



Aleida de Vos van Steenwijk, Bioclear
 Bert Geurkink, Bioclear
 Maarten Lut, Oasen
 Willem Jan Knibbe, Oasen

Autotrofe micro-organismen: de basis van de voedselpiramide in het drinkwaterleidingnet?

Op een locatie in het drinkwaterleidingnet van Oasen is een nieuwe aanpak met moleculaire technieken gebruikt om een gedetailleerd beeld te verkrijgen van alles wat in die leidingen leeft. De aanpak laat zien dat onder andere ijzer- en nitraatoxiderende micro-organismen in significante aantallen in het leidingnet voorkomen. Dit suggereert dat de autotrofen (organismen die op koolstofdioxide kunnen groeien) een belangrijke rol kunnen spelen in de nagroei van micro-organismen in het leidingnet.

Micro-organismen zijn overal' geldt als algemene wijsheid in de microbiologie, met direct daarbij de observatie dat we als mens hier blijkbaar prima bij gedijen. Met andere woorden, we kunnen in het algemeen goed samenleven met micro-organismen om ons heen. Dit geldt echter minder dan wanneer het gaat om voedsel, en ook wanneer het gaat om drinkwater. Strenge controle en bewaking door normeringen zorgen ervoor dat, hoewel micro-organismen ook voorkomen in drinkwater, we dit water zonder problemen kunnen drinken. Drinkwaterbedrijven zorgen voor meerdere effectieve barrières voor ziekteverwekkers.

Het water dat een productielocatie verlaat en via het leidingnet naar de klant stroomt, kan kwalitatief worden beïnvloed door de groei of activiteit van micro-organismen tijdens het transport. Hierdoor kunnen geur- of smaakklachten ontstaan en neemt de kans op groei van ongewenste micro-organismen toe. Een drinkwaterbedrijf wil de mate waarin dit gebeurt, zo veel mogelijk minimaliseren. Hiervoor bestaan verschillende mogelijkheden. Die variëren van het zoveel mogelijk verwijderen van micro-organismen en voedingsstoffen in de zuivering, het gericht beheersen van bepaalde soorten micro-organismen tot het intensief reinigen van het leidingnet. Hier geldt dat inzicht nodig is om te kunnen besluiten welke maatregelen het meest

effectief zijn. Daarvoor is het nodig de biologische populaties in drinkwater en de veranderingen hierin bij zuivering en distributie te kennen. Dit pleit voor meer inzicht in de biologische populatie van drinkwater.

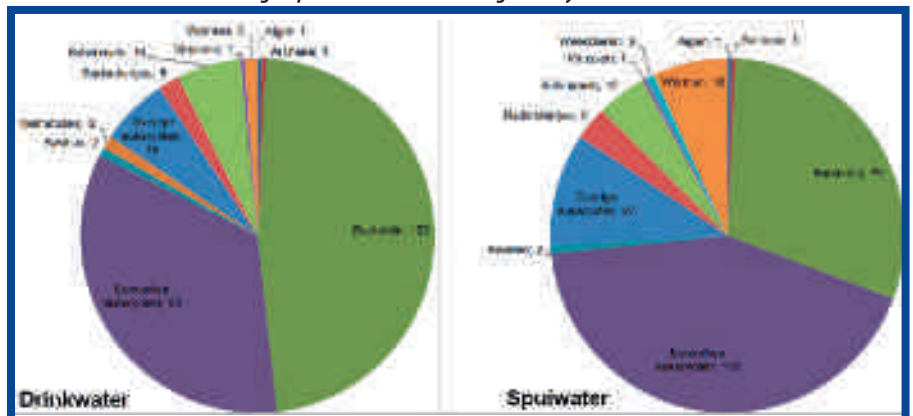
Daarom is een nieuwe aanpak gebruikt die de mogelijkheid biedt te verkennen welke organismen voorkomen in het leidingnet, met een snelheid en detailniveau die tot voor kort onmogelijk waren. Op deze manier is binnen korte tijd en tegen acceptabele kosten een eerste, zeer compleet beeld verkregen van alles wat leeft op een punt in het leidingnet

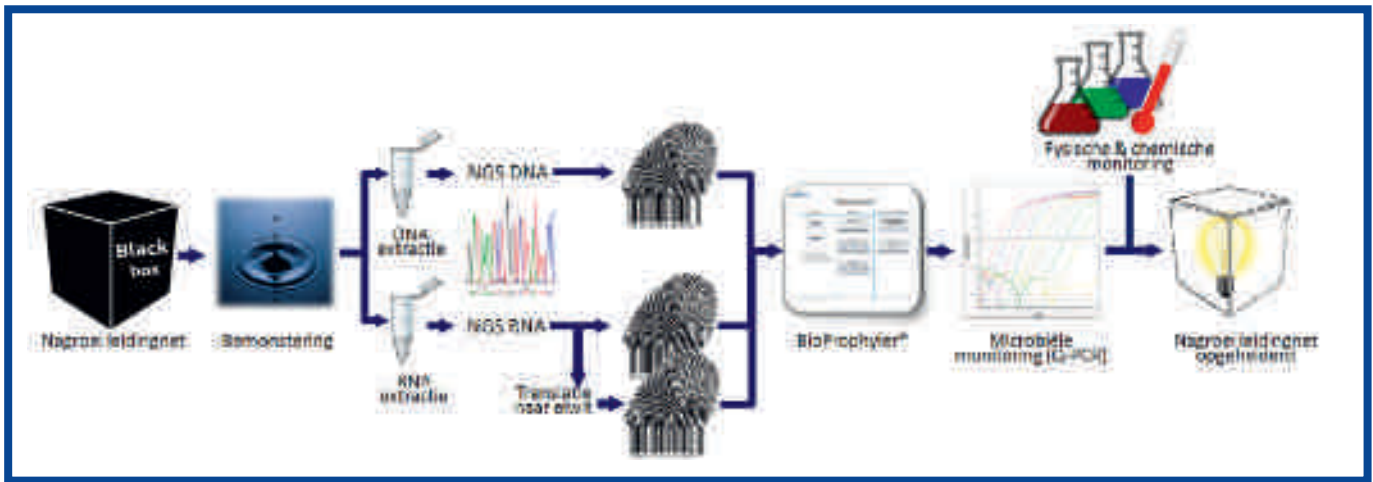
en zijn monitoringinstrumenten opgezet voor een selectie van relevante micro-organismen. In dit artikel demonstreren we de relevantie van de resultaten voor het kwaliteitsbeheer van Oasen.

Ophelderen biodiversiteit leidingnet

In het noordelijk voorzieningsgebied van Oasen, waar in verhouding de hoogste concentraties organisch materiaal worden gevonden, zijn op 19 april 2011 op een locatie twee monsters genomen: 120 liter drinkwater is bemonsterd met een ultrafiltratie-installatie en acht liter spuiwater inclusief sediment. Beide monsters zijn direct

In de taartdiagrammen is te zien hoeveel verschillende soorten micro-organismen zijn geïdentificeerd in het drinkwater en in het spuiwater. De soorten zijn ingedeeld in twaalf groepen. Opvallend is dat de hoogste biodiversiteit is te vinden in de groepen bacteriën en eencellige eukaryoten.





Afb. 1: Een schematisch overzicht van de stappen benodigd voor het ophelderen van microbiële groei in het drinkwaterdistributienet. Stap 1 is het verkrijgen van een gedetailleerd inzicht in de biologische populaties middels BioProphyler. Stap 2 is het kwantitatief monitoren van de microbiologische parameters geïdentificeerd in stap 1 in tijd en in ruimte. Stap 3 is het monitoren van relevante fysische en chemische parameters. Door correlaties te zoeken tussen de microbiële, fysische en chemische parameters met groei, worden handvatten en kritische beheerspunten geïdentificeerd. Hierin ligt de sleutel voor het beheersbaar maken van microbiële groei in het drinkwater leidingnet.

gefixeerd om de biologische samenstelling stabiel te houden.

Van beide monsters is bepaald welke organismen aanwezig en actief zijn. Hiertoe is gebruik gemaakt van een *next generation sequencing*-techniek. Hiermee is het mogelijk alle (bekende) soorten organismen in een monster te identificeren op basis van hun genetisch materiaal: DNA (indicatief voor aanwezigheid van organismen) en RNA (indicatief voor activiteit van organismen). Door gebruik te maken van een nieuw ontwikkeld software-instrument (BioProphyler, zie kader en ¹⁾) zijn in totaal 451 soorten organismen geïdentificeerd. De organismen zijn gerangschikt op basis van hoe vaak ze in het monster zijn aangetoond. Dit geeft een indicatie van de dominante organismen in de populatie. De organismen zijn bovendien ingedeeld in de groepen archaea, bacteria, virussen en eukaryoten (ofwel hogere organismen). De eukaryoten zijn verder onderverdeeld in bijvoorbeeld raderdiertjes, weekdieren en nematoden.

De resultaten geven een gedetailleerd beeld van de aanwezige en actieve organismen in het distributienetwerk en een indicatie van de dominante soorten. Gebruikmakende van de verkregen informatie is vervolgens in meer detail gekeken naar enkele specifieke micro-organismen die mogelijk een belangrijke rol spelen in de potentie voor groei in het leidingnet.

Aanwezigheid van autotrofen in het leidingnet

Op basis van de verkregen informatie is duidelijk geworden dat een aantal groepen micro-organismen dominant aanwezig is in het leidingnet. Zo is bijvoorbeeld de ijzer-oxiderende bacterie *Gallionella capsiferiformans* de meest aangetoonde soort in het drinkwater en staat deze op positie 17 in het spuiwater. Deze bacterie is in staat koolstofdioxide te gebruiken als koolstofbron (autotroof) en energie te verkrijgen uit de oxidatie van opgelost ijzer (Fe^{2+} naar Fe^{3+}). De nitrificerende bacterie *Candidatus Nitrospira defluvii* is op positie 3 gevonden in het drinkwater en positie 10 in het spuiwater. Ook dit is een autotrofe bacterie die energie

wint uit de omzetting van nitriet naar nitraat. Op basis van een controle van de verkregen data bleek dat meerdere autotrofe micro-organismen dominant aanwezig zijn in de twee monsters. Deze micro-organismen zijn bekend vanuit de drinkwaterzuivering waar ze worden toegepast voor het verwijderen van ijzer en ammonium²⁾.

De kwantitatieve onderbouwing voor bovengenoemde observatie is gedaan door analyses te ontwikkelen voor vijf autotrofe micro-organismen die dominant en actief aanwezig zijn in het leidingnet: *Sideroxydans lithotrophicus* en *Gallionella capsiferiformans* (ijzeroxiderende bacteriën) en *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosopumilus maritimus* en *Candidatus Nitrospira defluvii* (nitrificerende micro-organismen).

Ook is gekeken naar een microbiële soort die methaan gebruikt als koolstofbron: *Methylovorus sp.*

De gebruikte detectietechniek Q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Resultaten van de middels Q-PCR uitgevoerde analyses op vijf autotrofe micro-organismen en één methaanoxiderende bacterie.

| analyse | drinkwater (kopieën/100 ml) | spuiwater (kopieën/100 ml) | fysiologie |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|
| <i>Sideroxydans lithotrophicus</i> | $1,2 \times 10^3$ | $1,8 \times 10^5$ | ijzeroxideerder ($Fe_{2+} \rightarrow Fe_{3+}$) CO ₂ als koolstofbron |
| <i>Gallionella capsiferiformans</i> | 780 | $1,1 \times 10^5$ | ijzeroxideerder ($Fe_{2+} \rightarrow Fe_{3+}$) CO ₂ als koolstofbron |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | 110 | $2,5 \times 10^4$ | ammoniakoxideerder ($NH_4 \rightarrow NO_2$) CO ₂ als koolstofbron |
| <i>Nitrosopumilus maritimus</i> | <9 | $1,6 \times 10^4$ | ammoniakoxideerder ($NH_4 \rightarrow NO_2$) CO ₂ als koolstofbron |
| <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> | 470 | $5,0 \times 10^4$ | nitrietoxideerder ($NO_2 \rightarrow NO_3$) CO ₂ als koolstofbron |
| <i>Methylovorus sp.</i> MP688 | 62 | $5,6 \times 10^4$ | methylootroof organische C ₁ - verbindingen als koolstofbron |
| detectiegrens van de analyses | 9 | $2,7 \times 10^3$ | |

wordt toegepast voor routinedetectie en kwantificering van micro-organismen op basis van onderscheidende eigenschappen op het genetisch materiaal.

De kwantitatieve analyseresultaten staan in de tabel weergegeven.

De Q-PCR-resultaten bevestigen dat de geïdentificeerde micro-organismen in significante aantallen aanwezig zijn in het leidingnet. De ijzeroxiderende micro-organismen (*Sideroxydans lithotrophicus* en *Gallionella capsiferiformans*) komen in de hoogste aantallen voor in zowel het spuiwater als in het drinkwater. De aantallen micro-organismen zijn hoger in het spuiwater dan in het drinkwater, wat in de lijn der verwachting ligt.

De mogelijke rol van autotrofen in groei

De biologische stabiliteit van drinkwater, zoals bepaald door de concentratie van *Aeromonas* en de hoogte van KG22, wordt veelal gerelateerd aan assimileerbaar

organisch koolstof (AOC). AOC wordt hierbij gezien als noodzakelijke voedingsstof voor de groei van bacteriën. Aangenomen wordt dat hoe lager de AOC-concentratie en het koloniegetal voor beide groepen micro-organismen, hoe stabiel het water is. Andere factoren waarvan is omschreven dat ze de microbiële nagroei beïnvloeden, zijn concentraties ammonium en ijzer in het uitgaande water van de zuiveringsstations en de verblijftijd en temperatuur in en het materiaal van het transport- en distributiesysteem³⁾.

Autotrofe micro-organismen gebruiken, in tegenstelling tot andere organismen, koolstofdioxide als koolstofbron (in plaats van AOC) en zetten dit om in organisch koolstof voor hun groei. De organische verbindingen die door autotrofen worden geproduceerd, vormen weer een voedselbron voor andere bacteriën en hogere organismen⁴⁾. Dit is vergelijkbaar met de rol die bijvoorbeeld gras vervult op het land of plankton in de zee. Autotrofe micro-organismen vormen dus de basis van complexe voedselpirames, waarschijnlijk ook in het drinkwaterdistributiesysteem.

Wanneer autotrofen significant groeien in het leidingnet, zou dit betekenen dat AOC niet de enige of de primaire koolstofbron is voor de groei van organismen, maar dat dit ook CO₂ kan zijn. Autotrofen zouden als gevolg hiervan verantwoordelijk kunnen zijn voor de (lokale) toename in micro-organismen die

De BioProphyler is ontwikkeld als platformtechnologie die waardevolle biologische informatie ontsluit. Aan de ene kant ter ondersteuning van wetenschappelijk onderzoek en aan de andere kant voor het gericht oplossen van biologische vraagstukken. De aanpak maakt het mogelijk om sneller en efficiënter dan tot nu toe mogelijk was biologische populaties en eigenschappen te identificeren op basis van het genetisch materiaal (DNA en RNA). Op basis van de verkregen informatie worden op maat gemaakte Q-PCR-analyses ontwikkeld om (enkele, tientallen of honderden) relevante organismen of eigenschappen routinematig te monitoren. Deze aanpak geeft meer inzicht in complexe microbiologische systemen dan alternatieve methoden (zoals kweektechnieken, microscopische analyses of DNA-fingerprinting). Op basis van de verkregen informatie is nieuw inzicht ontstaan in de samenstelling en beheersing van biologische systemen.

afhankelijk zijn van organisch koolstof (zoals *Aeromonas* en KG22).

In een vervolgonderzoek wordt daarom onderzocht wat de herkomst is van de autotrofen; spoelen deze bijvoorbeeld alleen uit van de zuivering of groeien ze daadwerkelijk in het leidingnet? Indien ze in het leidingnet groeien, wordt onderzocht wat de substraatbronnen kunnen zijn van deze micro-organismen. Zijn bijvoorbeeld bepaalde cycli actief waardoor ze kunnen groeien of is een correlatie te vinden met het aandeel gietijzeren leidingmateriaal? Het monitoren van relevante autotrofe micro-organismen in combinatie met het al dan niet optreden van nagroei geeft mogelijk een handvat voor het kiezen van de meest effectieve maatregelen voor beheersing van microbiële nagroei in het leidingnet.

Conclusie

Met dit onderzoek is een verkennende stap gemaakt in het ophelderen van de diversiteit aan organismen in het leidingnet om beter zicht te krijgen op de biologische stabiliteit in het leidingnet. Maar liefst 451 soorten organismen zijn geïdentificeerd en gesorteerd op abundantie. Het onderzoek heeft geleid tot de observatie dat autotrofen in significante aantallen aanwezig zijn en dat deze organismen mogelijk de basis vormen van de voedselpiramide in het drinkwaterleidingnet.

In een vervolgonderzoek wordt onderzocht wat de rol van de autotrofen in de nagroei van organismen in het leidingnet is.

Een ander onderzoek begon onlangs en richt zich op het verder in kaart brengen van de microbiële diversiteit in drinkwaterleidingen (onderzoek van Vitens, in samenwerking met Oasen, dat als deel van het bedrijfstakonderzoek wordt uitgevoerd door KWR Watercycle Research Institute en TNO). De aanpak met BioProphyler wordt verder ontwikkeld en intussen breed toegepast voor het ophelderen en beheersbaar maken van biologische systemen en processen.

LITERATUUR

- 1) Geurkink B., G. Faber, A. de Vos van Steenwijk, I. Dinkla en G. Euverink (2012). Development of a novel software tool for elucidation of complex biological populations and systems. In voorbereiding.
- 2) De Vet W. (2011). Biological drinking water treatment of anaerobic groundwater trickling filters. TU Delft.
- 3) Van der Wielen P. en D. van der Kooij (2011). Omvang en oorzaak van overschrijding kwaliteitseisen door nagroei in drinkwater. H₂O nr. 22, pag. 36-38.
- 4) Berg I. (2011). Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. Applied And Environmental Microbiology, pag. 1925-1936.

De bemonstering van 120 L drinkwater met een ultrafiltratie unit gebeurde op locatie door Bioclear en Oasen.

