



Yolanda Dullemond, Waternet

Martine Rosielle, Het Waterlaboratorium

Anke Brouwer-Hanzens, KWR Watercycle Research Institute

Wim Hijnen, KWR Watercycle Research Institute

Vormt predatie in langzame zandfiltratie een risico voor doorslag van *Cryptosporidium*?

De gezamenlijke Nederlandse drinkwaterbedrijven die met langzame zandfiltratie als zuiveringsstap werken, ondernamen doseerexperimenten om de eliminatiecapaciteit van deze zuiveringsstap te bepalen voor pathogene micro-organismen. De decimale eliminatiecapaciteit (DEC) van langzame zandfiltratie ten aanzien van oöcysten van *Cryptosporidium parvum* blijkt hoog: 4,3 tot 4,7 logeenheden. Predatie en gefaciliteerd transport van oöcysten door zoöplankton, het zogenaamde vectorgedrag, kunnen inderdaad plaatsvinden, maar het risico hiervan voor de veiligheid van drinkwater is verwaarloosbaar.

In het Waterleidingbesluit zijn kwaliteitseisen opgenomen voor ziekteverwekkende (pathogene) micro-organismen in drinkwater. De algemene eis is dat de concentratie van deze pathogenen zo laag moet zijn dat de jaarlijkse kans op infectie via drinkwater minder is dan 10^{-4} per persoon. Omdat deze concentratie niet meetbaar is, dient een zogeheten analyse microbiologische veiligheid drinkwater (AMVD)¹⁾ te worden uitgevoerd. Bij deze kwantitatieve risicoanalyse wordt de concentratie pathogenen in het drinkwater bepaald uit de concentratie in het ruwe water en de verwijdering tijdens de drinkwaterproductie.

Verwijderingscapaciteit langzame zandfiltratie

Voor het opstellen van de AMVD's verrichten drie Nederlandse drinkwaterbedrijven samen met KWR Watercycle Research Institute en het RIVM onderzoek naar de decimale eliminatiecapaciteit (DEC) van langzame zandfiltratie voor de in het Drinkwaterbesluit genoemde indexpathogenen^{1),2),3)}. Aan de hand van de resultaten van deze doseerexperimenten wordt door het RIVM momenteel een procesmodel ontwikkeld om de DEC te kunnen bepalen onder verschillende condities (filtratiesnelheden, watertemperatuur en korrelgrootte⁴⁾).

In één van de doseerexperimenten is de DEC bepaald voor de oöcysten (soort

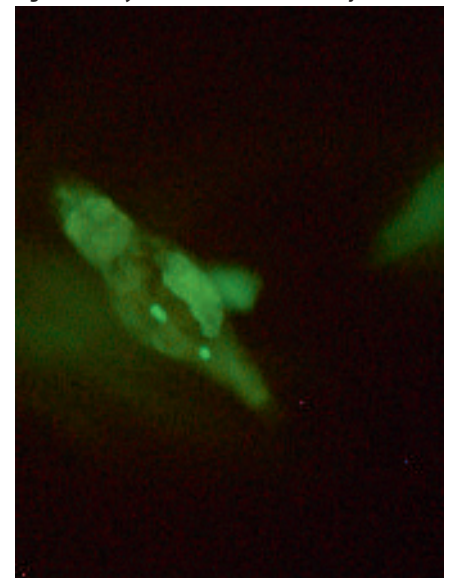
sporen) van de pathogeen *Cryptosporidium parvum* in de proefinstallatie te Leiduin (filtratiesnelheid 0,3 m/uur, $d_{50} = 0,28$ mm)⁵⁾. De eliminatiecapaciteit van het proeffilter voor de oöcysten was hoog, namelijk 4,7 logeenheden. Uit de massabalansgegevens van de oöcysten bleek dat in het filterbed het aantal oöcysten sterk was afgenomen. Als verantwoordelijk mechanisme werd hiervoor predatie voorgesteld. Predatie van oöcysten door zogeheten raderdieren is eerder in de literatuur aangetoond⁶⁾. Op grond hiervan en de waarneming dat raderdieren veelvuldig in het effluent voorkomen, rees de vraag of het mogelijk is dat in het zoöplankton opgenomen oöcysten het filterbed kunnen passeren (het zogenaamde vectorgedrag). De berekende 4,7 logeenhedenverwijdering zou daarmee een mogelijk overschatting van de DEC kunnen zijn.

Predatie-experiment op labschaal

Uit zand van de vuillaag van een langzaam zandfilter - de bovenste laag van twee tot drie centimeter waarin zich de hoogste concentratie aan zoöplanktonorganismen bevindt - is in het laboratorium het zoöplankton verzameld. Het zand is geschud en gefiltreerd over 100- en 30 μ m-zoöplanktonfilters. Het zoöplankton kreeg na een uithongeringsperiode van circa 18 uur een suspensie van met Easystain gekleurde *C. parvum*-oöcysten aangeboden in een concentratie van 80.000 oöcysten/ml.

Het werd vervolgens gedurende 1,5, 3, 4,5 en 24 uur geïncubeerd voor microscopische analyse. Daarna werd het zoöplankton gedood met vier procent ijskoude gluteraldehyde (twee procent eindconcentratie) om uitscheiding van ingeslikte oöcysten te voorkomen⁷⁾. De doorzichtige zoöplanktonorganismen werden elk afzonderlijk door middel van fluorescentie-

Raderdier (*Philodina sp.* of *Rotaria sp.*) met drie ingeslikte oöcysten na drie uur incubatietijd.



microscopie beoordeeld op inname van de gekleurde oöcysten. Alleen raderdieren van het geslacht *Rotaria sp.* en/of *Philodina sp.* bleken de oöcysten te eten. Bij gemiddeld vijf procent van deze organismen werden één of meer oöcysten in het lichaam aangetroffen.

Aan de scherpe begrenzing van oöcysten is te zien dat zij het kauwapparaat, de mastax, ongeschonden zijn gepasseerd. In de literatuur zijn nog geen aanwijzingen gevonden dat de opgenomen oöcysten worden gemetaboliseerd⁵⁾. Het beeld dat een oöcyst zich na drie uur incubatie dicht bij de anus bevindt en nog intact lijkt, zou kunnen worden gezien als een bevestiging hiervan. Tevens laat dat zien dat passage door het lichaam optreedt in een tijdsbestek van maximaal drie uur. Vanwege deze resultaten worden de raderdieren van het geslacht *Philodina sp.* en/of *Rotaria sp.* als mogelijke vectororganismen gezien voor oöcysten.

Doseerexperiment op proefinstallatieschaal

Onderzoek naar het vectorgedrag van zoöplankton is eerder uitgevoerd met een actief koolfilter⁸⁾, waarbij een methode ontwikkeld is waarmee het vectorgedrag van zoöplankton bij filtratie is aan te tonen. In het kader van de ontwikkeling van het procesmodel⁴⁾ is een tweede doseerproef op een proeffilter te Weesperkarspel met een hogere filtratiesnelheid (0,45 m/h) en grovere korrel diameter (d50= 0,61 mm) uitgevoerd. Hierbij is ook het vectorgedrag van zoöplankton onderzocht. Er werd een hoge concentratie UV-bestraalde oöcysten (*C. parvum*; $3,3 \times 10^4$ (± 5093) per liter) gedurende 24 uur gedoseerd (totaal aantal $9,1 \times 10^8$). Het proeffilter werd gevoed met filtraat van een actief koolfilter. Tijdens de doseerproef zijn in de eerste 24 uur acht monsters van een liter direct en in de daarop volgende vier weken acht monsters van 1,4 kubieke meter met hemoflow-concentraat onderzocht op oöcystendoorslag. Gebaseerd op de gemiddelde oöcystenconcentratie in het influent en de maximale gevonden waarde in het effluent is een DEC van 4,3 logeenheden berekend (concentraties zijn gecorrigeerd voor terugwinning van opzettelijke toegevoegde hoeveelheden oöcysten die behandeld zijn met een kleurstof).

Zoöplankton in het water en de vuillaag

Het zoöplankton met een grootte van $\geq 30 \mu\text{m}$ is uit 250 liter (dag 3 en 17) en 100 liter (dag 31) monsters van het in- en effluent geïsoleerd, gedetermineerd en geteld. Het totaal aantal organismen in het influent varieerde tussen 4000 en 11.000 per kubieke meter en bestond voor een belangrijk deel uit raderdieren (zie tabel 1). Het aantal nam af met 0,7-1,0 log. Ook in het effluent was het percentage raderdieren hoog.

Van de raderdieren behoort respectievelijk 27 en 21 procent in het influent en effluent tot het geslacht *Rotaria/Philodina* (gemiddelde van drie metingen). Op dag 9 en dag 45 zijn steekmonsters van de bovenste tien centimeter van het filterbed genomen, waarin de zoöplanktonorga-

dag	influent aantal (%)	effluent aantal (%)
3	4100 (36)	1000 (91)
17	3500 (86)	340 (38)
31	10000 (97)	890 (48)

Tabel 1. Aantal raderdieren per kubieke meter en het percentage van het totaal aantal zoöplanktonorganismen verzameld uit influent en effluent.

behandeling	5 minuten monsters (n/m3) zoöplankton uit circa 1,5 m3		24-uur monsters (n/m3) zoöplankton uit circa 100 m3	
	geen HES	HES	geen HES	HES
dag 4-10	< 6,2	< 0,11	< 9,7	< 0,32
dag 11-17	< 68	< 0,04	< 67	< 0,46
dag 18-24	< 2,8	-	< 8,5	0,06
dag 25-31	< 6,8	< 0,11	< 67	< 0,95

Tabel 2. Aantal oöcysten in de zoöplanktonmonsters, verzameld uit het effluent.

tijd (dagen)	zandmonster		zoöplanktonmonster uit zand	
	geen HES		geen HES	HES
	oöcysten n/g (vrij)		oöcysten n/g (vrij)	oöcysten n/g (gebonden)
9	458 (314) ^a		0,45	0,75
45	11		<0,41	2,6

^ana een week in de koeling en een week bij 15°C

Tabel 3. Het aantal vrije en opgenomen oöcysten per gram zand, bemonsterd op twee momenten tijdens het onderzoek (mengmonsters van twee afzonderlijke monsters genomen op twee locaties in het filterbed).

nismen zijn gedetermineerd en geteld. De aanwezige dominante soorten komen over het algemeen overeen met de soorten die ook in het in- en effluent worden gevonden. Op basis van deze twee metingen lijkt tussen dag 9 en dag 45 een afname van het aantal soorten en verschuiving in de dominante soorten te hebben plaatsgevonden. Opvallend is de toename van het aantal *Rotifera* van 1260 naar 5700 per 30 gram zand, mogelijk als gevolg van een groter aanbod in het influent (zie tabel 1).

Studie naar vectorgedrag in een proeffilter

Om vast te stellen of de in het filterbed afgevangen oöcysten door predatie alsnog het effluent konden bereiken, diende een zo groot mogelijke hoeveelheid zoöplankton in het effluent te worden afgefilterd, die onmiddellijk moest worden gedood om voortijdige fecale uitscheiding en uitspoeling van de oöcysten door het planktonnet te voorkomen. Om deze reden werden gedurende vier weken na de doseerproef driemaal daags korteduurmonsters (vijf minuten) van 100 liter van het effluent gefiltreerd over een $30 \mu\text{m}$ -planktonnet en direct gefixeerd met glutaraaldehyde. Ter verhoging van de detectiekans werden tevens 24-uurs zoöplanktonmonsters ($30 \mu\text{m}$) genomen die op dezelfde wijze werden gefixeerd. De afzonderlijke korteduur- en 24-uurs concentraten van een week werden samengevoegd tot twee verzamelmonsters van zoöplankton

van respectievelijk ongeveer 1,5 en ruim 100 kubieke meter.

De zoöplanktonmonsters zijn onderzocht op de aanwezigheid van vrij gesuspendeerde oöcysten en vervolgens na een voorbehandeling met hoge energetische sonificatie (HES)⁸⁾ opnieuw onderzocht op oöcysten die opgenomen zijn door zoöplankton. De HES-behandeling is bedoeld om het zoöplankton in de monsters te desintegreren.

Speciaal aangepaste zoöplanktonmonstername-apparatuur voor het totale filtraat met een debiet van 1,15 kubieke meter per uur.



Het terugwinnen van de hoeveelheid met kleurstof behandelde oöcysten was over het algemeen gering: gemiddeld 8 procent (0,0-24 procent).

In de zoöplanktonconcentraten konden geen vrije oöcysten worden aangetoond (zie tabel 2). Slechts in één van de 24-uurs-monsters (dag 18-24) is één opgenomen oöcyst gevonden. Na correctie voor het herstel betekent dat zeven oöcysten zijn gevonden in het zoöplankton met een grootte van > 30 µm geïsoleerd uit totaal circa 400 kubieke meter effluent over de gehele periode van 30 dagen. Uit onderzoek in zandmonsters van het proeffilter bleek dat het aantal vrije oöcysten tussen dag 9 en dag 45 duidelijk afnam en het aantal opgenomen oöcysten toenam (zie tabel 3). Dit is een bevestiging van eerder onderzoek⁵⁾.

Toegevoegd doorslagrisico van opgenomen oöcysten

In het filter vindt een sterke afname plaats van het aantal oöcysten dat in de bovenste tien centimeter is geaccumuleerd. Dit wordt zeer waarschijnlijk veroorzaakt door predatie, zoals blijkt uit de waargenomen toename van het door zoöplankton ingeslikte oöcysten (zie tabel 3). Uit de gegevens van dit onderzoek (zie tabel 2) blijkt dat het vectorgedrag van het zoöplankton niet alleen bij actieve koolfiltratie optreedt maar ook bij langzame zandfiltratie. Uit het predatie-experiment op laboratoriumschaal en de doseerproefgegevens kan worden geschat of en in welke mate dit vectorgedrag de DEC van langzame zandfiltratie voor *Cryptosporidium* betekenisvol verlaagt.

In het slechtste geval is te stellen dat in de 30 dagen van het onderzoek een doorslag van 2×10^4 opgenomen oöcysten mogelijk is als vijf procent van de raderdieren (*Rotaria/Philodina*) in het influent drie oöcysten eten en hiervan tien procent het filterbed passeert (1 log zoöplanktonverwijdering). Hierdoor neemt de DEC van het langzame zandfilter voor vrije oöcysten af van 4,3 naar 4,2 log. De gemeten doorslag in het proeffilter was echter veel lager. In de 5-minuten en 24-uurs zoöplanktonmonsters zouden volgens bovenstaande benadering respectievelijk 143 en 9500 opgenomen oöcysten moeten zitten. Dit verschil kan zijn veroorzaakt doordat de aannames voor het slechtste geval te slecht waren of doordat de proeffiltergegevens de werkelijkheid niet goed beschreven (geringe terugwinning en/of 'uitscheiding' tijdens monsterneming).

Conclusie

Evenals in het voorgaande doseerexperiment blijkt dat de eliminatiecapaciteit van langzame zandfilters voor niet gebonden oöcysten met 4,3 logeenhedenverwijdering zeer hoog is, ondanks grover zand en een hogere filtratiesnelheid. Het proces van door zoöplankton gefaciliteerd transport van oöcysten door het filterbed vindt inderdaad plaats, maar het toegevoegde doorslagrisico van deze opgenomen *Cryptosporidium*-oöcysten aan het doorslagrisico van de vrije *Cryptosporidium*-oöcysten bij deze filters is zeer klein.

LITERATUUR

- 1) Wetssteyn F. (2005) Analyse microbiologische veiligheid drinkwater. VROM-Inspectie.
- 2) Hijnen W., J. Schijven, P. Bonné, A. Visser en G. Medema (2004). Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. *Wat. Sci. Technol.* 50 (1), pag. 147-154.
- 3) Dullemon Y., J. Schijven, W. Hijnen, M. Colin, A. Magic-Knezev en W. Oorthuizen (2006). Removal of microorganisms by slow sand filtration. Recent progress in slow sand and alternative biofiltration processes. IWA Publishing.
- 4) Schijven F. *et al* (2008). Effect filtratiesnelheid, temperatuur en korrelgrootte op de verwijdering van micro-organismen door langzame zandfiltratie. RIVM. Rapport 3304002.
- 5) Hijnen W, Y. Dullemon Y., J. Schijven, A. Hanzens-Brouwer, M. Rosielle en G. Medema (2007). Removal and fate of *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens* and small-sized centric diatoms (*Stephanodiscus hantzschii*) in slow sand filters. *Water Research* 41, pag. 2151-2162.
- 6) Stott R., E. May, E. Ramirez en A. Warren (2003). Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. *Water Science & Technology.* 47 (3), pag. 77-83.
- 7) Sibille I., T. Sime-Ngando, L. Mathieu en J. Block (1988). Protozoan bacterivory *Escherichia Coli* survival in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology.* 64 (1), pag. 197-202.
- 8) Bichai F., B. Barbeau, Y. Dullemon en W. Hijnen (2009). Role of predation by zooplankton in transport and fate of protozoan (oo)cysts in granular activated carbon filtration. *Water Research* 44, pag. 1072-1081.

advertentie

GIET UW WERVING VOOR OPLEIDING & PERSONEEL IN HET JUISTE VAT

Reserveer ook uw personeelsadvertentie in H₂O,
hét tijdschrift voor watervoorziening en waterbeheer.

Neem contact op met Roelien Voshol, tel. 010 - 42 74 154 of
Brigitte Laban, tel. 010 - 42 74 152

