



Waterwijs onderzoek
KWRW 2025.047 | Mei 2025

**Resilience van
microbiële
gemeenschappen in
biofilm tegen
opportunistische
ziekteverwekkers**

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Colofon

Resilience van microbiële gemeenschappen in biofilm tegen opportunistische ziekteverwekkers

KWRW 2025.047 | Mei 2025

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Waterwonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

Opdrachtnummer

404300.030

Projectmanager

Marcelle van der Waals

Opdrachtgever

Waterwijs - Verkennend onderzoek

Auteurs

Paul W.J.J. van der Wielen & Frits van Charante

Kwaliteitsborger

Leo Heijnen (i.o)

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder Waterwijs-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Biofilm, resilience, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, microbiële gemeenschap

Jaar van publicatie

2025

Meer informatie

Dr. Paul W.J.J. van der Wielen

T

E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

PO Box 1072

3430 BB Nieuwegein

The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

E info@kwrwater.nl

I www.kwrwater.nl

KWR

Mei 2025 ©

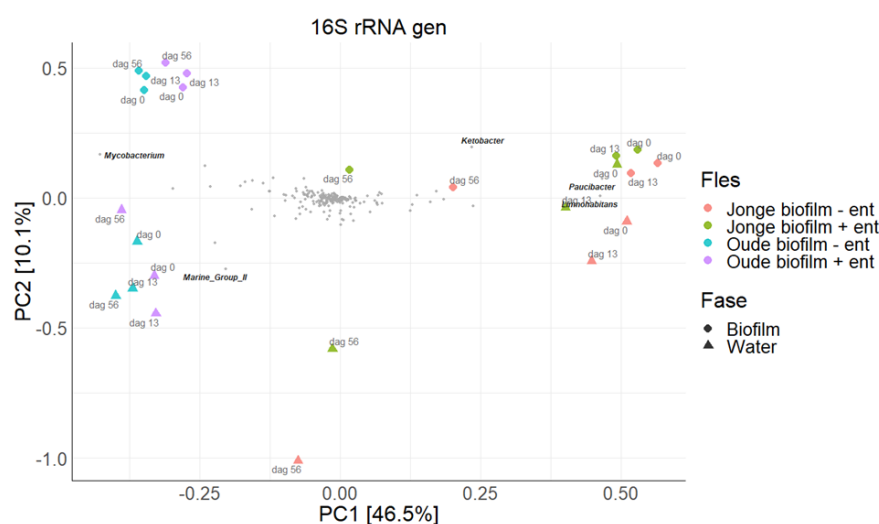
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier.

Managementsamenvatting

Weerbare microbiële gemeenschappen voorkómen misschien groei van sommige opportunistische ziekteverwekkers

Auteurs Paul W.J.J. van der Wielen & Frits van Charante.

Opportunistische ziekteverwekkers zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Legionella pneumophila* vermeerderen zich in biofilms in drinkwatersystemen. Een trendverkenning uit 2019 heeft laten zien dat de weerbaarheid van de natuurlijke microbiële gemeenschap in biofilms de groei van opportunistische ziekteverwekkers na een verstoring mogelijk kan verhinderen. In deze studie laten we zien dat de microbiële gemeenschap in een jonge biofilm (8 tot 64 dagen oud) en in het water dat ermee in contact staat, niet stabiel is, maar wel in een oude biofilm (128 tot 184 dagen oud) en in het water dat ermee in contact staat. Kolonisatie en groei van de ziekteverwekker *P. aeruginosa* trad alleen op in het water dat in contact staat met een jonge biofilm, wat laat zien dat de niet-stabiele microbiële gemeenschap nog niet weerbaar is tegen kolonisatie en groei van deze ziekteverwekker. Kolonisatie en groei van *L. pneumophila* trad op in zowel de jonge als oude biofilm, waarbij de hoogste aantallen werden waargenomen in de oude biofilm, met de stabiele microbiële gemeenschap. Bepaalde bacterie- en protozoasoorten waren meer aanwezig in jonge biofilm en water dat daarmee in contact stond dan in de oude biofilm en water dat daarmee in contact stond, en vice versa. Mogelijk dat deze soorten synergistisch of antagonistisch zijn voor weerbaarheid tegen *P. aeruginosa* of *L. pneumophila*. Aanvullende experimenten zijn nodig om dat wetenschappelijk vast te stellen.



De verschillen tussen de bacteriegemeenschappen van de verschillende monsters weergegeven in een PCoA plot en de bacterietaxa verantwoordelijk voor de verschillen. Hoe dichter twee monsterpunten bij elkaar liggen, hoe meer de bacteriegemeenschappen op elkaar lijken.

Belang: Weerbare microbiële gemeenschap

Een verstoring van de microbiële gemeenschap in het drinkwatersysteem zou mogelijke gevolgen kunnen hebben voor de microbiologische drinkwaterkwaliteit, zoals vermeerdering van

opportunistische ziekteverwekkers. Het is daarom belangrijk om na te gaan in hoeverre de microbiële gemeenschap weerbaar is bij veranderingen en of dat voorkomt dat opportunistische ziekteverwekkers gaan groeien.

Aanpak: Kweken van biofilm met verschillende leeftijd

Onder statische condities werd een jonge en oude biofilm gekweekt op PVC-P dat in contact staat met water en waaraan *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* werden toegevoegd. De bacterie- en protozoasamenstelling en de aantallen *L. pneumophila* en *P. aeruginosa* werden vervolgens in de tijd gevolgd.

Resultaten: Ontwikkeling microbiële gemeenschap en opportunistische ziekteverwekkers in biofilm

De microbiële gemeenschap is nog niet gestabiliseerd wanneer de biofilm verouderd van 8 dagen naar 64 dagen. In een biofilm die verouderd van 128 naar 184 dagen, is de microbiële gemeenschap wel gestabiliseerd.

De *P. aeruginosa* aantallen pieken in het water dat in contact stond met een 21 dagen oude biofilm. In de 64 dagen oude biofilm en watermonsters zijn de aantallen *P. aeruginosa* echter veel lager en in de oude biofilm en water werd *P. aeruginosa* niet gedetecteerd. Zeven bacteriesoorten en vijf protozoasoorten verschillen tussen de 21 en 64 dagen oude biofilm en het water dat daarmee in contact staat. Mogelijk dat één of meerdere van deze soorten synergistisch of antagonistisch werken op groei van *P. aeruginosa*.

L. pneumophila is aanwezig in de jonge en oude biofilmmonsters, waarbij de hoogste aantallen zijn waargenomen in de oude biofilm. Vijf

bacteriesoorten werden gedetecteerd die verschillen tussen de jonge en oude biofilm en misschien een rol spelen waarom in een jonge biofilm lagere aantallen *L. pneumophila* werden aangetroffen dan in een oude biofilm.

Conclusies: Leeftijd biofilm en weerbaarheid

In vergelijking met een oude biofilm heeft een jonge biofilm een nog niet stabiele microbiële gemeenschap en is daarmee waarschijnlijk minder weerbaar tegen verstoringen dan een oude biofilm. Dit kan een reden zijn waarom *P. aeruginosa* wel in staat te groeien in het water dat in contact staat met een jonge biofilm, maar niet in de oude biofilm of het water dat daarmee in contact staat. Zowel de niet stabiele jonge biofilm als de stabiele oude biofilm waren niet weerbaar tegen groei van *L. pneumophila* in de biofilm. Meer onderzoek is nodig om te achterhalen of bepaalde geïdentificeerde micro-organismen in de biofilm of water synergistisch of antagonistisch werken tegen de twee onderzochte opportunistische pathogenen. Met name antagonistische micro-organismen kunnen interessant zijn voor toepassing om biofilms weerbaarder te maken tegen kolonisatie en groei van opportunistische pathogenen.

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Resilience van microbiële gemeenschappen in biofilm tegen opportunistische ziekteverwekkers* (KWRW 2025.047).

Inhoud

Colofon	2	
<i>Managementsamenvatting</i>	3	
Inhoud	5	
1	Introductie	7
1.1	Trendalert ‘het belang van resilience in de drinkwatermicrobiologie’	7
1.2	Onderzoek naar resistente en/of resiliënt bacteriegemeenschappen in drinkwaterbiofilms	7
2	Aanpak van het onderzoek	8
2.1	Opkweek biofilm	8
2.2	Dosering <i>P. aeruginosa</i> en <i>L. pneumophila</i>	8
2.3	Bemonstering flessen	9
2.4	Analyses	9
2.4.1	ATP-concentratie	9
2.4.2	<i>P. aeruginosa</i>	9
2.4.3	<i>L. pneumophila</i>	9
2.4.4	Samenstelling bacterie- en protozogemeenschap	9
3	Samenstelling bacterie- en eukaryoten-gemeenschap	11
3.1	Vergelijking van de samenstelling van de bacteriegemeenschap	11
3.2	Vergelijking van de samenstelling van de eukaryotengemeenschap	12
3.3	Identificatie en vergelijking bacteriegenera in jonge en oude biofilm	14
3.4	Identificatie en vergelijking eukaryotengenera in jonge en oude biofilm	17
4	ATP, <i>P. aeruginosa</i> en <i>L. pneumophila</i>	20
4.1	ATP	20
4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
4.3	<i>Legionella pneumophila</i>	23
5	Discussie	26
5.1	Effect leeftijd biofilm op microbiële gemeenschap inclusief <i>P. aeruginosa</i> en <i>L. pneumophila</i>	26

**Meer informatie**

dr. ir. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

5.2	Zijn er bepaalde micro-organismen die kolonisatie en vermeerdering van <i>P. aeruginosa</i> of <i>L. pneumophila</i> verhinderen?	27
5.2.1	Relatie <i>P. aeruginosa</i> met bacterie- en/of protozosamenstelling	27
5.2.2	Relatie <i>L. pneumophila</i> met bacterie- en/of protozosamenstelling	29
6	Conclusies en aanbevelingen	32
6.1	Conclusies	32
6.2	Aanbevelingen	32
7	Referenties	34
I	Trendalert 2019	36
	Het belang van resilience in de drinkwatermicrobiologie	36
	Samenvatting	36
7.1	Consequenties voor u	36
7.2	Trendbeschrijving en achtergrond	38
7.2.1	Resilience	38
7.2.2	Invloed van verstoring op de microbiologie	38
7.2.3	Resultaten uit de literatuur	38
7.2.4	Relevantie	38
7.2.5	Voorbeeld resilience bij onwenselijke verstoring	39
7.2.6	Voorbeeld bioaugmentatie als gewenste verstoring	39
7.2.7	Conclusies/aanbevelingen	39
	Literatuur	39
	Meer informatie	40
	Keywords	40
	Auteur	40

1 Introductie

1.1 Trendalert ‘het belang van resilience in de drinkwatermicrobiologie’

Een verstoring van de bacteriegemeenschap in het drinkwatersysteem zou mogelijke gevolgen kunnen hebben voor de microbiologische drinkwaterkwaliteit. Het is daarom belangrijk om beter te begrijpen hoe de bacteriegemeenschap reageert op een verstoring en wat voor mogelijkheden er zijn om deze reactie van de bacteriegemeenschap te sturen, zodat er geen of zo min mogelijk ongewenste effecten optreden voor de waterkwaliteit. In een eerste stap heeft KWR in 2019 de trendalert “Het belang van resilience in de drinkwatermicrobiologie” geschreven (zie bijlage I). In deze trendalert wordt beschreven dat een bacteriegemeenschap:

- Resistent kan zijn tegen een verstoring (resistentie);
- Tijdelijk verandert in samenstelling waarna het weer terugkeert naar de oude situatie (resilience);
- Definitief verandert in samenstelling maar wel dezelfde (metabole) functies behoudt (functionele redundantie);
- Definitief verandert in samenstelling en (metabole) functies.

Om de invloed van een verstoring op de microbiologische drinkwaterkwaliteit zo klein mogelijk te houden, is het wenselijk dat de bacteriegemeenschap in het drinkwatersysteem (biofilm, sediment, drinkwater) zich bij een verstoring resistent of resiliënt gedraagt waarbij de bacteriegemeenschap relatief snel na een verstoring weer terugkeert naar de oorspronkelijke samenstelling. Dan is de kans op langdurige vermeerdering en/of aanwezigheid van ongewenste micro-organismen na een verstoring zo klein mogelijk.

1.2 Onderzoek naar resistente en/of resiliënt bacteriegemeenschappen in drinkwaterbiofilms

Tot nu toe is weinig onderzoek uitgevoerd naar de invloed van een verstoring op de samenstelling en verandering van bacteriegemeenschappen in drinkwatersystemen. Onderzoek heeft echter wel laten zien dat de bacteriegemeenschap van een jonge biofilm nog niet stabiel is, terwijl die van een oude biofilm juist wel stabiel is (Soborg et al. 2024). De verwachting is dat een stabiele bacteriegemeenschap in de biofilm weerbaarder (resistent of resiliënt) is tegen verstoringen dan een niet-stabiele bacteriegemeenschap. De verwachting is dat wanneer de aantallen opportunistische ziekteverwekkers verhoogd zijn tijdens bijvoorbeeld een verstoring, deze ziekteverwekkers minder goed in staat zijn om een stabiele biofilm dan een onstabiele biofilm te koloniseren. Om te achterhalen in hoeverre deze hypothese klopt, zijn experimenten uitgevoerd waarbij *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* werden gedoseerd aan een jonge biofilm (onstabiele situatie) en een oude biofilm (stabiele situatie) die zich hebben ontwikkeld op PVC-P dat in contact is met drinkwater. Deze verkennende studie probeert daarbij een antwoord te vinden op de volgende onderzoeksvragen:

1. In hoeverre heeft een jonge biofilm een minder stabiele samenstelling van de bacterie- en protozoëngemeenschap dan een oude biofilm?
2. In hoeverre zijn *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* in staat om een onstabiele jonge biofilm te koloniseren en uit te groeien en in hoeverre kunnen ze dat in een stabiele oude biofilm?
3. Welke bacterie- en/of protozogroepen kunnen worden geïdentificeerd die een relatie lijken te hebben met resistentie tegen kolonisatie en vermeerdering van *P. aeruginosa* of *L. pneumophila* in de biofilm?

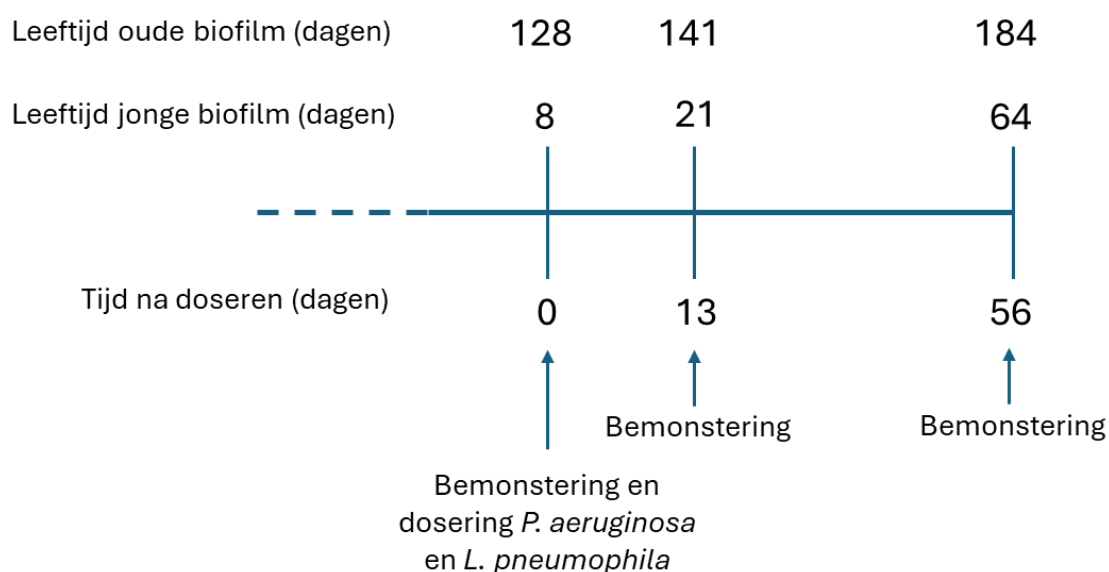
2 Aanpak van het onderzoek

2.1 Opkweek biofilm

Een jonge en oude biofilm werd gekweekt op PVC-P dat in contact staat met drinkwater in een fles zoals beschreven in de biomassaproductiepotentie (BPP)-methode voor materialen (KWR-huisvoorschrift LMB-006 die conform NEN-EN 16421:2015 is), waarbij werd geïncubeerd bij 37°C. Voor deze testen werd het drinkwater gebruikt van het KWR-laboratorium en het drinkwater in de flessen werd daarbij wekelijks ververs. Doordat PVC-P veel groeibevorderende stoffen afgeeft, werd met name een biofilm met bacteriën gekweekt die groeien op biodegradeerbaar organisch koolstof (BDOC) uit het PVC-P-materiaal. Voordat *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* werden gedoseerd hadden de PVC-P materialen 128 dagen of 8 dagen in contact met drinkwater gestaan. Dat betekent dus dat bij start van het experiment de jonge biofilm 8 dagen oud was en de oude biofilm 128 dagen (Figuur 2.1).

2.2 Dosering *P. aeruginosa* en *L. pneumophila*

P. aeruginosa stam M103998 (geïsoleerd uit het Nederlandse drinkwater en MLST-type ST712) werd opgekweekt in vloeibaar medium. *L. pneumophila* stam LP1 werd opgekweekt op BCYE-agar en vervolgens werd koloniemateriaal gesuspenderd in PBS. Vervolgens werd een mix van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* toegevoegd aan één van de twee flessen met PVC-P met de jonge biofilm (eindconcentratie van 1000 kve/ml *P. aeruginosa* en 1000 kve/ml *L. pneumophila*), terwijl aan de andere fles met een jonge biofilm beide ziekteverwekkers niet werden gedoseerd (negatieve blanco). Deze dosering werd toegevoegd direct nadat het water was ververs. Evenzo werd aan één van de twee flessen met PVC-P met een oud biofilm beide opportunistische ziekteverwekkers gedoseerd met dezelfde eindconcentratie van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila*.



Figuur 2.1 De tijdslijn van het experiment met de leeftijd van de jonge en oude biofilm op het moment van dosering en de drie monsternames (dag 0, 13 en 56 na doseren).

2.3 Bemonstering flessen

Voor toevoeging van beide opportunistische ziekteverwekkers aan enkele flessen met PVC-P ($t=0$) werd een PVC-P coupon uit iedere fles genomen en werd het drinkwater voor verversing bemonsterd. Vervolgens werd deze bemonstering op dag 13 en 56 herhaald (Figuur 2.1). Doordat het water wekelijks werd verversd, is het water bemonsterd vlak voor de verversing. Het water werd direct in behandeling genomen voor de verschillende analyses. De biofilm werd van de PVC-P coupons verwijderd volgens de BPP-methode voor materialen (KWR-huisvoorschrift LMB-006 die conform NEN-EN 16421:2015 is).

2.4 Analyses

De ATP-concentratie, aantallen *L. pneumophila* en *P. aeruginosa*, en de samenstelling van de bacterie- en protozogemeenschap werd bepaald van het bemonsterde drinkwater en biofilm.

2.4.1 ATP-concentratie

De ATP-concentratie werd gebruikt als maat voor de hoeveelheid actieve biomassa en werd bepaald volgens KWR-huisvoorschrift LMB-006 die conform NEN-EN 16421:2015 is.

2.4.2 *P. aeruginosa*

De aantallen *P. aeruginosa* werden bepaald met de kweekmethode volgens KWR-huisvoorschrift LMB-038 die is afgeleid van NEN-EN-ISO 16266 en met de qPCR-methode volgens KWR-huisvoorschrift LMB-065 en LMB-065 bijlage 10.

2.4.3 *L. pneumophila*

De aantallen *L. pneumophila* werden bepaald met de kweekmethode volgens KWR-huisvoorschrift LMB-080 die conform NEN-EN-ISO 11731 is, en met een specifieke qPCR methode volgens KWR-huisvoorschrift LMB-065 en LMB065 bijlage 1 die conform NEN 6254 zijn.

2.4.4 Samenstelling bacterie- en protozogemeenschap

Om de samenstelling van de bacterie- en protozogemeenschap te bepalen is eerst DNA geïsoleerd uit de water- en biofilmmonsters volgens KWR-huisvoorschrift LMB-069 die conform NEN 6254 (14.1) is. Het geïsoleerde DNA is gebruikt voor de qPCR analyses (zie paragraaf 2.4.2 en 2.4.3) en voor de sequentieanalyses om de samenstelling van de bacterie- en protozogemeenschap te bepalen. Daarvoor werd eerst de V4-regio van het 16S rRNA gen van prokaryoten middels PCR geamplificeerd om de samenstelling van de bacterie- en archaeagemeenschap te kunnen bepalen en de V4-regio van het 18S rRNA gen van eukaryoten om de samenstelling van de protozo- en andere eukaryotengemeenschap te bepalen. Aansluitend werden de verkregen PCR-fragmenten gezuiverd en werd een secundaire PCR-stap uitgevoerd om de fragmenten te voorzien van een index-sequentie waarbij de fragmenten van elk monster een kenmerkende index kregen zodat de sequentie die later werd verkregen kon worden toegekend aan een specifiek monster. Daarna werd een mengsel, met equimolaire hoeveelheden van het met PCR vermenigvuldigde DNA, van elk monster gebruikt voor sequentieanalyse met een Illumina MiSeq, waarbij van elke kant van het DNA-fragment een lengte van 250 baseparen aan sequentiedata werd verkregen (paired-end sequencing). Het bioinformaticaprogramma Qiime2 (Bolyen et al., 2019) werd vervolgens gebruikt voor het analyseren van de ruwe data. Bij de analyse van de 16S rRNA gen data is gebruik gemaakt van deblur voor de kwaliteitsverbetering van de data (Amir et al., 2017) en zijn de unieke sequenties gesorteerd tot "Amplified Sequence Variants" (ASV's). Deze werden vervolgens vergeleken met water-non-saline classifier (Kaehler et al., 2019; Bokulich et al., 2018) gebaseerd op de SILVA database (Yilmaz et al., 2013) voor toekenning aan taxonomische groepen. Bij de analyse van de 18S rRNA gen data werd een kwaliteitsverbetering van de ruwe data

toegepast door het gebruik van het programma Dada2 (Callahan et al., 2016) en zijn identieke sequenties geclusterd tot ASV's. Aansluitend werd, door de sequenties van de ASV's te vergelijken met sequenties uit de PR2 referentiedatabase specifiek voor 18S rRNA gen data (Guillou et al., 2012), onderzocht tot welke taxonomische groepen de aanwezige DNA-sequenties behoorden. Met deze aanpakken werd voor elk monster de samenstelling van de bacterie- of eukaryotensamenstelling weergegeven met de verschillende ASV's die per monster zijn gevonden. De α -diversiteit, een maat voor de soorten (ASV)-diversiteit binnen een monster, werd bepaald door de Shannon-index te berekenen met Qiime2. De β -diversiteit, een maat om de soorten(ASV)-samenstelling tussen monsters te vergelijken, werd bepaald door op ASV-samenstelling gebaseerde Bray-Curtis afstanden te berekenen en deze middels een principal coordinate analyse te visualiseren, visualisaties werden gedaan met R. Een permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) werd uitgevoerd om te bepalen of de β -diversiteitsverschillen tussen monsters ook statistisch significant waren.

3 Samenstelling bacterie- en eukaryoten-gemeenschap

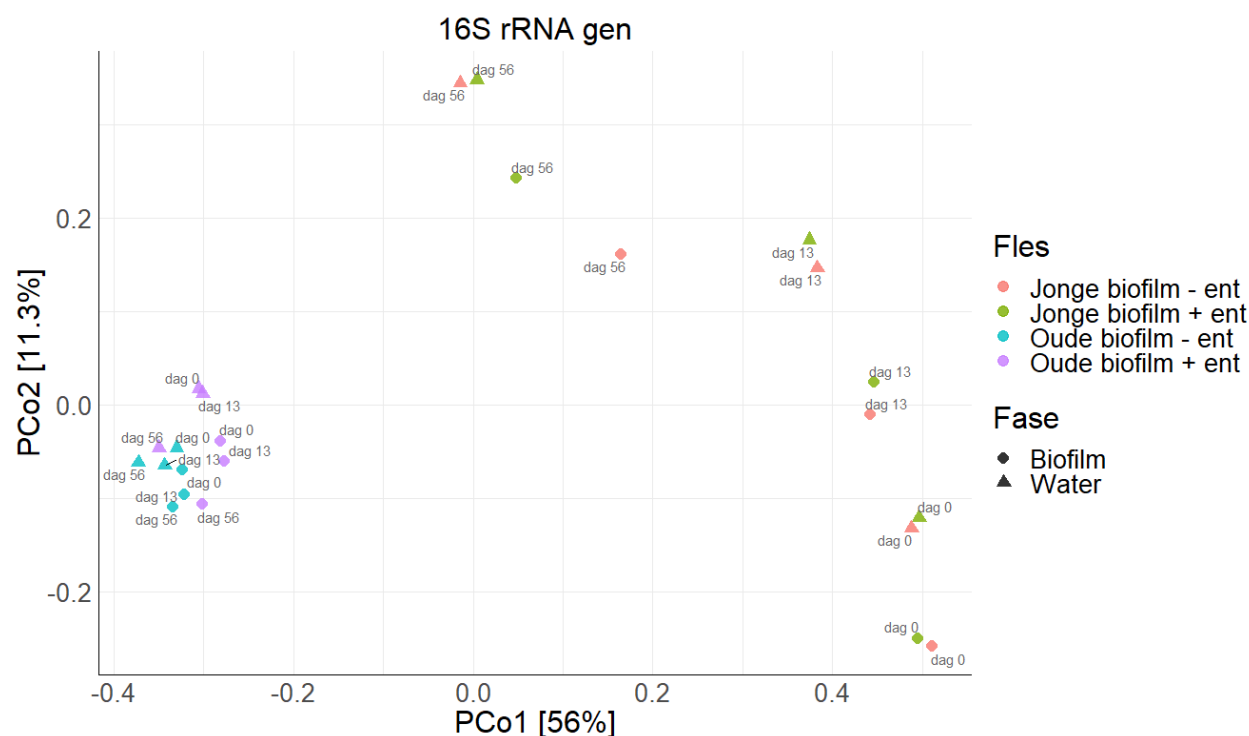
De samenstelling van de bacteriële en eukaryote gemeenschap van de verschillende monsters is bepaald door het 16S rRNA gen van bacteriën en het 18S rRNA gen van eukaryoten te sequencen. De samenstelling van de gemeenschappen werd op basis van de beta-diversiteit met elkaar vergeleken en gevisualiseerd middels een PCoA plot (Figuur 3.1 en 3.2), terwijl de statistische verschillen tussen de samenstelling op basis van de beta-diversiteit werd bepaald met een PERMANOVA-test.

3.1 Vergelijking van de samenstelling van de bacteriegemeenschap

De PCoA plot waarin de samenstelling van de bacteriegemeenschap van de verschillende monsters met elkaar worden vergeleken en de resultaten van de statistische PERMANOVA test laten zien dat de bacteriegemeenschap van de biofilm in de flessen waar wel of niet een ent van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan was toegevoegd een vergelijkbare samenstelling had ($p > 0,01$) (Figuur 3.1). Hetzelfde werd waargenomen voor de samenstelling van de bacteriegemeenschap in het water. Het toevoegen van een ent met *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* had dus geen significante invloed op de bacteriegemeenschappen in de biofilm of het water van zowel de jonge als oude biofilm.

De bacteriegemeenschap van de jonge biofilm was significant verschillend van die van de oude biofilm ($p < 0,01$). De bacteriegemeenschap in de biofilm veranderde dus substantieel gedurende de veroudering van de biofilm op de PVC-P. Hetzelfde werd waargenomen voor de waterfase, maar daar dient opgemerkt te worden dat de waterfase van de flessen met jonge en oude biofilm elke week werd verversd. Dit betekent dat het water uit beide flessen even oud waren (dus een week), maar dat het water in contact stond met materiaal met een jonge biofilm of met materiaal met een oude biofilm. Aangezien de bacteriesamenstelling in deze watermonsters significant van elkaar verschilden, had het blootstellen van het water gedurende een week aan leidingmateriaal met een jonge biofilm of oude biofilm dus een significante impact op de bacteriesamenstelling van het water. Dat laat zien dat veel bacteriesoorten uit de biofilm in het water terecht kwamen, of dat het leidingmateriaal hogere of andere afbreekbare stoffen uitwisselden gedurende de veroudering in contact met water.

Uit de vergelijking tussen de bacteriesamenstelling van het water en van de biofilm lijkt dat gedurende de eerste 64 dagen dat PVC-P in contact stond met drinkwater (jonge biofilm, zie Figuur 2.1), de bacteriegemeenschap die zich in de biofilm ontwikkelt anders was dan die in het water (Figuur 3.1), maar de resultaten van de statistische analyse laat zien dat de verschillen niet significant waren ($p > 0,01$). Wanneer PVC-P langer in contact stond met drinkwater (in ieder geval langer dan 128 dagen; oude biofilm, zie Figuur 2.1) dan lijkt de bacteriegemeenschap in de biofilm vergelijkbaar met die in het water (Figuur 3.4), maar de statistische analyse laat zien dat deze verschillen wel significant waren ($p < 0,01$). Waarschijnlijk is het verschil tussen wat visueel zichtbaar is in Figuur 3.1 en de statistische resultaten veroorzaakt door de grote variatie in de tijd van de bacteriesamenstelling van de jonge biofilm ten opzichte van de kleine variatie in de tijd van die van de oude biofilm. Hierdoor kan een klein verschil tussen biofilm en water bij lage variatie in de tijd al tot een significant verschil leiden, terwijl bij hoge variatie in de tijd ook een groot verschil tussen biofilm en water niet tot significante verschillen leidt. Het lijkt er in ieder geval op dat andere bacteriën zich in het drinkwater vermeerderen dan in de biofilm. Dit is een indicatie dat een deel van de door bacteriën afbreekbare stoffen uit PVC-P ook aan het water werden afgegeven en daar tot groei van bacteriesoorten leidde die beter waren aangepast aan planktonische vermeerdering, terwijl in de biofilm bacteriesoorten groeiden die beter waren aangepast aan de biofilmomstandigheden.

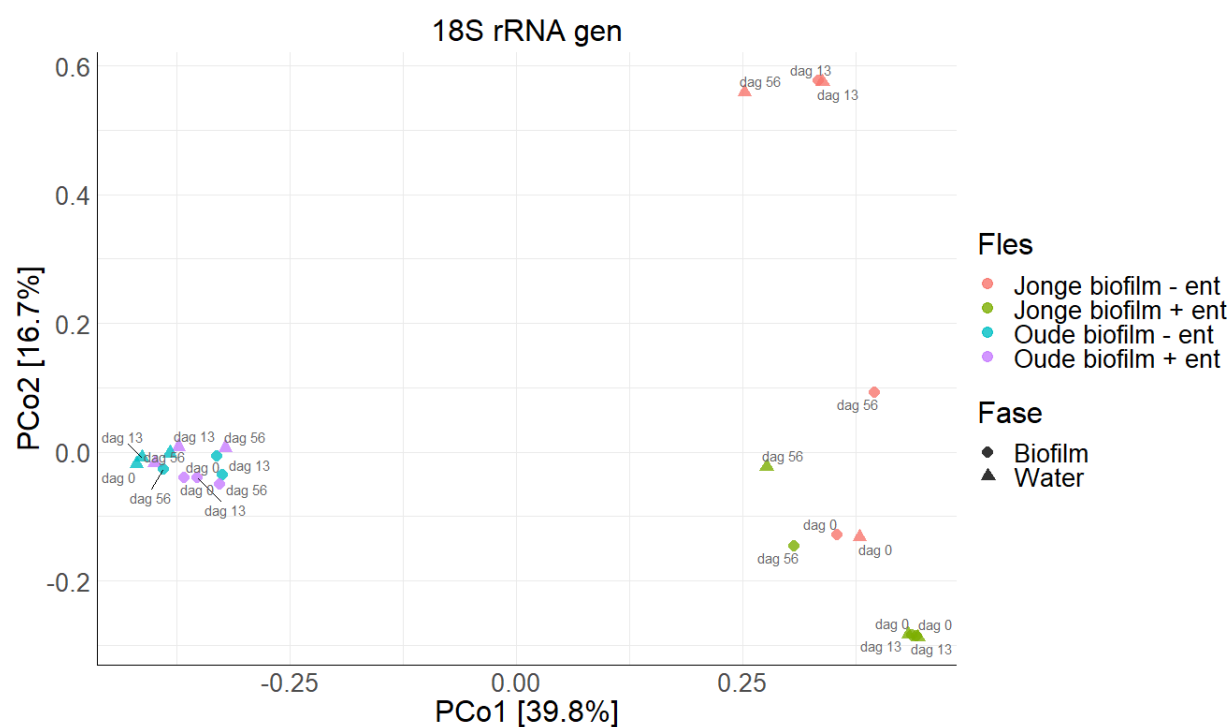


Figuur 3.1 Principale coördinatenanalyse van de bacteriegemeenschap in biofilm en water uit flessen met PVC-P coupons in contact met water. Daarbij zijn *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* gedoseerd op dag 0 aan flessen met PVC-P waar een jonge biofilm op ontwikkeld was en aan flessen met PVC-P waar een oude biofilm op ontwikkeld was. Vervolgens werd op dag 0, 13 en 56 na enten biofilm- en watermonsters geanalyseerd. Des te dichter monsterpunten bij elkaar staan in deze grafiek, des te meer de samenstelling van de bacteriegemeenschap op elkaar lijkt.

De resultaten laten ook zien dat de bacteriegemeenschap in water en biofilm van de 8 dagen oude biofilm (jonge biofilm) veranderde gedurende de 56 dagen incubatie, ongeacht of een ent werd toegevoegd (Figuur 3.4). Uit de aanvullende statistische analyse bleek de verschillen in de samenstelling van de bacteriegemeenschap tussen dag 0 en dag 56, en tussen dag 13 en 56 significant waren met een $p < 0,05$, maar niet met een $p < 0,01$. Daarentegen was de bacteriegemeenschap in water en biofilm van de 128 dagen oude biofilm (oude biofilm) relatief stabiel gedurende de 56 dagen incubatie, ongeacht of een ent was toegevoegd (Figuur 3.4). De verschillen in de bacteriegemeenschap tussen de drie meetmomenten waren voor de oude biofilm dan ook niet significant ($p > 0,05$). Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat een jonge biofilm van 8 tot 64 dagen oud een niet-stabiele bacteriegemeenschap bevat, terwijl een oude oudere biofilm van 128 tot 184 dagen oud een stabiele bacteriegemeenschap bevat.

3.2 Vergelijking van de samenstelling van de eukaryotengemeenschap

De samenstelling van de eukaryotengemeenschap in de biofilm en het water van de flessen waar een ent aan werd toegevoegd waren vergelijkbaar voor de oude biofilm, maar voor de jonge biofilm leken deze van elkaar te verschillen (Figuur 3.2). De PERMANOVA laat zien dat het toevoegen van een ent geen significante invloed had op de bacteriegemeenschap van de biofilm en het water voor de oude en jonge biofilm ($p > 0,01$). De verschillen met en zonder ent bij de jonge biofilm waren op dag 0 klein, maar op dag 13 en 56 waren de verschillen tussen de fles met ent en zonder ent groter. Over het hele traject was het verschil dus niet significant met een p -waarde van 0,01, maar wanneer een p -waarde van 0,05 wordt gehanteerd dan waren de verschillen zonder en met ent bij de jonge biofilm wel significant.



Figuur 3.2 Principale coördinatenanalyse van de eukaryotengemeenschap in biofilm en water uit flessen met PVC-P coupons in contact met water. Daarbij zijn *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* gedoseerd op dag 0 aan flessen met PVC-P waar een jonge biofilm op ontwikkeld was en aan flessen met PVC-P waar een oude biofilm op ontwikkeld was. Vervolgens werd op dag 0, 13 en 56 na enten biofilm- en watermonsters geanalyseerd. Des te dichter monsterpunten bij elkaar staan in deze grafiek, des te meer de samenstelling van de eukaryotengemeenschap op elkaar lijkt.

De samenstelling van de eukaryotengemeenschap in biofilm en water van de jonge biofilm was significant verschillend van die van de oude biofilm (Figuur 3.2; $p < 0,01$). Voor de eukaryotensamenstelling geldt ook dat de biofilmmonsters verschilden in leeftijd tussen jonge en oude biofilm, maar dat het water in beide gevallen een week oud was. Daarbij had het ene water een week in contact gestaan met de oude biofilm en het andere water met de jonge biofilm. De samenstelling van de eukaryoten in het water en de biofilm bemonsterd uit dezelfde fles en op hetzelfde meetmoment waren redelijk vergelijkbaar (met uitzondering van dag 56 voor de jonge biofilm zonder ent) (Figuur 3.2). Uit de statistische analyse volgde echter dat bij de oude biofilm de eukaryotengemeenschap significant verschilde tussen water en biofilm ($p < 0,01$), terwijl dit bij de jonge biofilm niet zo was ($p > 0,01$). Deze resultaten zijn vergelijkbaar met de resultaten voor de bacteriegemeenschap (paragraaf 3.1).

De resultaten laten ook zien dat de eukaryotengemeenschap in water en biofilm van de acht dagen oude biofilm (jonge biofilm) en waar geen ent aan was toegevoegd, veranderde gedurende de 56 dagen incubatie (Figuur 3.5). Daarbij werd met name tussen dag 0 en dag 13 een grote verandering waargenomen, terwijl de eukaryotensamenstelling in de biofilm op dag 56 vergelijkbaar was met die van dag 13. De verschillen in de tijd voor de eukaryotensamenstelling waren echter veel minder groot in water en biofilm van de acht dagen oude biofilm waar wel een ent aan was toegevoegd (Figuur 3.5). In die monsters werd de grootste verandering in de eukaryotensamenstelling waargenomen tussen dag 13 en dag 56. Door het beperkte aantal monsters werd een statistische analyse van het effect van incubatietijd op de jonge biofilm alleen uitgevoerd met de gecombineerde gegevens van de monsters waar wel en niet een ent aan was toegevoegd. De resultaten lieten zien dat de eukaryotensamenstelling van dag 56 dan significant anders was dan die van dag 0 met een $p < 0,05$, maar dat die van dag 13 niet significant anders was van dag 0 of dag 56. De eukaryotengemeenschap in water en biofilm van de

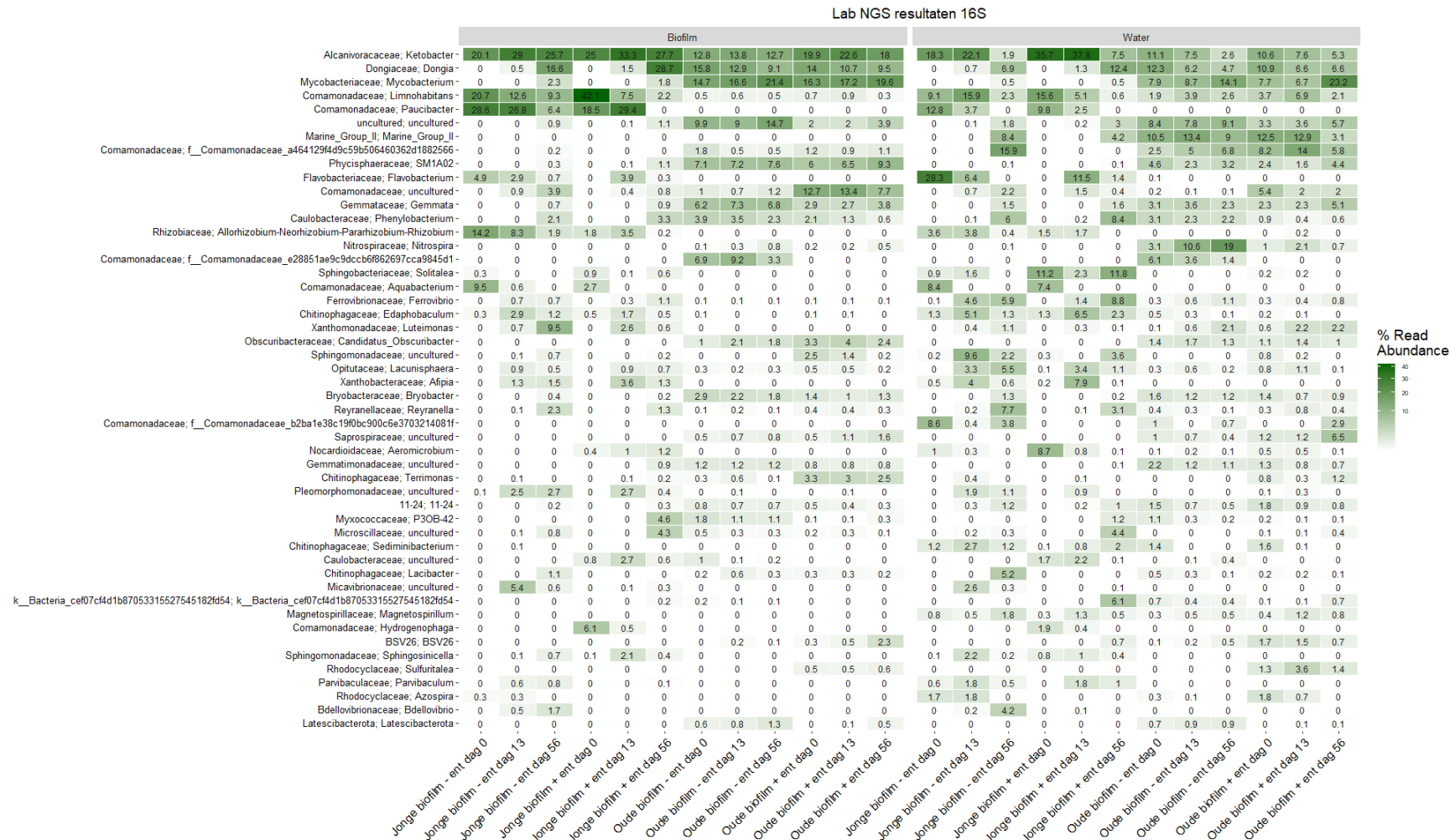
128 dagen oude biofilm (oude biofilm) was relatief stabiel gedurende de 56 dagen incubatie, ongeacht of een ent was toegevoegd (Figuur 3.4). De verschillen in de eukaryotengemeenschap tussen de drie meetmomenten was voor de oude biofilm dan ook niet significant ($p > 0,05$). Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat een jonge biofilm van 8 tot 64 dagen oud een niet-stabiele eukaryotengemeenschap bevat, terwijl een oudere biofilm van 128 tot 184 dagen oud wel een stabiele eukaryotengemeenschap bevat.

3.3 Identificatie en vergelijking bacteriegenera in jonge en oude biofilm

De verkregen 16S rRNA gensequenties werden geïdentificeerd tot genusniveau (indien mogelijk) en de relatieve abundantie van de verschillende geïdentificeerde bacteriegroepen zijn weergegeven in een heatmap-grafiek (Figuur 3.3). Met behulp van die heatmap werd nagegaan welke bacteriegenera meer aanwezig waren in de jonge of oude biofilm.

Wanneer de biofilmmonsters van de jonge en oude biofilm met elkaar werden vergeleken, dan viel op dat de genera *Limnohabitans* en *Paucibacter* met name aanwezig waren in de biofilm van de jonge biofilmmonsters (respectievelijk 7,5 tot 42,1% en 6,4 tot 29,4% relatieve abundantie) en niet of in mindere mate in de biofilm van de oude biofilmmonsters (*Limnohabitans*: 0,3 tot 0,9 % relatieve abundantie; *Paucibacter* < 0,1% relatieve abundantie). In het water was de relatieve abundantie van deze twee genera ook hoger in water dat in contact stond met een jonge biofilm dan in water dat in contact stond met de oude biofilm. Naast deze twee genera, werden meer genera gevonden die met een abundantie van boven de 1% in de biofilm van de jonge biofilmmonsters aanwezig waren, maar die $\leq 0,5\%$ aanwezig waren in de biofilm van de oude biofilmmonsters. Het gaat dan om *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Edaphobaculum*, *Luteimonas* en *Afipia*. Op het genus *Luteimonas* na, waren de relatieve abundanties van deze genera ook hoger in het water met de jonge biofilm dan in het water met de oude biofilm.

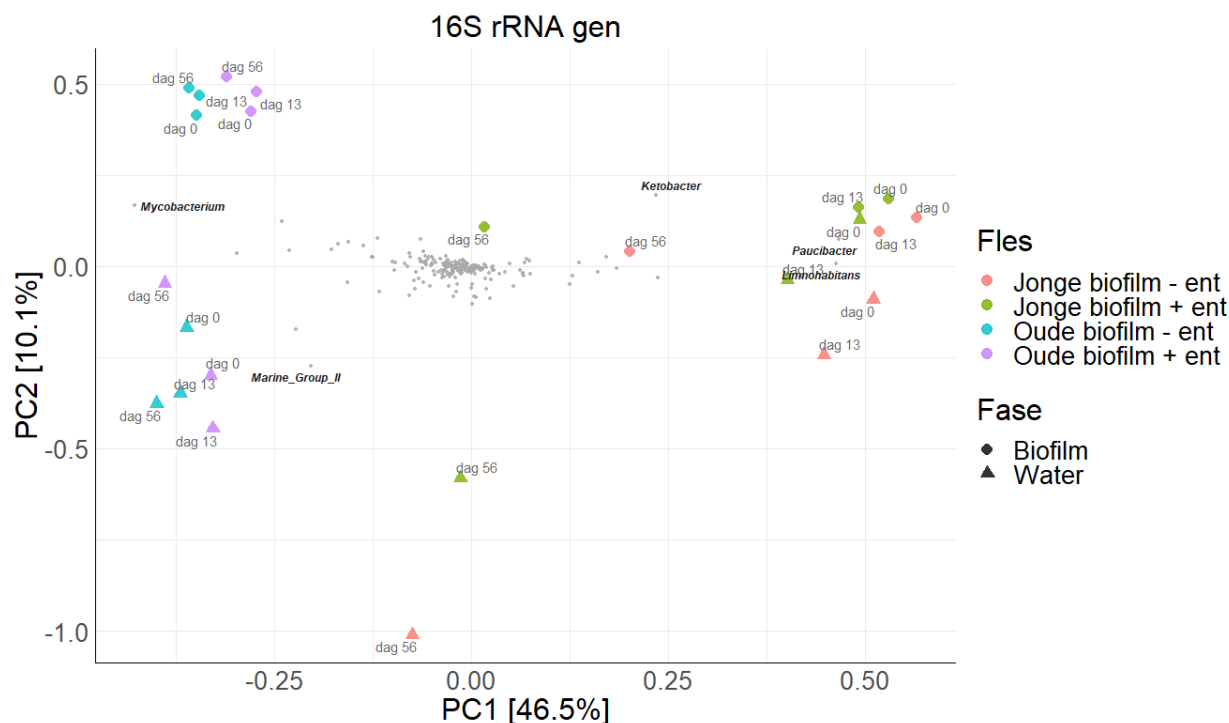
De biofilm van de oude biofilmmonster bevatte daarentegen relatief meer *Mycobacterium* (14,7 tot 21,4% relatieve abundantie), een uncultured group (dit is een bacteriegroep die niet tot een familienaam kon worden geïdentificeerd; 2,0 tot 14,7% relatieve abundantie), Kandidaat genus SM1A02 van de *Phycisphaeraceae* familie (6,0 tot 9,3% relatieve abundantie) en *Gemmata* (2,7 tot 7,3% relatieve abundantie) dan in de biofilm van de jonge biofilmmonsters (< 0,1 tot 2,3%, < 0,1 tot 1,1%, < 0,1 tot 1,1% en < 0,1 tot 0,9% relatieve abundantie, respectievelijk). De relatieve abundantie van dezelfde genera was ook hoger in water met de oude biofilm dan in het water met jonge biofilm. Tevens werden enkele genera gevonden die aanwezig waren met een abundantie van meer dan 1% in de biofilm van de oude biofilmmonsters, maar die $\leq 0,5\%$ aanwezig waren in de biofilm van de jonge biofilmmonsters. Dit waren de genera *Candidatus Obscuribacter* en *Bryobacter*. Deze twee genera vertoonden over het algemeen dezelfde trend in het water met een oude of jonge biofilm. Het genus *Mycobacterium* bevat ook enkele opportunistische ziekteverwekkende soorten, zoals *M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*. In dit onderzoek is niet achterhaald of ziekteverwekkende *Mycobacterium*-soorten aanwezig waren in de biofilm. Eerder onderzoek heeft echter laten zien dat de *Mycobacterium*-soorten die met behulp van 16S rRNA gensequencing zijn aangetroffen in drinkwaterbiofilms in Nederland behoren tot niet-ziekteverwekkende *Mycobacterium*-soorten (van der Wielen et al., 2013).



Figuur 3.3 Resultaten van de heatmapanalyse waarin de relatieve abundantie van verschillende bacterietaxa in de verschillende monsters worden weergegeven.

Voor een belangrijk deel werden dus dezelfde trends waargenomen voor biofilm- en watermonsters wanneer de jonge biofilm met de oude biofilm werd vergeleken. Toch werden ook een aantal genera geïdentificeerd die meer in het water dan in de biofilm aanwezig waren. Zo werd Marine Group II met een relatieve abundantie boven de 5% waargenomen in watermonsters als de biofilm 56 dagen of ouder was, terwijl deze groep < 0,1% aanwezig was in alle biofilmmonsters. De relatieve abundantie van een onbekend genus van de familie *Comamonadaceae* was ook hoger in watermonsters dan in biofilmmonsters, en dan met name in water dat in contact stond met een oude biofilm.

Met behulp van een redundantie-analyse werd ook achterhaald welke genera belangrijk waren om de verschillen tussen de bacteriesamenstellingen van de verschillende monsters te verklaren (Figuur 3.4). Uit deze analyse volgde dat met name *Mycobacterium* verantwoordelijk was voor het verschil in bacteriesamenstelling in biofilm en water tussen de oude biofilm en jonge biofilm. Zoals hierboven beschreven was *Mycobacterium* met een hogere relatieve abundantie aanwezig in de biofilm- en watermonsters van de oude biofilm dan in de jonge biofilm (Figuur 3.3). Een andere waarneming uit de redundantie-analyse was dat de genera *Paucibacter* en *Limnohabitans* veroorzaakten dat de jonge biofilmmonsters (water en biofilm) anders waren dan de oude biofilmmonsters (Figuur 3.4). De heatmapanalyse liet zien dat de relatieve abundantie van deze twee genera hoger waren in de jonge biofilm dan in de oude biofilm (Figuur 3.3). Verder is Marine Group II het genus dat met name zorgt voor een andere bacteriesamenstelling in het water (waar het een hoge relatieve abundantie heeft) ten opzichte van de biofilm (waar het een zeer lage relatieve abundantie heeft) van de oude biofilmmonsters, zoals ook in de heatmapgrafiek werd waargenomen (Figuur 3.3). Het genus *Ketobacter*, ten slotte, veroorzaakte een afwijkende bacteriesamenstelling in de biofilmmonsters ten opzichte van de watermonsters op dag 56 van de jonge biofilm (Figuur 3.4). De relatieve abundantie van *Ketobacter* in het water van deze monsters was beduidend lager dan in de biofilm (Figuur 3.3).



Figuur 3.4 Resultaten van de redundantieanalyse waarin de samenstelling van de bacteriegemeenschap van ieder monster is geplot samen met de verschillende taxa (grijze bolletjes). De taxa die verantwoordelijk zijn voor clustering van de bacteriegemeenschap van de verschillende monsters zijn met naam genoemd.

In slechts twee monsters, drinkwater oude biofilm waaraan *P. aeruginosa* niet is gedoseerd en in jonge biofilm voordat *P. aeruginosa* werd gedoseerd, werden sequenties gevonden die behoorden tot het genus *Pseudomonas*. Dit laat zien dat de aantallen gedoseerde *P. aeruginosa* tijdens het experiment dusdanig laag blijven in het drinkwater en biofilm dat ze niet werden gedetecteerd. Sequenties die behoorden tot het genus *Legionella* werden met name gevonden in het water en biofilm van de flessen met een oude biofilm, maar deze sequenties waren al aanwezig voordat *L. pneumophila* werd gedoseerd. Dus de gedoseerde *L. pneumophila* lijken tijdens het experiment ook dusdanig laag te blijven in water en biofilm dat ze niet door de sequentieanalyse worden gedetecteerd.

3.4 Identificatie en vergelijking eukaryotengenera in jonge en oude biofilm

De verkregen 18S rRNA gensequenties werden ook geïdentificeerd tot genusniveau (indien mogelijk) en de relatieve abundantie van de verschillende geïdentificeerde eukaryotengroepen zijn weergegeven in een andere heatmap-grafiek (Figuur 3.5). Met behulp van die heatmap werd kwalitatief nagegaan welke bacteriegenera meer aanwezig waren in de jonge of oude biofilm.

Wat opvalt is dat een onbekend genus binnen het order *Limnofilida* zeer dominant aanwezig was in de biofilm van de oude biofilm (relatieve abundantie tussen 75,3 en 97,5%), terwijl de relatieve abundantie van dit genus meestal lager dan 0,1% was in de biofilm van de jonge biofilmmonsters. De relatieve abundantie van dit genus in het water dat in contact stond met de oude biofilm was ook hoog (51,6 tot 76,1%), maar lager dan in de biofilm. De order *Limnofilida* behoort tot de protozoa (eencellige dierlijke organismen). In de biofilm van de jonge biofilmmonsters waar geen ent aan werd toegevoegd, domineerde een onbekend genus binnen het order *Dactylopodida* op dag 13 (99,0%) en 56 (67,9%). In het water van deze monsters was de relatieve abundantie van dit onbekende genus vergelijkbaar (98,8 en 73,7%, respectievelijk). *Dactylopodida* behoort ook tot de protozoa.

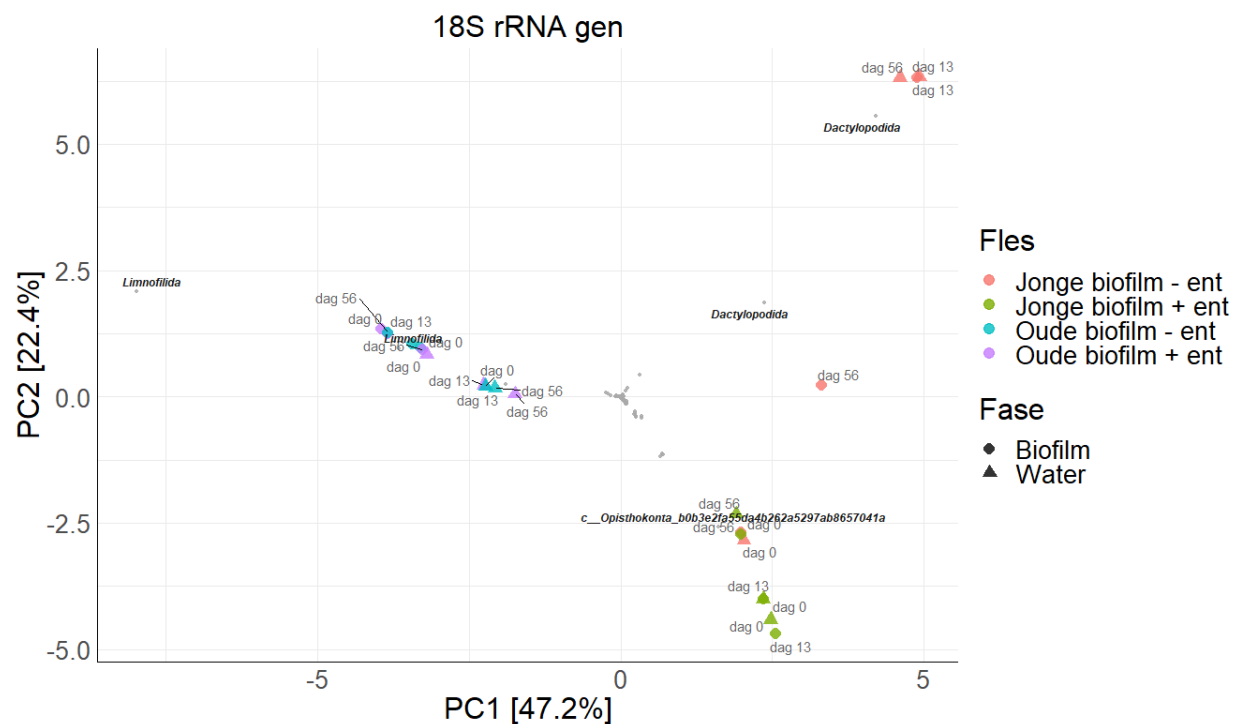
Opvallend is ook dat de relatieve abundantie van dit onbekende genus lager dan 0,1% was in de biofilm en water van de jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd. Daar was de eukaryotensamenstelling meer divers met dominantie van een onbekend genus binnen het rijk *Opisthokonta* (6,2 tot 34,0%), een ander onbekend genus binnen het rijk *Opisthokonta* (22,5%), en verschillende onbekende genera binnen het domein *Eukaryota* (6,9 tot 29,9%). Zowel het rijk *Opisthokonta* als het domein *Eukaryota* bevatten protozoa, fungi en meercellige dierlijke organismen. Over het algemeen werden deze genera ook waargenomen in het water dat in contact stond met de jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd.

In het water dat in contact stond met de oude biofilm was de relatieve abundantie van een genus binnen het rijk *Stramenophiles* hoog (15,6 tot 42,4%), terwijl deze niet werden waargenomen in het water dat in contact stond met de jonge biofilm. In de biofilm van de oude biofilmmonsters werd dit genus ook gevonden, maar met een lage abundantie (0,9 tot 2,7%). *Stramenophiles* bevatten fototrofe en heterotrofe protozoa.

De redundantieanalyse laat zien dat het genus dat behoorde tot het order *Limnofilida* met name belangrijk was in de andere eukaryotensamenstelling van de oude biofilm dan die van de jonge biofilm (Figuur 3.6). Daarbij werd waargenomen dat dit genus in veel hogere relatieve abundantie aanwezig was in de oude dan in de jonge biofilm (Figuur 3.5). Daarnaast was het genus dat behoort tot het order *Dactylopodida* verantwoordelijk voor het verschil tussen de jonge biofilm waar geen ent aan was toegevoegd (hoge relatieve abundantie) en de oude biofilm of de jonge biofilm waar wel een ent aan was toegevoegd (lage relatieve abundantie). Tot slot was één van de genera van het rijk *Opisthokonta* verantwoordelijk voor het verschil in eukaryotensamenstelling van de jonge biofilm met ent en de jonge biofilm zonder ent op dag 0 (hoge relatieve abundantie) met de oude biofilm en de jonge biofilm zonder ent op dag 13 en 56 (lage relatieve abundantie).



Figuur 3.5 Resultaten van de heatmapanalyse waarin de relatieve abundantie van verschillende eukaryotentaxa in de verschillende monsters worden weergegeven.



Figuur 3.6 Resultaten van de redundantieanalyse waarin de samenstelling van de bacteriegemeenschap van ieder monster is geplot samen met de verschillende taxa (grijze bolletjes). De taxa die verantwoordelijk zijn voor clustering van de bacteriegemeenschap van de verschillende monsters zijn met naam genoemd.

4 ATP, *P. aeruginosa* en *L. pneumophila*

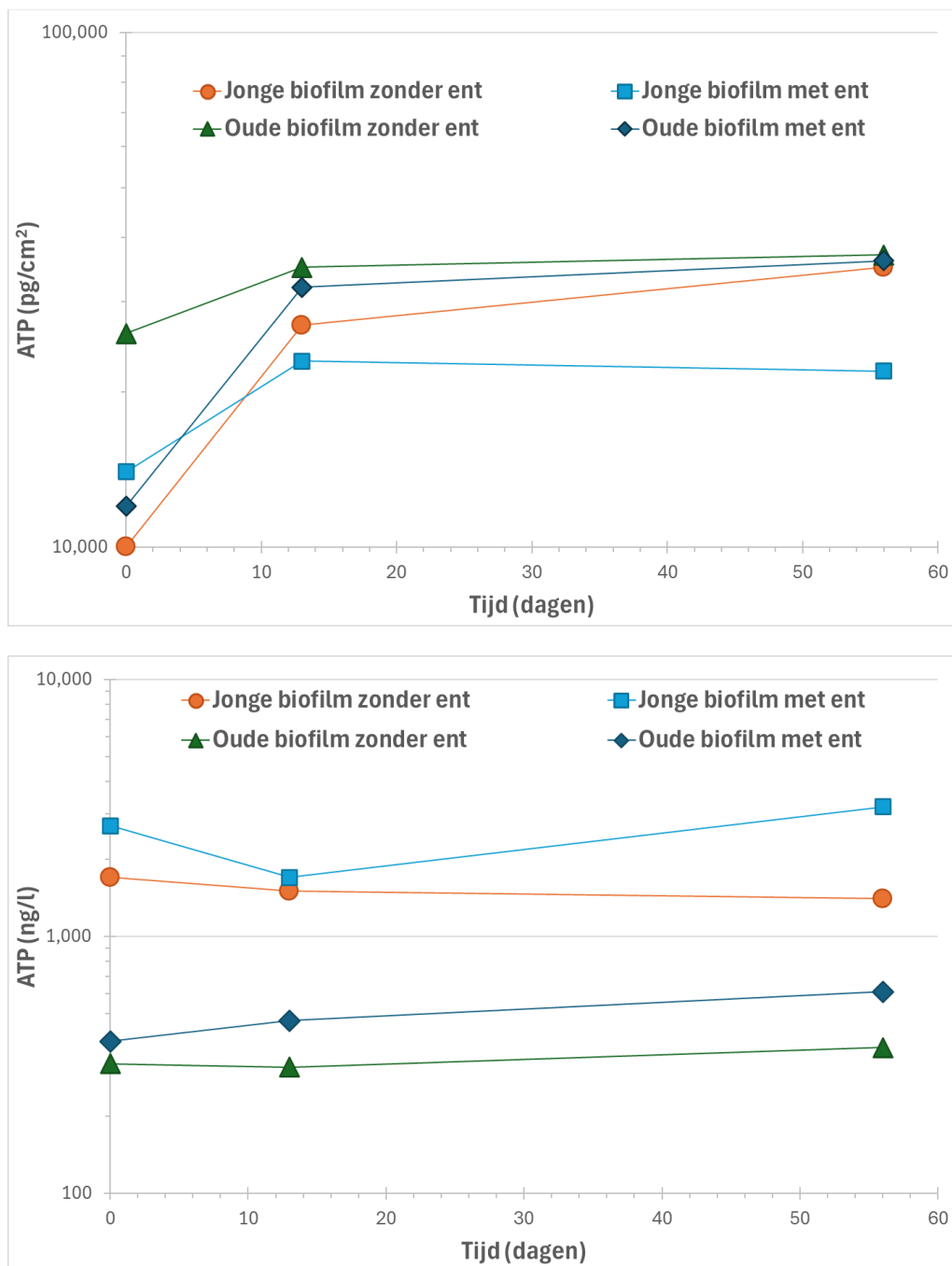
4.1 ATP

De ATP-concentratie van de biofilm op PVC-P was zoals verwacht hoog (Figuur 4.1), doordat PVC-P een materiaal is dat veel groeibevorderende stoffen afgeeft. Op dag 0 was de jonge biofilm acht dagen en de oude biofilm 128 dagen oud en was er nog geen ent aan de flessen toegevoegd, zodat op dat moment duplo waarden werden verkregen voor de jonge en de oude biofilm. De ATP-concentratie van de jonge biofilm was vergelijkbaar tussen deze twee duplo flessen op dag 0, terwijl de ATP-concentratie van de oude biofilm varieerde tussen de twee flessen (Figuur 4.1 en Tabel 4.1). Eén van de twee flessen met de oude biofilm had een vergelijkbare ATP-concentratie in de biofilm als die met de jonge biofilm werd verkregen. In de andere fles met de oude biofilm was de ATP-concentratie van de biofilm op dag 0 hoger dan de ATP-concentraties van de jonge biofilm. Gedurende de monitoringsperiode van 56 dagen nam de ATP-concentratie van de biofilm bij alle flessen nog wat verder toe, ongeacht of een ent was toegevoegd aan de flessen op dag 0. Na 56 dagen had de jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd een lagere ATP-concentratie dan die waar geen ent was toegevoegd en dan die van de oude biofilms.

De ATP-concentratie van het water liet een ander beeld zien (Figuur 4.1 en Tabel 4.1). Op dag 0, dus voordat een ent was toegevoegd, was de ATP-concentratie van het water ongeveer zes keer hoger in de flessen met PVC-coupons waar een jonge biofilm aanwezig was dan die waar een oude biofilm aanwezig was. Doordat de ATP-concentratie van de jonge biofilm lager of vergelijkbaar was met de ATP-concentratie van de oude biofilms, is het niet waarschijnlijk dat dit verschil wordt verklaard door meer ATP-afgifte van de biofilm naar het water in de flessen met een jonge biofilm. Op dag 0 was het drinkwater van de flessen met de oude biofilm al 18 keer ververs, terwijl het drinkwater van de flessen met de jonge biofilms nog niet was ververs. Mogelijk dat PVC-P in het begin meer groeibevorderende stoffen aan het drinkwater afgaf dan wanneer het geruimere tijd in contact met water stond en dat water periodiek was ververs. Dit zou bijvoorbeeld kunnen komen omdat op nieuw PVC-P nog geen biofilm was ontwikkeld die (een deel van) deze groeibevorderende stoffen opnam voordat het in het water terecht kwam. Gedurende de monitoringsperiode van 56 dagen bleven de ATP-concentraties van het water constant, wat laat zien dat tijdens deze periode de PVC-P coupons in de flessen met een jonge biofilm waarschijnlijk nog steeds meer groeibevorderende stoffen aan het water afgaf dan de PVC-P coupons in de flessen met de oude biofilm.

Tabel 4.1 De ATP-concentratie van de biofilm op PVC-P en van het water dat in contact staat met PVC-P. De PVC-P coupons bevatten een jonge biofilm of een oude biofilm waar wel of niet een ent van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan is toegevoegd.

Tijd (dagen)	ATP biofilm (pg/cm ²)				ATP water (ng/l)			
	Jonge biofilm		Oude biofilm		Jonge biofilm		Oude biofilm	
	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent
0	1,4×10 ⁴	1,0×10 ⁴	1,2×10 ⁴	2,6×10 ⁴	2.700	1.700	390	320
13	2,3×10 ⁴	2,7×10 ⁴	3,2×10 ⁴	3,5×10 ⁴	1.700	1.500	470	310
56	2,2×10 ⁴	3,5×10 ⁴	3,6×10 ⁴	3,7×10 ⁴	3.200	1.400	610	370

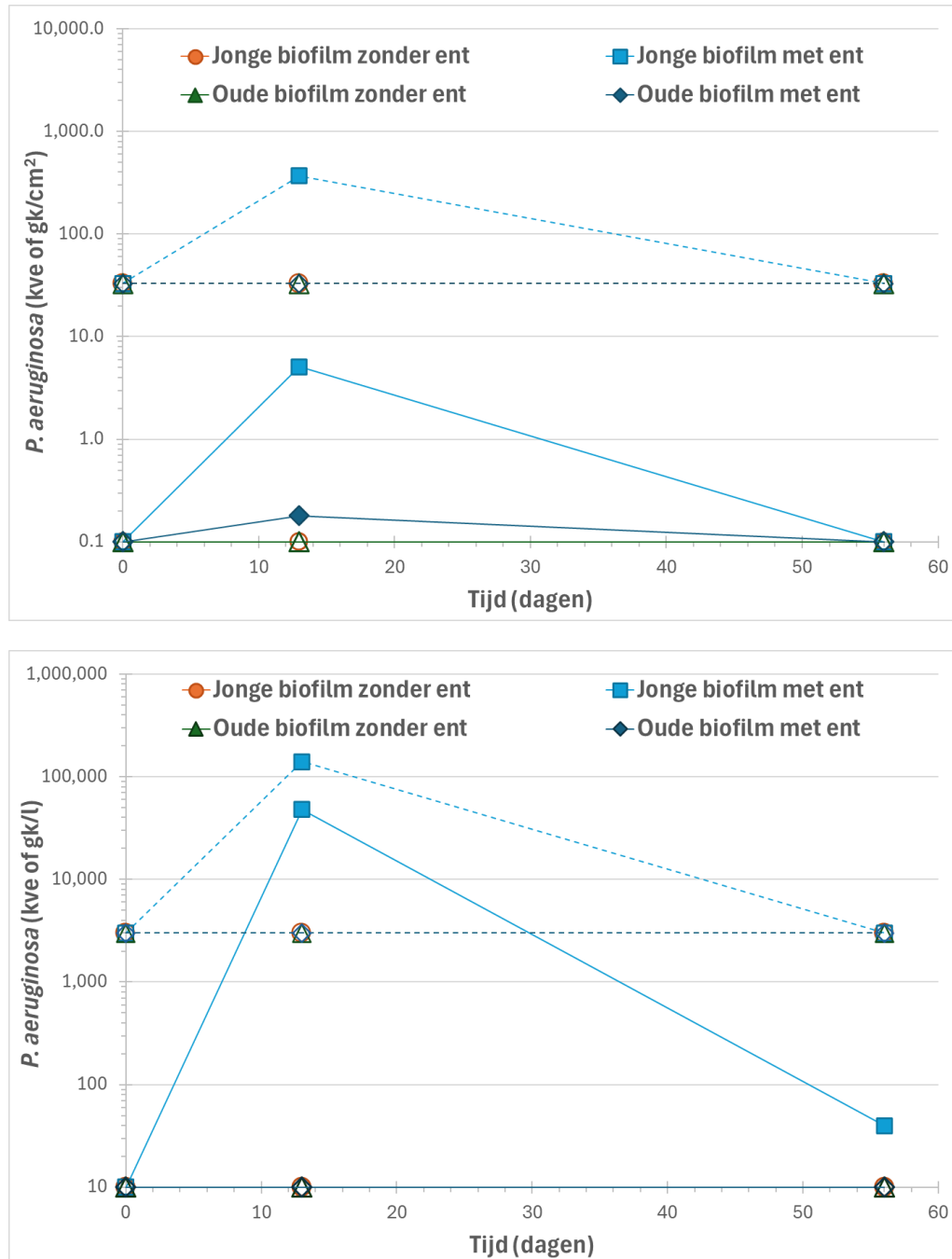


Figuur 4.1 De ATP-concentratie van de biofilm op PVC-P (boven) en van het water dat in contact staat met PVC-P (onder). De PVC-P coupons bevatten een jonge biofilm of een oude biofilm waar wel of niet een ent van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan is toegevoegd.

4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

In de flessen waar geen ent aan was toegevoegd, werd *P. aeruginosa* niet boven de detectiegrens van de kweek- of qPCR-methode waargenomen (Figuur 4.2 en Tabel 4.2). De hoogste aantallen *P. aeruginosa* in de biofilm werden op dag 13 aangetroffen in de fles met een jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd, maar met 5 kve/cm² en 370 gk/cm² bleven de aantallen zeer laag. Op dezelfde dag werden kweekbare *P. aeruginosa* ook in de oude biofilm met ent aangetroffen, maar de aantallen waren net boven de detectiegrens en lager dan in de jonge biofilm met

ent. Daarnaast lag het aantal genkopieën in de oude biofilm met ent onder de detectiegrens (33 gk/cm^2). Na 56 dagen incubatie werd echter in geen van de flessen *P. aeruginosa* boven de detectiegrens in de biofilm gevonden.



Figuur 4.2 De aantallen *P. aeruginosa* in de biofilm op PVC-P (boven) en van het water dat in contact staat met PVC-P (onder). De PVC-P coupons bevatten een jonge biofilm of een oude biofilm waar wel of niet een ent van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan is toegevoegd. Gesloten symbolen: gemeten waarden; Open symbolen: lager dan de onderste detectiegrens. Ononderbroken lijn: kweekbare *P. aeruginosa* in kve/cm² of kve/l; Stippellijn: genkopieën (gk) van *P. aeruginosa* in gk/cm² of gk/l. Het monster op t=0 is genomen vlak voordat *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan de flessen werden toegevoegd.

In het water werd *P. aeruginosa* alleen aangetroffen in de fles met een jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd (Figuur 4.2 en Tabel 4.2) en deze aantallen waren hoog op dag 13 ($4,8 \times 10^4$ kve/l en $1,4 \times 10^5$ gk/l). Na 56 dagen incubatie waren de aantallen in dit water echter weer met ongeveer 3 logeenheden gedaald. Gezien de lage aantallen *P. aeruginosa* in de jonge biofilm met ent maar de hoge aantallen in het water van deze fles, is het aannemelijk dat *P. aeruginosa* zich niet in de biofilm maar in het water wist te vermeerderen. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door de relatief hoge concentratie groeibevorderende stoffen die uit de PVC-P coupons in het water terecht kwamen (en ook verantwoordelijk waren voor de hogere ATP-concentratie in dit water, zoals beschreven in paragraaf 4.1). Dit zou kunnen betekenen dat de samenstelling van de microbiële populatie op de jonge biofilm verhinderde dat *P. aeruginosa* zich in de biofilm kon vermeerderen, terwijl de microbiële populatie in het water dat in contact stond met de jonge biofilm groei van *P. aeruginosa* niet of nauwelijks verhinderde. Daarnaast laat de afname van *P. aeruginosa* tussen dag 13 en 56 zien dat *P. aeruginosa* niet in staat was zich in het water te handhaven, ondanks dat gedurende dezelfde periode de ATP-concentratie van het water met de jonge biofilm onverminderd hoog bleef. Daarmee lijkt *P. aeruginosa* een pionierssoort te zijn, die later werd verdrongen door andere micro-organismen in het water.

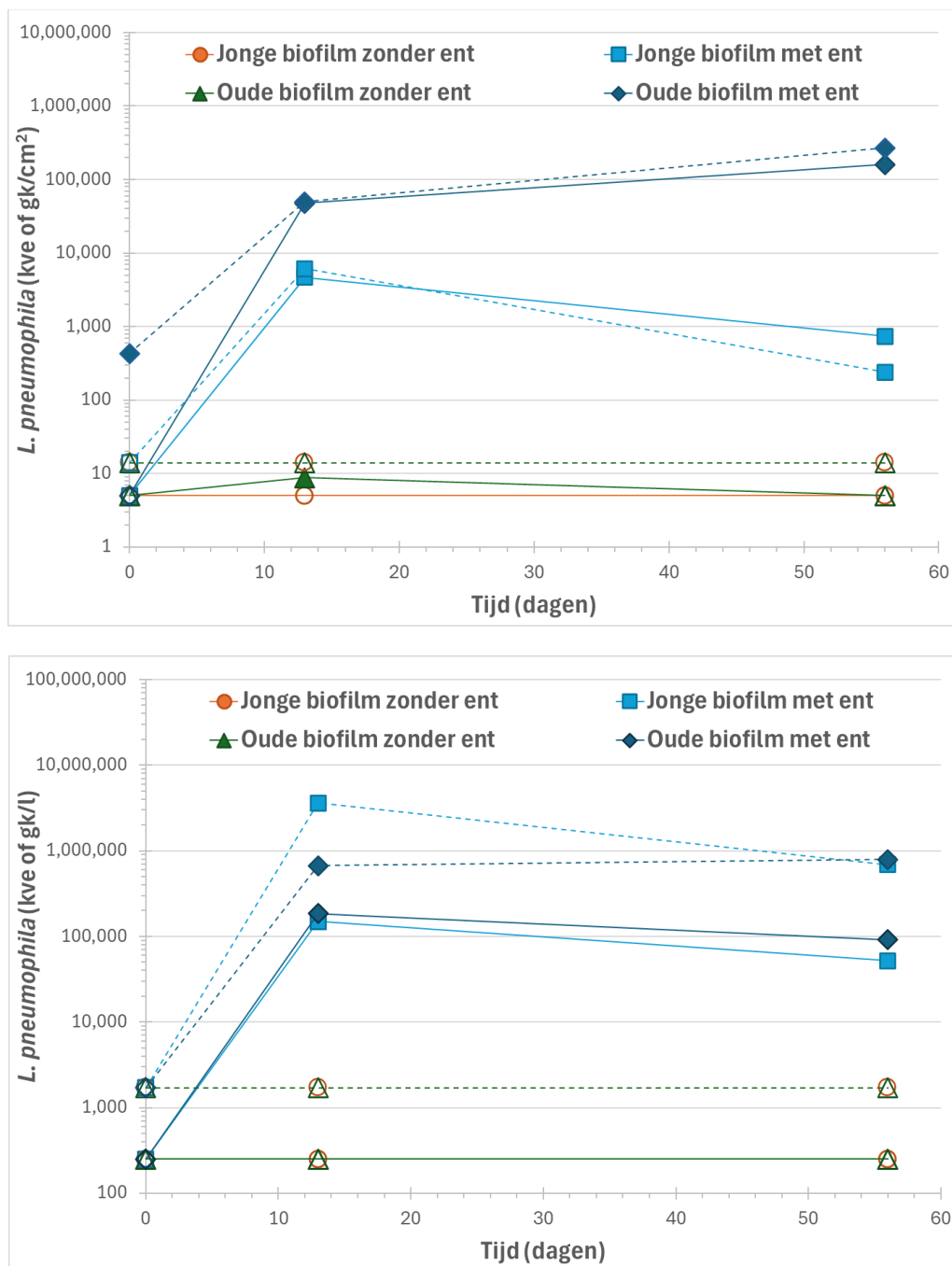
Tabel 4.2 De aantallen *P. aeruginosa* in de biofilm op PVC-P en van het water dat in contact staat met PVC-P. De PVC-P coupons bevatten een jonge biofilm of een oude biofilm waar wel of niet een ent van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan is toegevoegd.

<i>P. aeruginosa</i> (kve/cm ²)					<i>P. aeruginosa</i> (kve/l)			
Tijd (dagen)	Jonge biofilm		Oude biofilm		Jonge biofilm		Oude biofilm	
	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent
0	< 0,34	< 0,32	< 0,35	< 0,33	< 10	< 10	< 10	< 10
13	5,1	< 0,17	0,18	< 0,18	$4,8 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10
56	< 0,16	< 0,16	< 0,16	< 0,16	40	< 10	< 10	< 10

<i>P. aeruginosa</i> (gk/cm ²)					<i>P. aeruginosa</i> (gk/l)			
Tijd (dagen)	Jonge biofilm		Oude biofilm		Jonge biofilm		Oude biofilm	
	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent
0	< 11	< 14	< 19	< 14	< 870	< 680	< 800	< 780
13	$3,70 \times 10^2$	< 17	< 18	< 23	$1,4 \times 10^5$	< 920	< 1.800	< 1.100
56	< 18	< 21	< 33	< 23	< 3.000	< 2.800	< 2.700	< 2.100

4.3 *Legionella pneumophila*

In de flessen waar *L. pneumophila* niet aan was toegevoegd, waren de aantallen *L. pneumophila* over het algemeen onder de detectiegrens met de kweek en de qPCR-methode (Figuur 4.3 en Tabel 4.3). De enige uitzondering was op dag 13 bij de fles met een oude biofilm waar geen *L. pneumophila* aan was gedoseerd. Daar waren de aantallen kweekbare *L. pneumophila* in de biofilm met $8,8$ kve/cm² net boven de detectiegrens van 5 kve/cm² en dit correspondeerde met één kolonievormende eenheid van *L. pneumophila* op de agarplaat. Het aantal genkopieën van *L. pneumophila* lag in dit monster wel onder de detectiegrens van 14 gk/cm². In de flessen waar *L. pneumophila* wel aan was toegevoegd, werd duidelijke groei van *L. pneumophila* in de biofilm waargenomen, wat ook resulteerde tot hogere aantallen in het water. De aantallen kweekbare *L. pneumophila* waren het hoogst in de oude biofilm met een maximum van $1,6 \times 10^5$ kve/cm² en $2,7 \times 10^5$ gk/cm² op dag 56. De maximale aantallen in de jonge biofilm waren lager ($4,7 \times 10^3$ kve/cm² en $6,1 \times 10^3$ gk/cm²) en werden op dag 13 waargenomen. In het water verschilden de aantallen *L. pneumophila* niet veel tussen de flessen met een oude en jonge biofilm waaraan *L. pneumophila* was gedoseerd (Figuur 4.3 en Tabel 4.3). In beide gevallen werden de hoogste aantallen waargenomen op dag 13.



Figuur 4.3 De aantallen kweekbare *L. pneumophila* in de biofilm op PVC-P (boven) en van het water dat in contact staat met PVC-P (onder). De PVC-P coupons bevatten een jonge biofilm of een oude biofilm waar wel of niet een ent van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan is toegevoegd. Gesloten symbolen: gemeten waarden; Open symbolen: lager dan de onderste detectiegrens of hoger dan de bovenste detectiegrens. Ononderbroken lijn: kweekbare *L. pneumophila* in kve/cm² of kve/l; Stippellijn: genkopieën (gk) van *L. pneumophila* in gk/cm² of gk/l. Het monster op t=0 is genomen vlak voordat *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan de flessen werden toegevoegd.

Tabel 4.3 De aantallen *L. pneumophila* in de biofilm op PVC-P en van het water dat in contact staat met PVC-P. De PVC-P coupons bevatten een jonge biofilm of een oude biofilm waar wel of niet een ent van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* aan is toegevoegd.

<i>L. pneumophila</i> (kve/cm ²)					<i>L. pneumophila</i> (kve/l)			
Tijd (dagen)	Jonge biofilm		Oude biofilm		Jonge biofilm		Oude biofilm	
	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent
0	< 5,6	< 5,3	< 5,9	< 5,5	< 250	< 250	< 250	< 250
13	4,7×10 ³	< 5,6	4,8×10 ⁴	8,8	> 1,5×10 ⁵	< 250	1,9×10 ⁵	< 250
56	7,4×10 ²	< 6,0	1,6×10 ⁵	< 5,8	5,2×10 ⁴	< 250	9,1×10 ⁴	< 250

<i>L. pneumophila</i> (gk/cm ²)					<i>L. pneumophila</i> (gk/l)			
Tijd (dagen)	Jonge biofilm		Oude biofilm		Jonge biofilm		Oude biofilm	
	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent	+ ent	- ent
0	< 6,9	< 8,6	4,3×10 ²	< 8,3	< 520	< 410	< 480	< 470
13	6,1×10 ³	< 10	5,0×10 ⁴	< 14	3,6×10 ⁶	< 550	6,7×10 ⁵	< 630
56	2,4×10 ²	< 12	2,7×10 ⁵	< 14	6,9×10 ⁵	< 1700	7,9×10 ⁵	< 1200

L. pneumophila was dus in staat zich te vermeerderen in een jonge en oude biofilm, waarbij groei in de oude biofilm leidde tot hogere aantallen dan groei in de jonge biofilm. Doordat dit verschil in groei geen verschil veroorzaakte in het water waar de jonge en oude biofilm aan zijn blootgesteld, lijkt het erop dat de jonge biofilm een hogere uitwisseling van *L. pneumophila* naar het water had dan de oudere biofilm. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat *L. pneumophila* zowel een niet-stabiele jonge biofilm als stabiele oude biofilm kan koloniseren en zich vervolgens weet te vermeerderen.

Bij zowel *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* werd over het algemeen waargenomen dat het aantal genkopieën per cm² of per liter hoger waren dan het aantal kolonievormende eenheden (Figuur 4.2 en 4.3, Tabel 4.2 en 4.3). Dit is in eerdere studies ook waargenomen en wordt veroorzaakt doordat iedere bacteriecel meerdere gen- en genoomkopieën kan hebben (Wullings en Heijnen, 2017).

5 Discussie

Als eerste dient in de discussie te worden opgemerkt dat het uitgevoerde onderzoek een verkennende studie was. Hierdoor werden de experimenten slechts in enkelvoud ingezet, met één leidingmateriaal dat een hoge groeipotentie heeft en met één *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* stam. Hierdoor zijn de resultaten ten aanzien van weerbaarheid van biofilm tegen kolonisatie en groei van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* indicatief. Dit geldt ook voor de analyses die werden gedaan om te achterhalen of bepaalde bacterie- of eukaryotengroepen een rol spelen bij de weerbaarheid tegen kolonisatie en groei van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila*. Tot slot zijn de resultaten van de 16S/18S rRNA gensequencing met relatief eenvoudige (statistische) methoden onderzocht en voor een belangrijk deel ook alleen beschrijvend, waardoor ook deze data voornamelijk indicatief zijn.

5.1 Effect leeftijd biofilm op microbiële gemeenschap inclusief *P. aeruginosa* en *L. pneumophila*

Uit de resultaten beschreven in hoofdstuk 3 wordt geconcludeerd dat een jonge biofilm (8 tot 64 dagen oud) een niet-stabiele bacterie- en protozoëngemeenschap heeft, terwijl een oude biofilm (128 tot 184 dagen oud) dat wel heeft. Daarnaast wordt geconcludeerd dat ook het water in contact met een jonge biofilm een niet-stabiele microbiële samenstelling heeft, terwijl water in contact met een oude biofilm dat wel heeft. Deze resultaten zijn in lijn met eerdere studies, waar ook werd gezien dat in de tijd de microbiële samenstelling van een biofilm in drinkwatersystemen zich ontwikkelde naar een stabiele situatie (Abkar et al. 2024).

Uit de resultaten beschreven in hoofdstuk 4 is gebleken dat het gedrag verschilde tussen *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* in relatie tot kolonisatie en groei in een jonge en oude biofilm. In de oude biofilm (en water in contact met de oude biofilm) werd *P. aeruginosa* niet aangetroffen, wat laat zien dat een oude stabiele biofilm weerbaar lijkt tegen kolonisatie en groei van *P. aeruginosa*. In de jonge biofilm werd *P. aeruginosa* wel aangetroffen boven de detectiegrens, maar dit was alleen op dag 13 en de aantallen waren laag. Op dezelfde dag werden wel relatief hoge aantallen van *P. aeruginosa* aangetroffen in het water dat in contact stond met de jonge biofilm. Eerder onderzoek heeft laten zien dat deze *P. aeruginosa* stam in staat is om zich te vermeerderen in drinkwater alsook in de biofilm op PVC-P (van der Wielen, 2014). Het resultaat van de resilience-experimenten laat daarom zien dat de microbiële populatie in water dat in contact staat met een jonge biofilm niet weerbaar lijkt tegen kolonisatie van *P. aeruginosa*, maar dat de jonge biofilm zelf wel weerbaar is tegen substantiële vermeerdering van *P. aeruginosa* in de biofilm. In tegenstelling tot *P. aeruginosa* werd *L. pneumophila* in hoge aantallen aangetroffen in de jonge en oude biofilm. Zowel de niet-stabiele jonge biofilm als de stabiele oude biofilm lijkt dus niet weerbaar tegen kolonisatie en groei van *L. pneumophila*.

Het verschil tussen deze twee organismen wordt waarschijnlijk veroorzaakt door fysiologische kenmerken van beide opportunistische ziekteverwekkers en de manier waarop ze zich in de biofilm vermeerderen. Vanuit eerder onderzoek is bekend dat *P. aeruginosa* met name een pionierssoort is, die snel kan opkomen in de biofilm of water als door een verstoring de nutriëntenconcentratie toeneemt (Dogruez et al. 2009; van der Wielen et al. 2023). Daarna nemen de aantallen dan weer vaak af, doordat andere bacteriesoorten *P. aeruginosa* wegconcurreren (van der Wielen et al. 2023). In eerdere BTO-studie werd ook waargenomen dat de hoogste aantallen *P. aeruginosa* op nieuw leidingmateriaal werden waargenomen tussen dag 0 en 7, waarna de aantallen afnamen (van der Wielen et al., 2023). De resultaten geven een eerste aanwijzing dat *P. aeruginosa* zich mogelijk alleen weet te vermeerderen in drinkwatersystemen wanneer een verstoring optreedt die de bacteriesamenstelling instabiel maakt. In de uitgevoerde experimenten was deze verstoring echter wel groot, doordat een schoon materiaal met een zeer hoge groeipotentie in contact werd gebracht met drinkwater. Onduidelijk blijft of kleinere verstoringen in het drinkwatersysteem, bijvoorbeeld door wisseling in nutriëntenaanbod, temperatuur, hydraulica, ook kan leiden tot

kolonisatie en groei van *P. aeruginosa*. Om dat vast te stellen zijn aanvullende experimenten nodig. De informatie uit dergelijk onderzoek kan gebruikt worden om na te gaan bij welke type verstoringen een risico optreedt voor vermeerdering van *P. aeruginosa*, zodat over beheersmaatregelen nagedacht kan worden die verhinderen dat problematische verstoringen in het watersysteem optreden.

L. pneumophila vermeerderd zich in protozoa die op de biofilm grazen en is daardoor afhankelijk of voldoende gastheerprotozoa aanwezig zijn (Kuiper et al. 2004). Eerder onderzoek heeft laten zien dat de biofilmconcentratie voldoende hoog moet zijn ($> 50 - 100 \text{ pg ATP/cm}^2$) om voldoende gastheerprotozoa te krijgen voor vermeerdering van *L. pneumophila*. Daarnaast werd gezien dat met toenemende biofilmconcentratie de aantallen *L. pneumophila* ook toenamen, waarschijnlijk doordat met toenemende biofilmconcentratie ook de gastheerprotozoa voor *L. pneumophila* toenamen (van der Kooij et al., 2017). Doordat in onze studie de biofilmconcentratie altijd beduidend hoger was dan 100 pg ATP/cm^2 , werd groei van *L. pneumophila* niet geremd, ongeacht of de biofilm een stabiele of instabiele microbiële samenstelling had. De beduidend hogere aantallen *L. pneumophila* in de oude biofilm dan in de jonge biofilm heeft misschien wel een relatie met de samenstelling van de microbiële gemeenschap, omdat de biofilmconcentratie tussen de jonge en oude biofilm niet veel verschilde. In een eerdere studie werd ook waargenomen dat vermeerdering van *L. pneumophila* kan plaatsvinden onder stabiele condities en een stabiele microbiële gemeenschap in biofilmmonitoren (van der Kooij et al. 2017). Tevens werd waargenomen dat *L. pneumophila* zich ook vermeerderde na een verstoring veroorzaakt door een kortdurende desinfectie (Temmerman et al. 2006).

5.2 Zijn er bepaalde micro-organismen die kolonisatie en vermeerdering van *P. aeruginosa* of *L. pneumophila* verhinderen?

Doordat vermeerdering van *P. aeruginosa* optrad in monsters waar geen stabiele microbiële gemeenschap in aanwezig was en dat in biofilms met een stabiele microbiële samenstelling de aantallen *L. pneumophila* hoger waren dan in biofilms met een instabiele microbiële samenstelling, werd onderzocht of bepaalde bacterie- of eukaryotengroepen konden worden geïdentificeerd die daarbij een rol speelden.

5.2.1 Relatie *P. aeruginosa* met bacterie- en/of protozoesamenstelling

P. aeruginosa werd waargenomen op dag 13 in de biofilm en het water en op dag 56 in het water van de jonge biofilm met ent. De aantallen op dag 13 in de biofilm waren $5,1 \text{ kve/cm}^2$ en in het water $4,8 \times 10^4 \text{ kve/l}$. Op dag 13 was in totaal 100 cm^2 aan PVC-oppervlakte en 600 ml aan water in de flessen aanwezig. In de flessen met de jonge biofilm en ent was daardoor het totaal aantal kweekbare *P. aeruginosa* in de biofilm 510 kve, terwijl in het water van deze fles 28.800 kve *P. aeruginosa* aanwezig was. Zoals eerder geconcludeerd trad de groei van *P. aeruginosa* met name op in het water en niet zozeer in de biofilm. De afname van het aantal *P. aeruginosa* bacteriën in het water tussen dag 13 en dag 56 in de fles met een jonge biofilm, suggereert dat tussen dag 13 en dag 56 de omstandigheden voor groei van *P. aeruginosa* in het water sterk afnamen. Daarom werd specifiek onderzocht of tussen dag 13 en dag 56 in het water bepaalde bacteriegroepen (Tabel 5.1) of eukaryotengroepen (Tabel 5.2) opkwamen of afnamen in de fles met een jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd.

Zes verschillende bacteriëngenera en één archaeagenus werden geïdentificeerd die een hogere relatieve abundantie hadden op dag 56 (toen groei van *P. aeruginosa* werd geremd) dan op dag 13 (toen de aantallen *P. aeruginosa* het hoogst waren) in het water van de jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd (Tabel 5.1). Twee van deze zeven prokaryotengenera (*Dongia* en Marine Group II) lieten ook een hoge relatieve abundantie zien in het water van de oude biofilm, wat laat zien dat deze twee genera dominant in het water bleven gedurende de hele onderzoeksperiode van 184 dagen. Bij de andere vijf genera was de relatieve abundantie in het water met de oude biofilm lager dan in het water op dag 56 met de jonge biofilm. Deze resultaten laten zien dat de relatieve abundantie van deze genera in het water afnamen wanneer de biofilm ouder werd. Prokaryotensoorten die tot

deze zeven genera horen, zijn over het algemeen aeroob (groeien met zuurstof) en heterotroof (oxideren organisch koolstof voor hun energievoorziening), wat ook verwacht mag worden op basis van het ecosysteem.

Tabel 5.1 Zes bacteriegenera en één archaeagenus die in relatieve abundantie verschilden tussen de jonge en oude biofilm.

Genus	Relatieve abundantie (%)			Type organismen
	Dag 13	Dag 56	Oude biofilm	
<i>Dongia</i>	1,3	12,4	4,7 – 12,3	Aeroob, heterotroof, bacterie
Marine Group II	0,2	3,0	3,1 – 13,4	Aeroob, heterotroof, archaea
<i>Phenylobacterium</i>	0,2	8,4	0,4 – 3,1	Aeroob, heterotroof, bacterie
<i>Ferrovibrio</i>	1,4	8,8	0,3 – 1,1	Facultatief anaeroob tot aeroob, heterotroof met NO ₃ of O ₂ , bacterie
<i>Reyranella</i>	0,1	3,2	0,1 – 0,8	Aeroob, heterotroof, bacterie
Onbekend binnen familie <i>Microscillaceae</i>	< 0,1	4,4	< 0,1 – 0,4	Onbekend, onbekend, bacterie
Onbekend binnen rijk <i>Bacteria</i>	< 0,1	6,1	0,1 – 0,7	Onbekend, onbekend, bacterie

Om na te gaan of soorten behorende tot deze genera in het verleden zijn geassocieerd met het beperken van groei van *P. aeruginosa* of andere bacteriën werd in de wetenschappelijke literatuurdatabase Scopus gezocht waarbij de naam van ieder genus afzonderlijk werd gecombineerd met *aeruginosa*, competitie of antibacterieel. Alleen voor het genus *Reyranella* werd een artikel gevonden, waarin werd aangetoond dat *Reyranella* niet de groei van *P. aeruginosa* beperkte, maar wel de capaciteit van *P. aeruginosa* om op een agarplaat te zwermen (Lee and Kim, 2024). *Reyranella* vormt daarbij moleculen die zijn geïdentificeerd binnen de cel-tot-celcommunicatie tussen bacteriesoorten (quorum sensing) en de onderzoekers geven aan dat die moleculen verantwoordelijk zijn voor het waargenomen effect op *P. aeruginosa*. Deze resultaten laten zien dat *Reyranella* een mogelijk kandidaatorganisme is dat de ecologie van *P. aeruginosa* kan verstoren, maar aanvullend onderzoek is nodig om de precieze invloed van *Reyranella* op *P. aeruginosa* onder drinkwatercondities te achterhalen. De zoekcriteria voor de andere genera leverde geen wetenschappelijke artikelen op, waardoor de relatie tussen deze genera en *P. aeruginosa* waarschijnlijk nog niet is onderzocht. Het zou dus kunnen dat deze prokaryotengenera de groei van *P. aeruginosa* negatief beïnvloeden, waardoor ook aanvullend onderzoek naar het effect van deze kandidaatgenera op *P. aeruginosa* nodig is. De kortstondige groei van *P. aeruginosa* in het water zou echter ook te maken kunnen hebben met de groeikinetiek van *P. aeruginosa*, indien *P. aeruginosa* een relatief hoge specifieke groeisnelheid, maar lage affiniteit voor het substraat heeft. In dat geval heeft *P. aeruginosa* een competitief voordeel ten opzichte van andere micro-organismen als de substraatconcentratie hoog is, zoals aan het begin van de experimenten toen relatief hoge concentraties afbreekbare stoffen uit PVC-P konden uitloggen naar het water. Mogelijk nam in de tijd deze uitloging uit PVC-P af, waardoor bacteriën met een hogere substraataffiniteit competitief in het voordeel waren, en *P. aeruginosa* de competitie met deze andere bacteriën verloor. Eerdere experimenten hebben laten zien dat *P. aeruginosa* een lage substraataffiniteit heeft in vergelijking met andere waterbacteriën (van der Kooij et al., 1982). Daarom is het aan te bevelen om in eventuele toekomstige experimenten ook de groeikinetiek te onderzoeken van *P. aeruginosa* en deze zeven kandidaatgenera, zodat duidelijk wordt in hoeverre verschil in groeikinetiek een mechanisme is in weerbaarheid tegen *P. aeruginosa*.

Binnen de eukaryoten zijn vijf genera geïdentificeerd die aanwezig waren in relatief hoge abundantie op dag 56 in het water van de jonge biofilm waar een ent aan was toegevoegd, terwijl ze in de watermonsters van de jonge biofilm met andere leeftijd en oude biofilm in zeer lage abundantie werden waargenomen (<0,1%) (Tabel 5.2). Deze genera zijn echter op zeer laag taxonomisch niveau te karakteriseren, zodat onduidelijk is om wat voor eukaryote

organismen het gaat en of deze vaker zijn geassocieerd met afname van bepaalde bacteriesoorten zoals *P. aeruginosa*.

Tabel 5.2 Vijf eukaryotengenera die in relatieve abundantie verschilden tussen de jonge en oude biofilm.

Genus	Relatieve abundantie (%)			Type organismen
	Dag 13	Dag 56	Oude biofilm	
Onbekend binnen rijk <i>Opsithokonta</i>	< 0,1	13,4	≤ 0,1	Onbekend
Onbekend binnen rijk <i>Metazoa</i>	< 0,1	29,2	< 0,1	Onbekend
Onbekend binnen rijk <i>Opsithokonta</i>	< 0,1	3,7	< 0,1	Onbekend
Onbekend binnen rijk <i>Opsithokonta</i>	< 0,1	6,0	< 0,1	Onbekend
Onbekend binnen domein <i>Eukaryota</i>	< 0,1	3,7	< 0,1	Onbekend

5.2.2 Relatie *L. pneumophila* met bacterie- en/of protozosamenstelling

L. pneumophila heeft een complexe levensstijl in drinkwatergerelateerde biofilms, doordat ze zich in bepaalde protozoa vermeerderen (Kuiper et al., 2004). Dit betekent dat de andere bacteriën in de biofilm geen direct contact hebben met de groei van *L. pneumophila*, omdat deze dus plaatsvindt in gastheerprotozoa. Daardoor is de verwachting dat de bacteriesamenstelling niet direct de groei van *L. pneumophila* kan verhinderen. De eukaryotensamenstelling kan daarentegen wel een directe invloed op de groei van *L. pneumophila* hebben, omdat bepaalde protozoasoorten als gastheerprotozoa voor *L. pneumophila* kunnen optreden. Deze gastheerprotozoa voor *L. pneumophila* grazen daarnaast op de biofilm. Eerder onderzoek heeft laten zien dat het aantal *L. pneumophila* in de biofilm toenam als de biofilmconcentratie hoger was (van der Kooij et al., 2017). Doordat *L. pneumophila* zich in gastheerprotozoa vermeerderd, is deze bevinding een aanwijzing dat bij toenemende biofilmconcentratie er ook meer gastheerprotozoa aanwezig zijn.

De resultaten van onze studie lieten zien dat, na inoculatie met *L. pneumophila*, de aantallen *L. pneumophila* in de oude biofilm 10 tot 216 keer hoger waren dan in de jonge biofilm. *L. pneumophila* was dus in staat om zich te vermeerderen in zowel een jonge als oude biofilm, maar dat de condities in de oude biofilm gunstiger lijken voor vermeerdering van *L. pneumophila* dan de condities in een jonge biofilm. 13 en 56 dagen na inoculatie met *L. pneumophila* was de ATP-concentratie in de biofilm van de oude biofilm 1,4 en 1,6 keer hoger dan die in de jonge biofilm. Deze hogere biofilmconcentratie in de oude biofilm leidde waarschijnlijk tot hogere aantallen gastheerprotozoa, wat de hogere aantallen *L. pneumophila* in de oude biofilm mogelijk verklaart. In het verleden werd waargenomen dat een tien keer hogere ATP-concentratie in de biofilm tot 100 keer hogere aantallen *L. pneumophila* in de biofilm leidde (van der Kooij et al., 2017). Wanneer die ratio wordt toegepast voor de waarnemingen in deze studie, dan leidt een 1,4 tot 1,6 keer hogere biofilmconcentratie tot 14 tot 16 keer hogere aantallen *L. pneumophila* in de oude dan jonge biofilm. Dit is aanmerkelijk lager dan de waargenomen 10 tot 216 keer hogere aantallen *L. pneumophila* in de oude dan de jonge biofilm. Het is daardoor aannemelijk dat andere factoren ook verantwoordelijk waren voor de verhoogde groei van *L. pneumophila* in de oude biofilm vergeleken met de jonge biofilm.

Doordat *L. pneumophila* zich in drinkwatersystemen in gastheerprotozoa vermeerderd, zou de protozoasamenstelling een directe invloed kunnen hebben op de groei van *L. pneumophila*. Wat opvalt is dat protozoa die behoren tot de order *Limnofilia* de oude biofilm sterk domineerden (meer dan 85% van de eukaryotenpopulatie), terwijl de relatieve abundantie van deze protozoa zeer laag was in de jonge biofilm (< 1,3%).

Over de gastheerprotozoa die behoren tot dit order werden binnen de literatuurdatabase Scopus echter geen wetenschappelijke artikelen gevonden. Het enig beschreven genus dat behoort tot de order *Limnofilia* is *Limnofila*. Over het genus *Limnofila* werd één artikel gevonden in de Scopus database, waarin de fylogenetische positie van *Limnofila* werd beschreven. Eén van de soorten binnen het genus *Limnofila*, *Limnofila borokensis*, is in het verleden benoemd als *Biomyxa cometa* of *Gymnophrys cometa*. Het doorzoeken van Scopus met deze soortsnamen als zoekterm leverde een beperkt aantal van vijf referenties op. Deze vijf wetenschappelijke publicaties beschreven echter ook alleen de fylogenetische en evolutionaire positie van deze soort. Op dit moment is er dus te weinig ecologische kennis over het order *Limnofilia* om te weten of zij een rol kunnen spelen bij de vermeerdering van *L. pneumophila*. Het is op basis van de resultaten uit onze studie wel verleidelijk om te speculeren dat soorten behorende tot het order *Limnofilia* gastheerprotozoa voor *L. pneumophila* waren, waardoor de aantallen *L. pneumophila* in de oude biofilm hoger waren dan in de jonge biofilm. Desondanks zijn experimenten met *Limnofilia*-soorten en *L. pneumophila* nodig, voordat betrouwbaar kan worden geconcludeerd dat deze protozoasoorten als gastheer kunnen dienen. In de jonge biofilm, waar *L. pneumophila* zich tot lagere aantallen wist te vermeerderen dan in de oude biofilm, waren eukaryote soorten dominant die behoorden tot het rijk *Opisthokonta* en het domein *Eukaryota*. Deze soorten waren dus maar tot een zeer laag taxonomisch niveau te identificeren en doordat naast protozoa ook meercellige dierlijke organismen en schimmels tot *Opisthokonta* en *Eukaryota* behoren, blijft onduidelijk wat voor type eukaryoten in de jonge biofilm domineerden en of deze een rol spelen in relatie tot *L. pneumophila*.

In eerdere studies werden 30 verschillende protozoasoorten beschreven die als gastheer of kandidaatgastheer kunnen dienen voor *L. pneumophila* (NASEM, 2019). In de verkregen 18S taxonomietabel voor ieder water- en biofilmmonster uit het hier beschreven onderzoek werd gezocht of één of meerdere van deze 30 geïdentificeerde (kandidaat)gastheerprotozoa werd aangetroffen, maar dit was niet het geval. De gastheerprotozoa die voor vermeerdering van *L. pneumophila* zorgden in deze biofilmmonsters behoorden daardoor (i) tot niet eerder beschreven protozoasoorten, (ii) tot bekende gastheerprotozoa maar deze werden niet gedetecteerd met de gebruikte primers op het 18S rRNA gen van eukaryoten of (iii) tot soorten waarvan de relatieve abundantie in de biofilm dusdanig laag is, dat ze met de sequentiemethoden niet werden opgepikt.

Eerder onderzoek heeft laten zien dat protozoa bij het grazen op biofilms een voorkeur leken te hebben voor bepaalde bacteriegroepen (van der Kooij et al., 2018). Dat zou betekenen dat de bacteriesamenstelling van de biofilm een invloed kan hebben op de samenstelling van de protozoapopulatie en daarmee indirect op de aantallen *L. pneumophila* in de biofilm. Daarom werd ook onderzocht of de bacteriesamenstelling een relatie had met *L. pneumophila* in de biofilm. De relatieve abundantie van de bacteriesoorten die behoren tot het genus *Limnohabitans* en *Paucibacter* was hoog in de jonge biofilm, maar laag in de oude biofilm (Tabel 5.3). Deze organismen worden gekarakteriseerd door een hoge groeisnelheid (Kasalicky et al., 2013), waardoor verwacht mag worden dat deze organismen als eerste gaan groeien op PVC-P. De sterke afname van *Limnohabitans* en *Paucibacter* wanneer de biofilm ouder werd, zou door begrazing met protozoa kunnen komen, vooral omdat eerder werd waargenomen dat bepaalde *Limnohabitans*-soorten gevoelig zijn voor begrazing (Kasalicky et al., 2013). *Dongia* was een ander genus dat gedurende de 56 dagen incubatie met *L. pneumophila* toenam in de jonge biofilm en ook aanwezig was in de oude biofilm met *L. pneumophila*. Drie andere taxa (*Mycobacterium*, Candidate SM1A02 en een onbekend genus binnen de familie *Comamonadaceae*) waren juist aanwezig in de oude biofilm, maar minder in de nieuwe biofilm. Het zou kunnen dat deze bacteriegroepen ook een rol speelden bij begrazing door protozoa en daaraan gekoppeld mogelijk met groei van *L. pneumophila*. Aanvullende experimenten zijn echter nodig om te achterhalen hoe de complexe ecologische relaties tussen prooibacteriën, grazende protozoa en *L. pneumophila* in deze biofilms precies werkt, voordat hier betrouwbare uitspraken over gedaan kunnen worden.

Tabel 5.3 Zes bacteriegenera die in relatieve abundantie verschilden tussen de jonge en oude biofilm.

Genus	Relatieve abundantie (%)				Type organismen
	Dag 0	Dag 13	Dag 56	Oude biofilm	
<i>Limnohabitans</i>	42,1	7,5	2,2	0,3-0,9	Aeroob, heterotroof, high growth rates
<i>Paucibacter</i>	18,5	29,4	< 0,1	<0,1	Aeroob, heterotroof
<i>Dongia</i>	< 0,1	1,5	28,7	9,5 – 14,0	Aeroob, heterotroof
<i>Mycobacterium</i>	< 0,1	< 0,1	1,8	16,3 – 19,6	Aeroob, heterotroof
Candidate SM1A02	< 0,1	0,1	1,1	6,0 – 9,3	Onbekend
Onbekend binnen familie <i>Comamonadaceae</i>	< 0,1	0,4	0,8	7,7 – 13,4	Onbekend

Doordat deze experimenten werden uitgevoerd binnen het verkennend onderzoek van het waterwijsprogramma, werd het onderzoek naar de eventuele relatie tussen *P. aeruginosa* of *L. pneumophila* en de samenstelling van de bacterie- en protozoagemeenschap beschrijvend uitgevoerd. Het is echter mogelijk om dieper in deze eventuele relaties te duiken door middel van complexe statistische bio-informaticamethoden. Helaas paste een dergelijke analyse niet binnen het verkennende karakter van dit onderzoek, ook omdat maar relatief weinig monsters genomen konden worden. Met een dergelijke verdiepende statistische analyse wordt echter wel duidelijker welke bacterie- en/of protozoata de sterkste relatie hebben met groei van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila*. Dat is waardevol, omdat in vervolgonderzoek dan gericht onderzoek kan worden gedaan naar de rol van sommige bacterie- en/of protozoasoorten bij de groei van *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* onder laboratorium-, pilot- en/of fullscalecondities. Wanneer de complexe ecologische relaties tussen het microbioom en opportunistische ziekteverwekkers in het watersysteem beter worden begrepen, dan kunnen mogelijk gerichte beheersmaatregelen worden genomen die zich bijvoorbeeld niet alleen richten op de opportunistische ziekteverwekker zelf, maar ook op organismen die een positieve of negatieve rol spelen bij de kolonisatie en vermeerdering van deze opportunistische ziekteverwekkers.

Uit deze analyses wordt geconcludeerd dat het met het uitgevoerde onderzoek niet mogelijk was om een betrouwbaar antwoord te geven op de vraag “zijn er bepaalde micro-organismen die kolonisatie en vermeerdering van *P. aeruginosa* of *L. pneumophila* verhinderen?”. Wel leverde de analyses aanwijzingen op dat bepaalde bacteriegenera, beschreven in Tabel 5.1, mogelijk een rol speelden bij het stimuleren of verhinderen van groei van *P. aeruginosa*. Tevens waren er aanwijzingen dat soorten behorende tot de order *Limnofilia* of genus *Limnofila* mogelijke gastheerprotozoa voor *L. pneumophila* waren in de biofilms. Tot slot werden zes verschillende bacteriegenera, beschreven in Tabel 5.3, geïdentificeerd die mogelijk de protozoasamenstelling beïnvloedden, dat misschien indirect weer leidde tot hogere of lagere aantallen gastheerprotozoa voor *L. pneumophila*.

6 Conclusies en aanbevelingen

6.1 Conclusies

De samenstelling van de bacteriegemeenschap in de biofilm verandert substantieel gedurende de veroudering van biofilm op PVC-P. Daarnaast kan worden geconcludeerd dat een jonge biofilm van 8 tot 64 dagen oud en het water dat daarmee in contact staat een niet-stabiele bacterie- en protozoagemeenschap bevat die daardoor mogelijk nog niet weerbaar is tegen eventuele verstoringen. Een oudere biofilm van 128 tot 184 dagen oud en het water dat daarmee in contact staat zijn echter wel stabiel en mogelijk weerbaar tegen eventuele verstoringen.

De biofilm- en watermonsters uit de flessen met PVC-P-coupons waarop een oude biofilm aanwezig is bevat andere bacterie- en protozoagenera dan de biofilm- en watermonsters uit de flessen met een jonge biofilm op de PVC-P-coupons.

De protozoa zijn een dominante eukaryote groep in de biofilm op PVC-P en het water dat hiermee in contact staat.

In de oude biofilm (en water in contact met de oude biofilm) werd *P. aeruginosa* niet aangetroffen, wat laat zien dat een oude stabiele biofilm weerbaar lijkt tegen kolonisatie en groei van *P. aeruginosa*. Tevens wordt geconcludeerd dat de microbiële populatie in water, dat in contact staat met een jonge biofilm, niet weerbaar lijkt tegen kolonisatie van *P. aeruginosa*, maar dat de microbiële populatie in de jonge biofilm zelf wel weerbaar is tegen substantiële vermeerdering van *P. aeruginosa* in de biofilm. *P. aeruginosa* lijkt dus een pionierssoort te zijn, die later wordt verdrongen door andere micro-organismen in het water.

In tegenstelling tot *P. aeruginosa* werd *L. pneumophila* in hoge aantallen aangetroffen in de jonge en oude biofilm. Zowel de niet-stabiele jonge biofilm als de stabiele oude biofilm lijkt dus niet weerbaar tegen kolonisatie en groei van *L. pneumophila*. De hogere aantallen *L. pneumophila* in de oude biofilm dan in de jonge biofilm worden vermoedelijk deels veroorzaakt door de hogere biofilmconcentratie van de oude dan de jonge biofilm, maar andere onbekende factoren spelen naar verwachting ook een rol.

Uit de resultaten van deze studie wordt geconcludeerd dat het met het uitgevoerde onderzoek niet mogelijk is om een betrouwbaar antwoord te geven op de vraag “zijn er bepaalde micro-organismen die kolonisatie en vermeerdering van *P. aeruginosa* of *L. pneumophila* verhinderen?”. Wel leverde de analyses aanwijzingen op dat bepaalde bacteriegenera, beschreven in Tabel 5.1, mogelijk een rol spelen bij het stimuleren of verhinderen van groei van *P. aeruginosa*. Tevens zijn er aanwijzingen dat soorten behorende tot de order *Limnophila* of genus *Limnophila* mogelijke gastheerprotozoa voor *L. pneumophila* zijn. Tot slot zijn zes verschillende bacteriegenera, beschreven in Tabel 5.3, geïdentificeerd die mogelijk de protozoasamenstelling beïnvloeden, dat misschien indirect weer kan leiden tot hogere of lagere aantallen gastheerprotozoa voor *L. pneumophila*.

6.2 Aanbevelingen

Door het verkennende karakter van het onderzoek beschreven in deze rapportage, zijn de experimenten uitgevoerd in enkelvoud. Daarnaast werd als verstoring een nieuw materiaal met een zeer hoge biomassaproductiepotentie in contact gebracht met drinkwater. Doordat de resultaten lieten zien dat weerbaarheid van de microbiële gemeenschap en bepaalde micro-organismen de kolonisatie en groei van *P. aeruginosa* en in mindere mate *L. pneumophila* lijken te beïnvloeden, is de aanbeveling om een uitgebreidere studie uit te voeren. Daarin kan dan met meer replica's worden onderzocht wat de invloed is van verschillende, meer realistische verstoringen in het drinkwatersysteem op de weerbaarheid van de microbiële gemeenschap

tegen kolonisatie en groei van opportunistische ziekteverwekkers. Daarnaast kan getracht worden om de condities te achterhalen waarin een weerbare microbiële gemeenschap zich ontwikkelt en kunnen micro-organismen worden geïsoleerd die een rol spelen bij deze weerbaarheid. Met de resultaten van een dergelijke studie weten drinkwaterbedrijven welke verstoringen ze moeten proberen te voorkómen in het drinkwaterdistributiesysteem en kunnen ze de resultaten gebruiken om de condities in het drinkwaterdistributiesysteem zo aan te passen dat een weerbare microbiële gemeenschap ontstaat.

7 Referenties

Abkar, L., Moghaddam, H.S. and Fowler, S.J. 2024. Microbial ecology of drinking water from source to tap. *Sci Total Environ* 908, 168077.

Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z., ... & Knight, R. (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, 2(2), 10-1128.

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., ... & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6, 1-17.

Doğruöz, N., Göksay, D., İlhan-Sungur, E. and Cotuk, A. 2009. Pioneer colonizer microorganisms in biofilm formation on galvanized steel in a simulated recirculating cooling-water system. *J Basic Microbiol* 49(S1), S5-S12.

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., ... & Christen, R. (2012). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic acids research*, 41(D1), D597-D604.

Kaehler, B. D., Bokulich, N. A., McDonald, D., Knight, R., Caporaso, J. G., & Huttley, G. A. (2019). Species abundance information improves sequence taxonomy classification accuracy. *Nature communications*, 10(1), 4643.

Kasalický, V., Jezbera, J., Hahn, M.W. and Šimek, K. 2013. The diversity of the *Limnohabitans* genus, an important group of freshwater bacterioplankton, by characterization of 35 isolated strains. *PLoS One* 8(3), e58209.

Kuiper, M.W., Wullings, B.A., Akkermans, A.D.L., Beumer, R.R. and van der Kooij, D. 2004. Intracellular Proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in Aquatic Biofilms Grown on Plasticized Polyvinyl Chloride. *Appl Environ Microbiol* 70(11), 6826-6833.

Lee, D.H. and Kim, S.B. 2024. Quorum Quenching Potential of *Reyranella* sp. Isolated from Riverside Soil and Description of *Reyranella humidisoli* sp. nov. *Journal of Microbiology* 62(6), 449-461.

Søborg, D.A., Højris, B., Brinkmann, K., Pedersen, M.R. and Skovhus, T.L. 2024. Characterizing the development of biofilm in polyethylene pipes in the non-chlorinated Danish drinking-water distribution system. *Biofouling*, 1-18.

Temmerman, R., Vervaeren, H., Nosedá, B., Boon, N. and Verstraete, W. 2006. Necrotrophic Growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 72(6), 4323-4328.

van der Kooij, D., Oranje, J.P. and Hijnen, W.A. 1982. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentrations of a few micrograms per liter. *Appl Environ Microbiol* 44(5), 1086-1095.

van der Kooij, D., Bakker, G.L., Italiaander, R., Veenendaal, H.R. and Wullings, B.A. 2017. Biofilm Composition and Threshold Concentration for Growth of *Legionella pneumophila* on Surfaces Exposed to Flowing Warm Tap Water without Disinfectant. *Appl Environ Microbiol* 83(5), e02737-02716.

van der Kooij, D., Veenendaal, H.R., Italiaander, R., van der Mark, E.J. and Dignum, M. 2018. Primary Colonizing *Betaproteobacteriales* Play a Key Role in the Growth of *Legionella pneumophila* in Biofilms on Surfaces Exposed to Drinking Water Treated by Slow Sand Filtration. *Appl Environ Microbiol* 84(24), e01732-01718.

van der Wielen, P.W.J.J., Heijnen, L. and Van Der Kooij, D. 2013. Pyrosequence analysis of the hsp65 genes of nontuberculous *Mycobacterium* communities in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 79(19), 6160-6166.

van der Wielen, P.W.J.J. 2014. Rol van drinkwater, biofilm en temperatuur op groei van opportunistische pathogenen. BTO 2014.217(s). KWR Water Research Institute, Nieuwegein.

van der Wielen, P.W.J.J., Dignum, M., Donocik, A. and Prest, E.I. 2023. Influence of Temperature on Growth of Four Different Opportunistic Pathogens in Drinking Water Biofilms. *Microorganisms* Vol. 11 Issue 6.

Wullings, B. and Heijnen, L. 2017. Bepalen van de relatie tussen het aantal DNA-kopieën (qPCR) en het aantal bacteriecellen. BTO 2017.001. KWR Water Research Institute, Nieuwegein.

I Trendalert 2019

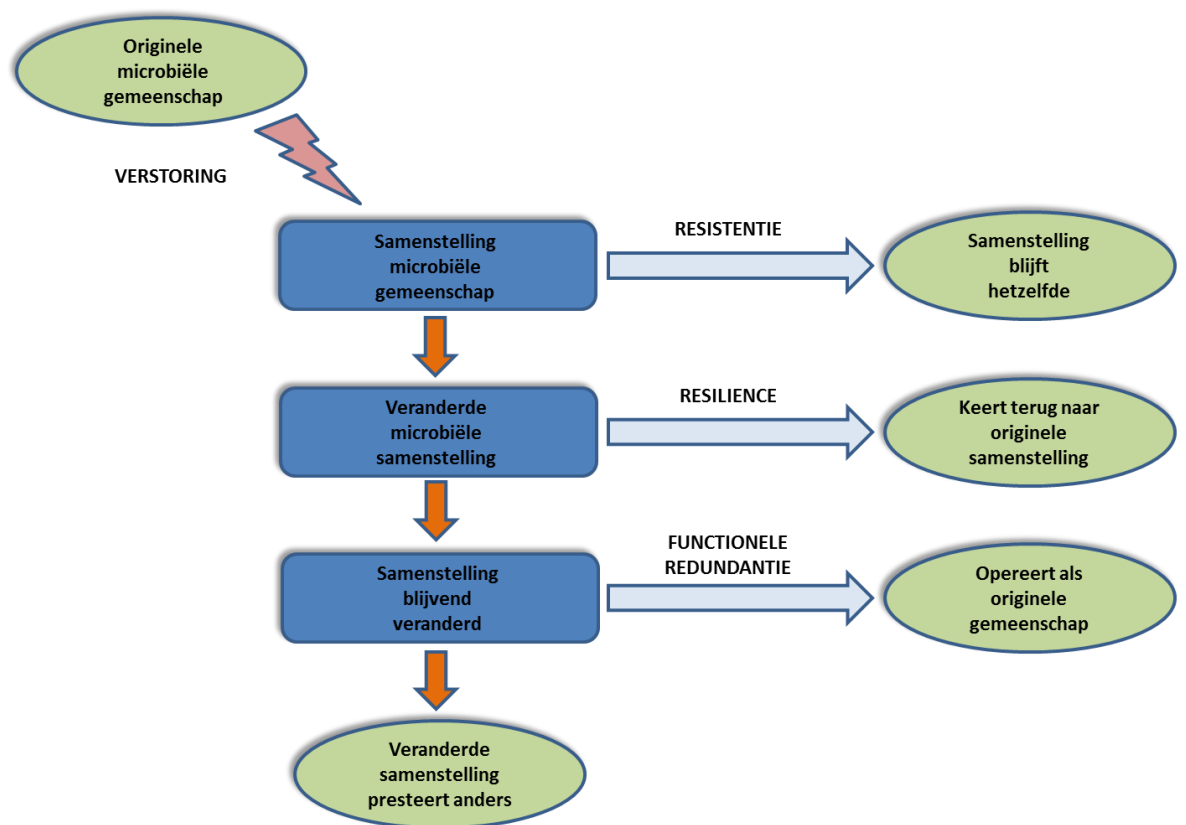
Het belang van resilience in de drinkwatermicrobiologie

Samenvatting

Recent wordt steeds meer onderzoek uitgevoerd naar het effect van verstoring op de bacteriegemeenschap, waarbij de gemeenschap resistent kan zijn tegen een verstoring, tijdelijk verandert (resilience), dezelfde functies behoudt (functionele redundantie) of definitief verandert in samenstelling en functie. Binnen drinkwater is de invloed van verstoring op resistentie, resilience en functionele redundantie van bacteriën nog niet onderzocht, maar wel belangrijk. Zo is het bijvoorbeeld wenselijk dat bij een verstoring in het distributiesysteem, de bacteriegemeenschap zich resistent gedraagt, zodat ongewenste micro-organismen geen kans krijgen. Daarom is het raadzaam om de condities in het drinkwatersysteem te onderzoeken die de mate van resistentie, resilience en functionele redundantie van de bacteriegemeenschap beïnvloeden.

7.1 Consequenties voor u

	Laag	Middel	Hoog	Beknopte uitleg
Impact				
Zekerheid				



Figuur 1. Resistentie, resilience en functionele redundantie van de microbiële gemeenschap in een ecosysteem. Uit (1).

7.2 Trendbeschrijving en achtergrond

7.2.1 Resilience

De definitie van resilience (ook wel veerkracht of herstellingsvermogen) is: de capaciteit van een bepaald systeem om snel terug te keren naar de condities van voor een verstoring. In de drinkwatersector is resilience belangrijk, omdat het drinkwatersysteem na een verstoring weer zo snel mogelijk dient terug te keren naar de oude situatie zodat de leveringszekerheid en drinkwaterkwaliteit niet of nauwelijks in het gedrang komen.

7.2.2 Invloed van verstoring op de microbiologie

Ook binnen de (microbiële) ecologie is resilience belangrijk na een verstoring van het ecosysteem, maar ook resistentie en functionele redundantie spelen een rol bij een dergelijke verstoring. In Figuur 1 worden deze drie termen beschreven in relatie tot het effect dat een verstoring kan hebben op de microbiële gemeenschap in een ecosysteem. Zo kan de samenstelling van een microbiële gemeenschap resistent zijn tegen een verstoring, waardoor er geen veranderingen optreden (resistentie). Wanneer een verstoring wel resulteert in een verandering van de microbiële gemeenschap, kan deze verandering tijdelijk zijn. Na een bepaalde tijd kan de originele samenstelling van de microbiële gemeenschap echter weer terugkeren (resilience). De verandering in de gemeenschap na de verstoring kan echter ook permanent zijn, maar de type en snelheid van de functionele processen van de veranderende gemeenschap zijn mogelijk vergelijkbaar met die van de originele microbiële gemeenschap (functionele redundantie). Tot slot kan een verstoring ook leiden tot een definitief veranderende gemeenschap die anders presteert dan de oorspronkelijke gemeenschap.

7.2.3 Resultaten uit de literatuur

In een studie uit 2008 is onderzocht in hoeverre resistentie, resilience en functionele redundantie van microbiële populaties voorkomen na verstoring van een ecosysteem (1). Daarvoor zijn de resultaten van 110 gepubliceerde studies genomen waar het ecosysteem langdurig verstoord werd door toename van CO₂, bemesting met N/P/K, temperatuurverandering of toevoeging van koolstof. Deze studies zijn uitgevoerd in bodem-, zoetwater- en zoutwaterecosystemen, waarbij de bodem overgerepresenteerd is. Drinkwaterstudies zijn niet meegenomen. In het merendeel van deze studies (60 tot 84%, afhankelijk van het type verstoring) bleek de samenstelling van de microbiële gemeenschap te zijn veranderd door de verstoring. De mate van resistentie van de microbiële gemeenschap tegen een langdurige verstoring lijkt dus klein te zijn.

Een aantal van deze studies hebben de microbiële gemeenschap na een verstoring meerdere jaren gevolgd. De resultaten van deze studies lieten zien dat het soms langer duurt voordat de microbiële gemeenschap verandert door de verstoring en dat na jaren de samenstelling van de microbiële gemeenschap niet is teruggekeerd naar de samenstelling van voor de verstoring. In het merendeel van deze studies lijkt de microbiële gemeenschap dus niet resiliënt te zijn binnen een aantal jaren na de verstoring.

Functionele redundantie van de microbiële gemeenschap is lastiger te onderzoeken, omdat in veel studies de soortensamenstelling van een gemeenschap wordt bepaald en soortensamenstelling geen informatie geeft over functie. Toch zijn er enkele studies uitgevoerd waarin microbiële functies wel zijn onderzocht en de meeste van deze studies laten zien dat de verstoring vaak ook de snelheid van de ecosysteemprocessen beïnvloedt.

7.2.4 Relevantie

Microbiologische activiteit treedt ook op in het drinkwaterecosysteem, wat onwenselijk kan zijn (bv groei van ongewenste micro-organismen in het distributiesysteem) zijn. Daarom wordt getracht biologisch stabiel drinkwater te produceren, maar onduidelijk is in hoeverre biologisch stabiel drinkwater voorkomt dat de drinkwaterkwaliteit verandert na een verstoring. Het is wenselijk dat biologisch stabiel drinkwater er voor zorgt dat de microbiologische processen zo min mogelijk worden verstoord en dat door resistentie, resilience of functionele redundantie de drinkwaterkwaliteit na een verstoring niet dusdanig verandert waardoor de waterkwaliteit negatief wordt beïnvloed. Op andere plekken in het drinkwatersysteem zijn bepaalde microbiologische processen juist gewenst (bv verwijdering van ongewenste stoffen tijdens biologische filtratiestappen). Om die processen beter te laten

verlopen, kan het juist wenselijk zijn om door een verstoring de microbiologie positief te beïnvloeden, zodat de drinkwaterkwaliteit verbeterd. In dergelijke gevallen heeft het mogelijk de voorkeur om juist resistentie, resilience of functionele redundantie te voorkómen.

7.2.5 Voorbeeld resilience bij onwenselijke verstoring

Recent is gesuggereerd dat de groei van opportunistische ziekteverwekkers mogelijk beperkt kan worden door een bepaalde beschermende biofilmsamenstelling in het distributiesysteem te na te streven en die voorkómen dat opportunistische ziekteverwekkers een kans krijgen om te groeien (2). Dit scenario zou bereikt kunnen worden door een microbiële samenstelling in de biofilm te bereiken die zeer resistent of resiliënt is tegen ongewenste verstoringen. Het is overigens niet ondenkbaar dat dergelijke biofilmsamenstellingen al aanwezig zijn in bepaalde delen van huidige distributiesystemen, aangezien opportunistische pathogenen slechts sporadisch voorkomen in een distributiesysteem. Wanneer kennis wordt verzameld over de samenstelling van de biofilm op dergelijke locaties en in welke mate deze samenstelling in staat is om een verstoring op te vangen kan een startpunt zijn voor onderzoek naar resistente en/of resiliente microbiële gemeenschappen in drinkwater om groei van ongewenste micro-organismen (bv opportunistische ziekteverwekkers, *Legionella*, *Aeromonas*) te voorkómen.

7.2.6 Voorbeeld bioaugmentatie als gewenste verstoring

Bij de drinkwaterbereiding in Nederland speelt de biologische activiteit in biologische filters een belangrijke rol om ongewenste stoffen te verwijderen. Recent is bijvoorbeeld ontdekt dat bepaalde micro-organismen in staat zijn om het bestrijdingsmiddel 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in kolomopstellingen gevuld met zand af te breken (3). Om deze verwijdering vervolgens ook in praktijkfilters te krijgen, is het van belang dat deze specifieke micro-organismen de zandfilters onder praktijkcondities weten te koloniseren. Daarom is onderzocht of het toevoegen van specifieke micro-organismen aan zandfilters (een proces dat bioaugmentatie wordt genoemd) in de drinkwaterbereiding leidt tot betere verwijdering van BAM (4). De resultaten lieten zien dat de initiële BAM verwijdering tegen de 100% was, maar dat in de loop van de tijd het toegevoegde organisme werd uitgespoeld en de verwijderingsefficiëntie van BAM sterk terugliep. Hier lijkt de al aanwezige microbiële populatie in zandfilters te resiliënt, waardoor het geïntroduceerde micro-organisme niet de kans kreeg om een niche in te nemen. Het is daarom raadzaam om eerst te achterhalen wat de invloed is van de autochtone bacteriepopulatie op het voorkómen van langdurige kolonisatie van geïntroduceerde micro-organismen in biologische filters van de drinkwaterbereiding. Dergelijke informatie kan vervolgens worden gebruikt om de optimale condities voor bioaugmentatie in biologische filters vast te stellen, zodat deze filters gericht gemanipuleerd kunnen worden om de drinkwaterkwaliteit te verbeteren.

7.2.7 Conclusies/aanbevelingen

Resistentie, resilience en functionele redundantie van de drinkwatermicrobiologie in een distributiesysteem kan voorkómen dat de waterkwaliteit negatief wordt beïnvloed na een verstoring.

Het koloniseren van biologische zuiveringsprocessen door gedoseerde nuttige micro-organismen, bijvoorbeeld om de verwijdering van bepaalde stoffen te verbeteren, kan worden verstoord door resistentie, resilience of functionele redundantie van de autochtone bacteriepopulatie.

Het is daarom raadzaam om de condities in het drinkwaterdistributiesysteem en biologische zuivering te onderzoeken die de mate van resistentie, resilience en functionele redundantie van de bacteriegemeenschap beïnvloeden en deze kennis te gebruiken om na een verstoring de drinkwaterkwaliteit te handhaven of te verbeteren.

Literatuur

1. Allison, S.D. & Martiny, J. B. H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. PNAS 105 suppl 1:11512-11519
2. Wang, H. et al. (2013) Probiotic approach to pathogen control in premise plumbing systems? A review. Environ. Sci. Technol. 18:10117-10128.

3. Albers, C.N. et al. (2014) Using 2,6-dichlorobenzamide (BAM) degrading *Aminobacter* sp. MSH1 in flow through biofilters—initial adhesion and BAM degradation potentials. *Appl. Microbiol. Biotech.* 98:957-967.
4. Albers, C.N. et al. (2015) Degradation of trace concentrations of the persistent groundwater pollutant 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in bioaugmented rapid sand filters. *Water Res.* 83:61-70.

Meer informatie

- Allison, S.D. & Martiny, J. B. H. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS* 105 suppl 1:11512-11519.
- Sommer, F. et al. (2017) The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 15:630-638.
- Botton et al. (2006) Resilience of microbial systems towards disturbances. *Crit. Rev. Microbiol.* 32:101-112.
- König et al. (2017) Modelling functional resilience of microbial ecosystems: analysis of governing processes. *Environ. Model. Soft.* 89:31-39.

-

Keywords

- Drinkwatermicrobiologie, resilience, resistentie, functionele redundantie, bioaugmentatie, drinkwaterkwaliteit, opportunistische ziekteverwekkers

-

Auteur

- Paul W.J.J. van der Wielen