gerelateerd aan biofilmvorming. Bepaalde protozoa (amoeben) die grazen op de biofilm, kunnen dienst doen als gastheer voor Legionella¹⁾. In de praktijk en onder experimentele omstandigheden is herhaaldelijk gebleken dat bepaalde materialen op kunststofbasis de groei van Legionella kunnen versterken^{2),3),4),5)}. Kwantitatieve informatie over de relatie tussen de mate van biofilmvorming en groei van Legionella in de praktijk ontbreekt echter (nog). Representatieve monsters van de biofilm zijn moeilijk te verkrijgen en ook het uitvoeren van een kwantitatieve analyse van biofilmmateriaal is gecompliceerd. Deze aspecten maken biofilmvorming tot een lastig hanteerbare risicofactor.

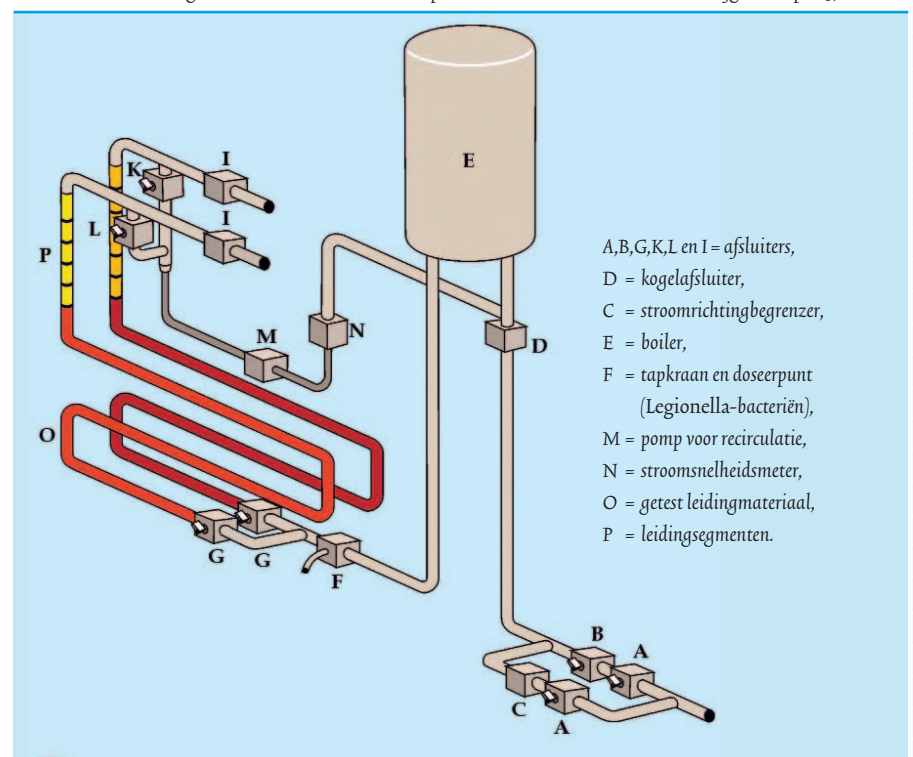
Koper is in Nederland het meest gebruikte leidingmateriaal in installaties voor warmtapwater. Nadelen van dit materiaal zijn corrosie

en de belasting van het milieu met koper. Om deze redenen en vanwege de aantrekkelijke constructieve eigenschappen worden steeds meer systemen op kunststofbasis geïnstalleerd. Onduidelijk is of toepassen van kunststof in de plaats van koper een extra risico betekent op groei van Legionella. Bij een eerder uitgevoerd onderzoek kon geen effect van het materiaaltype op de microbiologische kwaliteit van koud (circa 18°C) leidingwater worden vastgesteld⁶⁾. De effecten van de leidingmaterialen roestvast staal, cross-linked polyethyleen en koper op bevordering van biofilmvorming en groei van Legionella-bacteriën zijn onderzocht met een experimentele installatie voor warmtapwater bij een watertemperatuur van ongeveer 37°C ('worst case')⁷⁾. De installatie omvatte een drietal identieke keramische boilers (80 liter), met daaraan gekoppeld paren van leidingen van circa zes meter lengte (volume ongeveer een liter) (zie afbeelding 1). In deze installatie werd huishoudelijk verbruik van warm leidingwater gesimuleerd conform het basistappatroon in NEN 5128, maar zonder douchetappingen.

Het onderzoek, dat grotendeels werd gefinancierd door UNETO-VNI, met ondersteuning vanuit het bedrijfstakonderzoek (BTO), richtte zich op de volgende vragen:

- Kan Legionella zich vermeederen cq. handhaven in een leiding van ongeveer vijf meter lengte (volume 1 liter) bij doorstromen met warm water (37°C) conform

Afb. 1: Schematische weergave van een deel van de experimentele warmtapwaterinstallatie. Per materiaaltype waren twee parallelgeschakelde leidingen van circa zes meter gemonteerd. Per leiding konden leidingsegmenten worden uitgenomen voor onderzoek. De temperatuur van het water in de boiler was afgesteld op ca 37°C.



huishoudelijk gebruik?

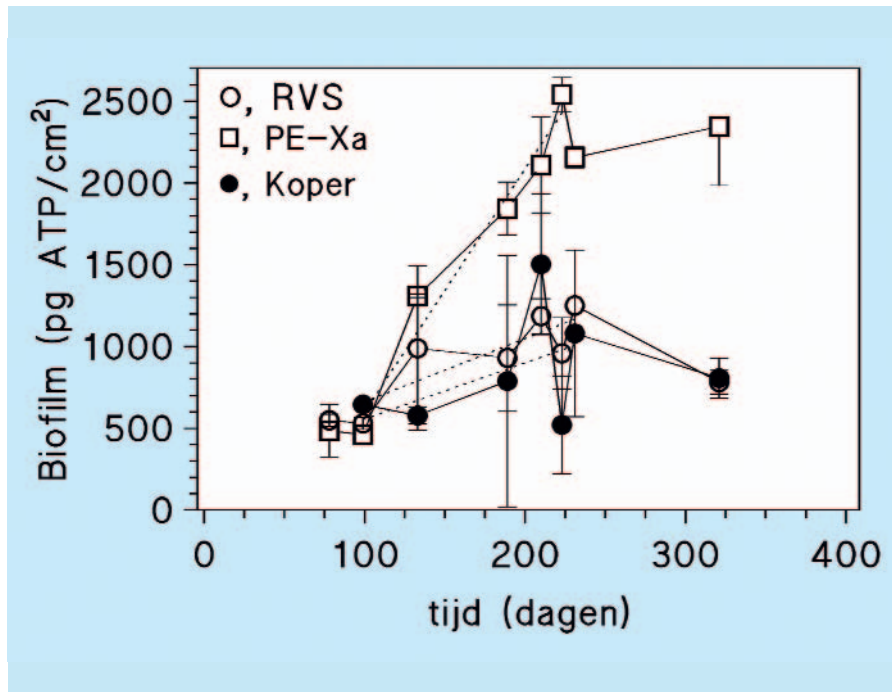
- Is versterking van biofilmvorming door het leidingmateriaal van invloed op de groei/handhaving van *Legionella*-bacteriën in de leiding?
- Wat is het effect van kortdurend doorstromen met heet water (60°C) op het aantal *Legionella*-bacteriën in de biofilm?

Biomassa-productie-potentie

Een eerste indicatie voor de groeibevorderende eigenschappen van de geselecteerde materialen werd verkregen met de zogeheten BPP-test (biomassa-productie-potentietest)⁸. Hierbij werden twaalf stukjes (van circa 8 cm²) van de materialen in Erlenmeyer-kolven (van één liter) met 600 ml biologisch stabiel drinkwater onder statische condities bij 25°C geïncubeerd. Als controles dienden onder meer glas en roestvast staal die beiden waren verhit in een oven bij 550°C. De vorming van biomassa in het water en op de materialen (biofilm) werd gemeten met behulp van de analyse van adenosinetrifosfaat (ATP), een energierijke verbinding die aanwezig is in alle levende micro-organismen. Uit de test kwam naar voren dat roestvast staal, koper en cross-linked polyethyleen (PEX) de bacteriegroei bevorderden en dat tevens groei van *Legionella* optrad. Roestvast staal en glas, verhit bij 550°C, veroorzaakten vrijwel geen groeibevordering en evenmin groei van *Legionella*. De biomassa-productie en de daarmee samenhangende groei van *Legionella* in aanwezigheid van roestvast staal en koper werd waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van een laagje olie of vet op de buitenkant van deze materialen.

Groei in proefleidinginstallatie

De proefleidinginstallatie, die werd gevoed met drinkwater bereid uit grondwater, werd drie maal geënt met niet detecteerbare aantallen *Legionella*-bacteriën in een mengcultuur met andere micro-organismen uit de BPP-test (met PEX) en uit een warmwatersysteem. Het warme water (ongeveer 35°C) werd rondgepompt om uitspoelen van *Legionella* te voorkomen. Tijdens recirculatie (via de boiler) nam het ATP-gehalte van het water toe tot waarden boven 100 ng/l, hetgeen duidde op groei van micro-organismen. Het ATP-gehalte was het hoogste in het systeem met de PEX-leidingen (mediaan 60 ng ATP/l). Vanaf dag 42 werd groei van *Legionella* in de installatie waargenomen. Uit typering bleek dat *Legionella pneumophila* serogroep 1 en serogroep 6 aanwezig waren. Tijdens recirculatie in het systeem met de PEX-leidingen nam het aantal *Legionella*-bacteriën toe tot maximaal twee maal 10⁶ kve/l en in de leidingen van roestvast staal en koper tot 10⁵ kve/l. Doorstromen van enkele leidingen met heet water (60°C) veroorzaakte binnen vijf minuten een duidelijke



Afb. 2: Biofilmvorming op de leidingmaterialen (gemeten in leidingsegmenten) in de periode met simulatie van het huishoudelijk verbruik.

reductie van het aantal *Legionella*-bacteriën in de biofilm (1,5 logeenheden bij PEX tot meer dan 2,6 logeenheden bij RVS en koper). De hoge temperatuur kon niet worden gehandhaafd en na 30 minuten werden nog *Legionella*-bacteriën in het water waargenomen.

Bij simulatie van huishoudelijk verbruik van warm water (37°C) bleek dat *Legionella* zich vermeerderde in de boilers (tot circa 10⁵ kve/l). Periodieke temperatuurverhoging (twee maal per week 30 minuten op 70°C) van het water in de boilers (waarna het water werd gespuid via een aparte afvoerleiding), leidde tot eliminatie van *Legionella* uit de boilers. Gedurende de gehele daaropvolgende proefperiode (meer dan 300 dagen) bleek *Legionella* in staat zich te vermeerderen in de uittapleidingen van roestvast staal, cross-linked polyethyleen en koper. De mediaanwaarden van de waargenomen *Legionella*-aantallen bedroegen circa 10⁴ kve/l bij roestvast staal en cross-linked polyethyleen en circa 1200 kve/l bij koper. Direct na stagnatie

(enkele dagen), als gevolg van technische storingen, waren de aantallen in het water uit de leidingen van roestvast staal en cross-linked polyethyleen incidenteel hoger dan 5 x 10⁴ kve/l. Doorstromen van de (oneven genummerde) leidingen met water van 70°C leidde tot een daling van het aantal tot beneden de detectiegrens, maar na enkele maanden waren deze aantallen weer toegenomen tot de oorspronkelijke niveaus. De aantallen in het water uit de PEX-leidingen waren hierbij het hoogste (meer dan 10⁴ kve/l). Bij voortgezet tappen met een debiet van vier liter per minuut daalde het aantal *Legionella*-bacteriën in het water binnen tien minuten met meer dan 90 procent en lag bij de drie materialen lager dan 1000 kve/l.

Het ATP-gehalte van het water uit de PEX-leidingen was hoger (mediaan 4 ng/l) dan van het water uit de leidingen van roestvast staal en koper (mediaan circa 2 ng/l). Aan het einde van de gehele proefperiode (meer dan 500 dagen) was het ATP-gehalte van het water uit

Tabel 1: Kengetallen van de microbiologische samenstelling van de biofilm op de leidingmaterialen in de periode met huishoudelijk verbruik. med. = mediaan, 90-p = 90-percentiel.

materiaal	ATP (pg/cm ²)		KG 25°C (kve/cm ²)		Legionella (kve/cm ²)	
	med.	90-p	med.	90-p	med.	90-p
RVS	820	1350	1,9 x 10 ⁴	4,5 x 10 ⁴	560	2000
PE-Xa	1950	2500	4 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁵	1700	1,3 x 10 ⁵
koper	720	1800	2,7 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	27	390

de PEX-leidingen nog steeds hoger dan van het water uit de leidingen van roestvast staal en koper. Na perioden van (enkele dagen) stagnatie was het ATP-gehalte in het water uit de PEX-leidingen incidenteel hoger dan 20 ng/l.

Biofilmvorming

Biofilmvorming werd gemeten in leidingsegmenten die voor dit doel in de installatie waren opgenomen (afbeelding 1). Uit afbeelding 2 blijkt dat de biofilmconcentraties op PEX hoger waren dan op roestvast staal en koper. Ook de koloniegerechten op een voedselarm medium (KG 25°C) en de aantallen *Legionella*-bacteriën waren het hoogste in het water uit de PEX-leidingen (zie tabel 1). Opvallend is dat de biofilmconcentraties op koper en roestvast staal overeenkwamen, maar dat de concentratie *Legionella*-bacteriën op koper circa 10 à 20 maal lager was dan op roestvast staal.

In de leidingen bleken tevens afzettingen van ijzer (maximaal 40 mg/m²) en mangaan (maximaal 5 mg/m²) aanwezig. In de koperen leidingen werden koperafzettingen tot een concentratie van 1500 mg/m² waargenomen. De koperconcentratie in het water uit de koperen leidingen bedroeg 300 à 400 µg/l.

Op dag 560 werden alle leidingen gedurende enkele uren doorgespoeld met water van 70°C. In het water uit de leidingen, dat op dezelfde dag werd bemonsterd, werden geen *Legionella*-bacteriën waargenomen (minder dan 33 kve/l). Een week later, na recirculatie met warm water (37°C), werden zeer hoge aantallen *Legionella*-bacteriën (meer dan 10⁷ kve/l) aangetroffen. Ook het ATP-gehalte van het water was hoog (115-300 ng/l). Bij toepassen van het tappatroon conform huishoudelijk verbruik daalden deze aantallen tot waarden overeenkomend met aantallen die werden waargenomen voor verhitten.

Betekenis

Uit de resultaten van het onderzoek met de proefleidinginstallatie blijkt dat *Legionella*-bacteriën zich sterk kunnen vermeerderen in boilers met leidingwater en een temperatuur van 37°C en een gemiddelde verblijftijd van een halve dag. Deze waarneming onderstreept het belang van het reeds 20 jaar oude advies 'houdt het water in uw boiler boven 60°C'. Opvallend is dat *Legionella* zich bij het gehanteerde gebruikspatroon van warm water (30-37°C) langdurig vermeerderde in uittapleidingen, waarbij de aantallen vaak hoger waren dan 10⁴ kve/l. Na stagnatie door een technische storing en verhitting werden gedurende korte tijd aantallen waargenomen die 10 à 1000 maal hoger lagen dan het 'normale' niveau. Een afwijkend (geringer of geen) gebruik kan dus gedurende korte tijd tot sterk verhoogde aan-

tallen leiden. Deze waarneming geeft aan dat op basis van enkele metingen geen goede schatting kan worden gemaakt van de blootstelling aan *Legionella*. Tevens wordt duidelijk dat het van belang is om strenge eisen te stellen aan het aantal *Legionella*-bacteriën in het leidingwater.

Het toegepaste cross-linked polyethyleen versterkte de biofilmvorming, wat gepaard ging met hogere aantallen *Legionella*-bacteriën. De biofilmvorming op koper en roestvast staal is het gevolg van de opname van afbreekbare stoffen uit het leidingwater. Tussen diverse typen leidingwater bestaan grote verschillen in biofilmvorming⁹⁾. Biofilmconcentraties beneden 1000 pg ATP/cm² kunnen kennelijk al gepaard gaan met *Legionella*-aantallen in het water die hoger zijn dan 1000 kve/l. De in vergelijking met roestvast staal beperktere groei van *Legionella* in de koperen leidingen moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan de invloed van het koper op de samenstelling van de biofilm. Onbekend is hoe lang koper de filmsamenstelling kan beïnvloeden en in welke mate deze invloed afhankelijk is van de watersamenstelling.

De resultaten illustreren de betekenis van de eerder genoemde risicofactoren. Vermijden van temperaturen in het risicogebied, verhinderen van stagnatie en beperken van de biofilmvorming zijn van belang om groei van *Legionella* te verhinderen. Biofilmvorming kan worden beperkt door het gebruik van materialen met een lage BPP-waarde en leidingwater met een hoge mate van biologische stabiliteit. ◀

LITERATUUR

- 1) Rowbotham T. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoeba. *J. Clin. Pathol.* nr. 33, pag. 1179-1183.
- 2) Colbourne J., D. Pratt, M. Smith, S. Fisher-Hoch en D. Harper (1984). Water fittings as sources of *Legionella pneumophila* in a hospital plumbing system. *Lancet* nr. 28, pag. 210-213.
- 3) Rogers J., A. Dowsett, P. Dennis, J. Lee en C. Keevil (1994). Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 60, pag. 1842-1851.
- 4) Schofield G. en R. Locci (1984). Colonization of components of a model hot water system by *Legionella pneumophila*. *J. Appl. Bacteriol.* nr. 58, pag. 151-162.
- 5) Schoenen D., R. Schulze-Röbbecke en N. Schirdewahn (1988). Mikrobielle Kontamination des Wassers durch Rohr- und Schlauchmaterialien. 2. Mitteilung: Wachstum von *Legionella pneumophila*. *Zb. Bakt. Hyg. B* nr. 186, pag. 326-332.
- 6) Veenendaal H. en D. van der Kooij (1999). Biofilmvormingspotentie van leidingmaterialen voor binneninstallaties. Kiwa-rapport KOA 99.079.

- 7) Van der Kooij D., J. Vrouwenfelder en H. Veenendaal (2003). Invloed van leidingmaterialen op biofilmvorming en groei van *Legionella*-bacteriën in een proefleidinginstallatie. Kiwa-rapport KWR 02.090.
- 8) Van der Kooij D. en H. Veenendaal (2001). Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance. *Water Sci Technol. Water Supply* 1(3), pag. 39-45.
- 9) Van der Kooij D., J. Vrouwenfelder en H. Veenendaal (1997). Bepaling en betekenis van de biofilmvormende eigenschappen van drinkwater. *H₂O* nr. 25, pag. 767-771.