

Batchexperimenten voor de analyse van bacteriegroei in distributienetten

Hanning Guo (Royal Haskoning (DHV), Ed van der Mark (Dunea), Peter Schaap (PWN), Geo Bakker (Vitens), Egbert Zaadstra (Brabant Water)

In het onderzoeksproject DisConTO is een waterkwaliteitsmodel ontwikkeld om meer inzicht te krijgen in bacteriegroei in drinkwaterdistributienetten. Voor verschillende Nederlandse drinkwaterbedrijven zijn de parameters van het model bepaald. TCC- en ATP-metingen in batchexperimenten laten zien dat bij hogere temperaturen duidelijk sprake is van bacteriegroei (TCC); bij lagere temperaturen is nauwelijks groei waar te nemen. De groeisnelheidsconstante en de celconcentratie bij evenwicht hebben in de meeste gevallen een positieve correlatie met de watertemperatuur. De biologische stabiliteit in distributienetten kan verder verbeterd worden door meer aandacht te besteden aan het beheersen van celconcentraties in reinwater van productielocaties.

De microbiologische kwaliteit van het drinkwater dat de productielocaties in Nederland verlaat, is in het algemeen zeer goed. Tijdens het transport naar de klanten kan de kwaliteit echter achteruitgaan, bijvoorbeeld door een stijging van de temperatuur in het leidingnet, lange verblijftijden, verouderde leidingen, leidingmateriaal, aanwezigheid van biofilms en zwevende stof en resuspensie van bezonken materiaal. De vraag hoe de waterkwaliteit vooral in microbiologisch opzicht verandert tijdens het transport door het distributienet, is nog niet bevredigend beantwoord.

Eén van de oorzaken daarvan is dat veel verschillende factoren tegelijkertijd de waterkwaliteit beïnvloeden, waardoor het effect per factor niet te isoleren valt. De zeer beperkte toegankelijkheid van het ondergrondse, gesloten distributienet maakt het er niet makkelijker op. Daar komt nog bij dat de parameters TCC (Total Cell Count) en ATP (adenosine trifosfaat), die tegenwoordig als geschikte indicatoren van de microbiologische gesteldheid worden beschouwd [1, 2], nog niet in de reguliere analyseprogramma's van de waterleidingbedrijven zijn opgenomen, waardoor het aantal analyses relatief beperkt is.

DisConTO (Distribution, Control, Training & Operation) is een onderzoeksproject van Brabant Water, Dunea, PWN, RIVM, Royal HaskoningDHV, TU Delft, Ureason en Vitens, gesubsidieerd door AgentschapNL, thans RVO. Doel van het project is om de effecten van factoren afzonderlijk te onderzoeken door drinkwater van verschillende productielocaties onder gecontroleerde omstandigheden (constante temperatuur, aan- of afwezigheid van sediment) te incuberen. Gedurende de incubatie worden TCC en ATP gemeten. Bacteriegroei in een batchproef verloopt vaak via een S-vormige curve [3]. Uit de metingen van een batchproef zijn een groeisnelheidsconstante en een evenwichtscelconcentratie af te leiden. Deze kunnen vervolgens worden gebruikt in waterkwaliteitssimulaties van een distributienetwerk.

Uitvoering van de proeven

Het drinkwater van zes productielocaties (Scheveningen, Nuland, Bergen, Kolff, Amersfoortseweg en Spannenburg) is gebruikt voor de batchexperimenten. Tabel 1 toont een aantal kwaliteitsparameters van het drinkwater van deze productielocaties. De getoonde waarden zijn gemeten in het water op de dag van monsternamen, in het voorjaar van 2012. Alleen de DOC-waarde van Nuland is in 2010 gemeten. Watermonsters werden genomen in AOC-vrije glazen flessen met glazen stoppen en vervolgens in een koelbox bij een temperatuur van 4 °C binnen vier uur getransporteerd naar Het Waterlaboratorium (HWL).

Tabel 1: Reinwater kwaliteit

Parameter	PS Nuland	PS Spannenburg	PS Bergen	PS Scheveningen	PS Kolff	PS Amersfoortseweg
TCC-totaal (cellen/ml)	350.000	220.000	190.000	110.000	100.000	75.000
TCC-intact (cellen/ml)	289.000	190.000	150.000	91.000	93.000	55.000
ATP (ng/l)	7,89	5,89	0,33	0,79	1,74	0,37
DOC (mg/l C)	2,9	2,3	n,b,	1,7	1,5	0,4
Temperatuur (°C)	12	12	11	9,4	12	10
pH	7,69	7,75	8,05	8,45	7,95	7,95
HCO ₃ (mg/l)	194	273	145	193	240	98
NTU	0,12	0,15	0,01	0,01	0,15	0,15

Invloed van temperatuur

De temperatuur in distributienetten heeft een belangrijke invloed op de bacteriegroei. Daarom is ervoor gekozen om de watermonsters te incuberen in drie klimaatkamers waarin de temperatuur constant kan worden gehouden op temperaturen van respectievelijk 5 °C, 15 °C en – afhankelijk van de waterleidingmaatschappij – 22 °C of 25 °C. De incubatie duurde 2 weken, om er zeker van te zijn dat de evenwichtsfase bereikt wordt. In deze periode is op 8 momenten een monster genomen om een groeicurve door 8 punten te kunnen bepalen. Per temperatuur zijn de monsters in duplo- of triplo-metingen ingezet.

De eerste proef met duplo-metingen is uitgevoerd voor pompstation Scheveningen in de zomer van 2011. In het najaar van 2011 werden duplo-metingen gedaan met water van Scheveningen, Nuland en Kolff. In maart tot mei 2012 volgden proeven in triplo-metingen voor alle zes de productielocaties.

Zowel TCC als ATP zijn bepaald. Door middel van flowcytometrie (FCM) is de TCC in cellen per ml bepaald [1]. Daarbij is zowel TCC-totaal als TCC-levend/intact bepaald. ATP is gebruikt als indicatie voor de mate van biologische activiteit: hoe hoger de biologische activiteit, hoe hoger ook het ATP-gehalte. ATP werd gemeten zoals beschreven in [4].

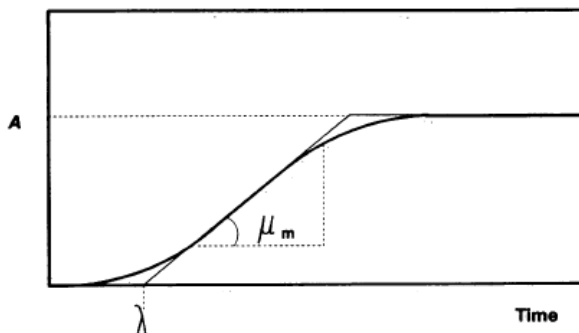
Sediment en hydraulische omstandigheden

Om het effect van sediment en hydraulische omstandigheden op de bacteriegroei te onderzoeken zijn in het najaar van 2011 en in het voorjaar van 2012 twee series batch-

experimenten gedaan met water van Scheveningen. De procedure voor de testen met sediment was niet gestandaardiseerd, bijvoorbeeld voor wat betreft keuze van de bemonsteringslocatie, schudsnelheid in de proef en hoeveelheid toegevoegd sediment. Het effect van sediment op de bacteriegroei moet daarom verder onderzocht worden en is niet beschreven in dit artikel.

Het modelleren van de groeicurves

Bacteriegroei in batchexperimenten verloopt vaak via een S-vormige curve met allereerst een aanlooffase (λ), vervolgens een fase van snelle groei en tenslotte een stationaire fase [3] (zie afbeelding 1). De aanlooffase wordt gedefinieerd als de periode van het beginpunt tot het snijpunt van de raaklijn in de snelle groeicurve en tijd aslijn [5].



Afbeelding 1: Een S-vormige groeicurve (bron: [2])

Het optreden van een aanlooffase is waarschijnlijk het gevolg van de temperatuurwisselingen: eerst van de temperatuur in het leidingnet naar de 4 °C in de koelbox en vervolgens naar de temperatuur in de klimaatkamer. In een distributienetwerk in de praktijk treden deze snelle temperatuurvariaties echter niet op en daar zal daarom ook geen sprake zijn van deze aanlooffase. Daarom zijn alleen de snelle groeifase en de stationaire fase uit de batchexperimenten van belang voor een model dat de bacteriegroei in een distributienet beschrijft.

Verschillende wiskundige modellen zoals het logistiek groeimodel en het Gompertz groeimodel worden vaak gebruikt voor het beschrijven van de kinetiek van bacteriegroei [3]. Hier wordt een aangepast logistiek groeimodel [6] gebruikt. Dit model geeft eerst een periode van steeds snellere groei en daarna een periode van steeds tragere groei naar een evenwichtsconcentratie. Dit model heeft dus geen aanlooffase in het begin.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = k \cdot C \left(1 - \left(\frac{C}{C_e} \right)^r \right)$$

C: concentratie bacteriën (cellen/ml)

C_e : evenwichtsconcentratie (cellen/ml)

k: groeisnelheidsconstante (s^{-1})

t: tijd (s)

r: aanpassingsfactor ($r > 0$)

Voor ieder batchexperiment zijn de drie constanten C_e , k en r bepaald op basis van de analyseresultaten. Dat gebeurde op de volgende manier:

- Groeisnelheidsconstante (k)

k werd bepaald uit de helling van de trendlijn van de logaritme van concentratie bacteriën in de fase van snelle groei.

- Evenwichtsconcentratie (C_e)

De evenwichtsconcentratie is bepaald als de waarde waarboven geen celgroei meer wordt waargenomen.

- Aanpassingsfactor (r)

De aanpassingsfactor is bepaald met behulp van de methode van de kleinste kwadraten.

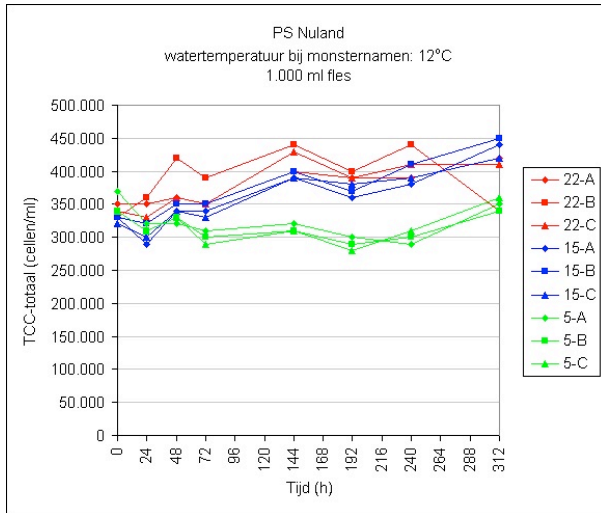
Resultaten en discussie

TCC

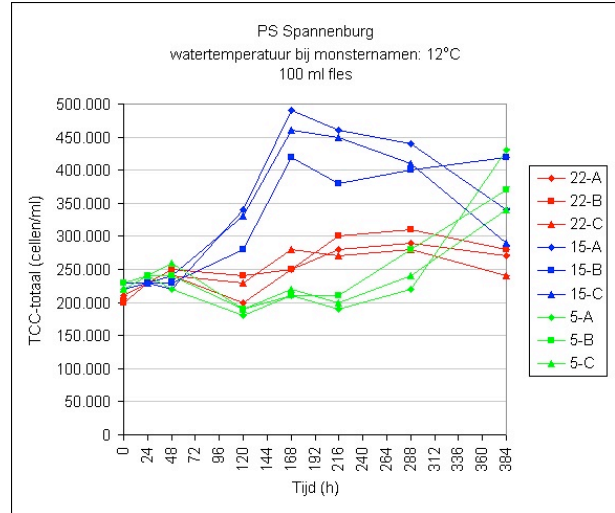
In afbeelding 2a t/m 2f zijn de groeicurves bij drie verschillende incubatietemperaturen voor elk van de zes watersoorten getoond. Duidelijk komt naar voren dat bij hogere temperaturen in het algemeen sprake is van snellere groei en van een hogere evenwichtsconcentratie. Voor pompstation Scheveningen (afbeelding 2d) is bij 15 en 25 °C het S-vormige patroon goed herkenbaar. Het water uit Nuland, Spannenburg en Kolff (resp. afbeelding 2a, 2b en 2e) vertoont duidelijk groei bij 22 °C. Het water uit Bergen (afbeelding 2c) vertoont afwijkende patronen. In de eerste drie dagen van het experiment is daar zelfs een daling van de TCC waarneembaar. Mogelijk hangt dit samen met de zeer lage ATP bij monsternamen (0,3 ng/l), terwijl deze bij de andere monsterlocaties varieerde tussen 0,8 en 8 ng/l. Daarnaast is de verhouding TCC-intact/TCC-totaal in het water van Bergen lager dan bij de andere locaties. Bergen is de enige locatie waarbij nadesinfectie plaatsvindt met ClO_2 . Dit is waarschijnlijk de verklaring voor de gevonden verschillen.

Het water van pompstation Amersfoortseweg in Apeldoorn staat bekend als zeer stabiel in microbiologisch opzicht. In afbeelding 2f valt op dat het Apeldoornse water de laagste initiële TCC-concentratie (C_0) van de zes watersoorten heeft. De spreiding in waarden van vervolgmetingen is groot, waardoor een groeipatroon niet goed af te leiden is. Mogelijk hangt dit samen met het feit dat voor deze locatie, evenals voor Bergen en Spannenburg, geïncubeerd is in monsterflessen van 100 ml in plaats van 1.000 ml. Vooral de afwijkend hoge waarden in de series 15-A en 22-A voor water van Amersfoortseweg zijn daarbij opvallend.

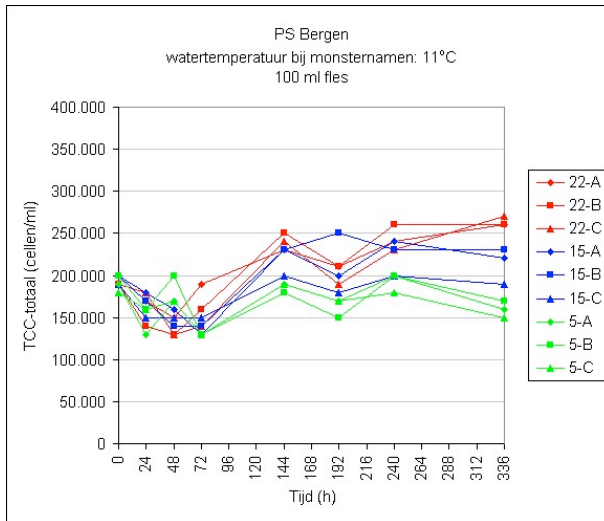
Met uitzondering van het water van pompstation Bergen vertoont de TCC-levend/intact voor alle monsters vergelijkbare patronen als de TCC-totaal, maar met lagere waarden voor C_0 en C_e . Dit is weergegeven in afbeelding 3a en 3b. De k -waarden voor TCC-intact zijn bijna zelfde als die voor TCC-totaal zoals getoond in afbeelding 4a en 4b. De afbeelding 3a, 3b, 4a en 4b zijn gemaakt met de gemiddelde waarden van duplo of triplo bepalingen.



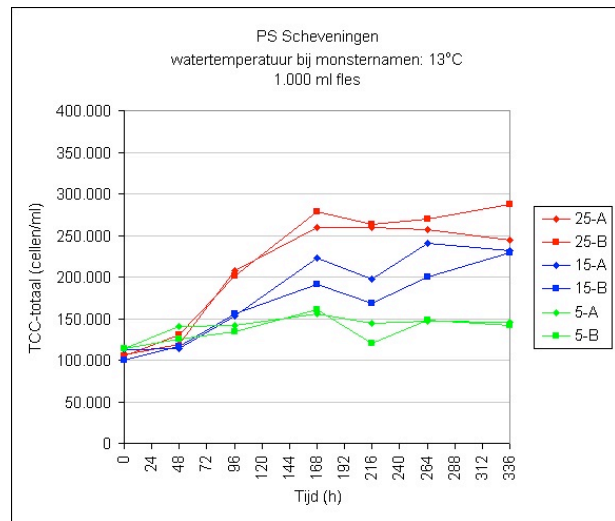
Afbeelding 2a. TCC-totaal Nuland



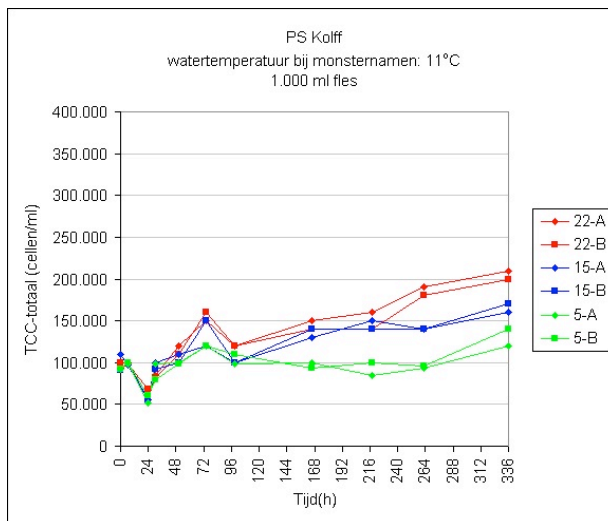
Afbeelding 2b. TCC-totaal Spannenburg



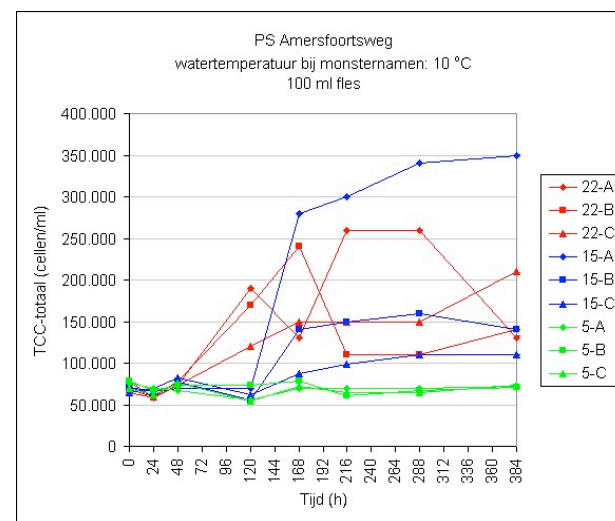
Afbeelding 2c. TCC-totaal Bergen



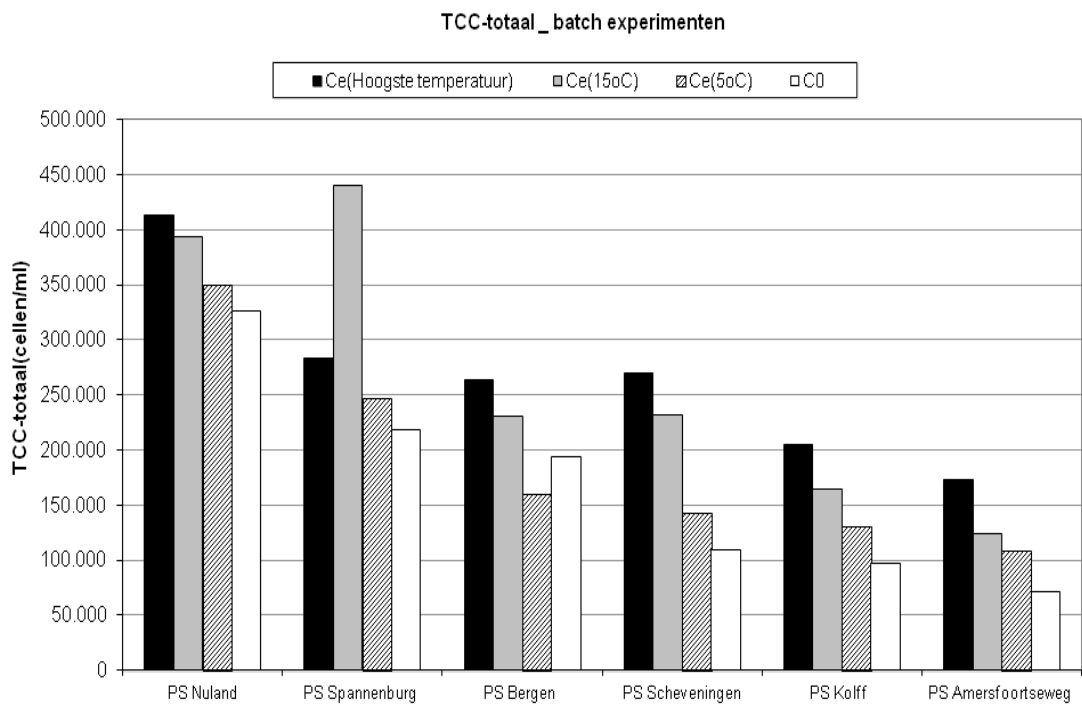
Afbeelding 2d. TCC-totaal Scheveningen



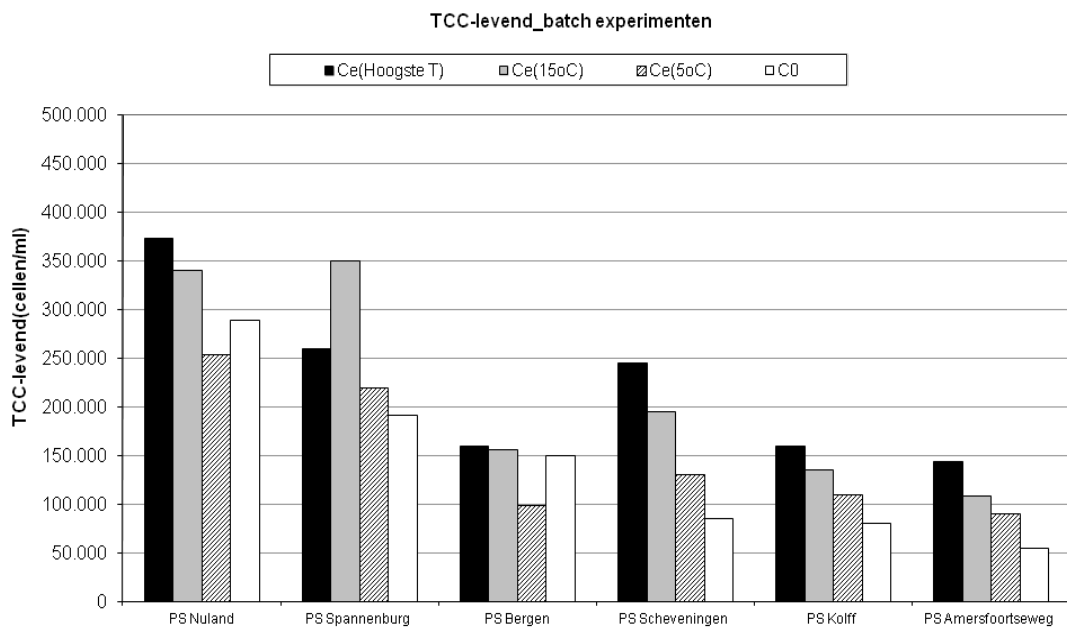
Afbeelding 2e. TCC-totaal Kolf



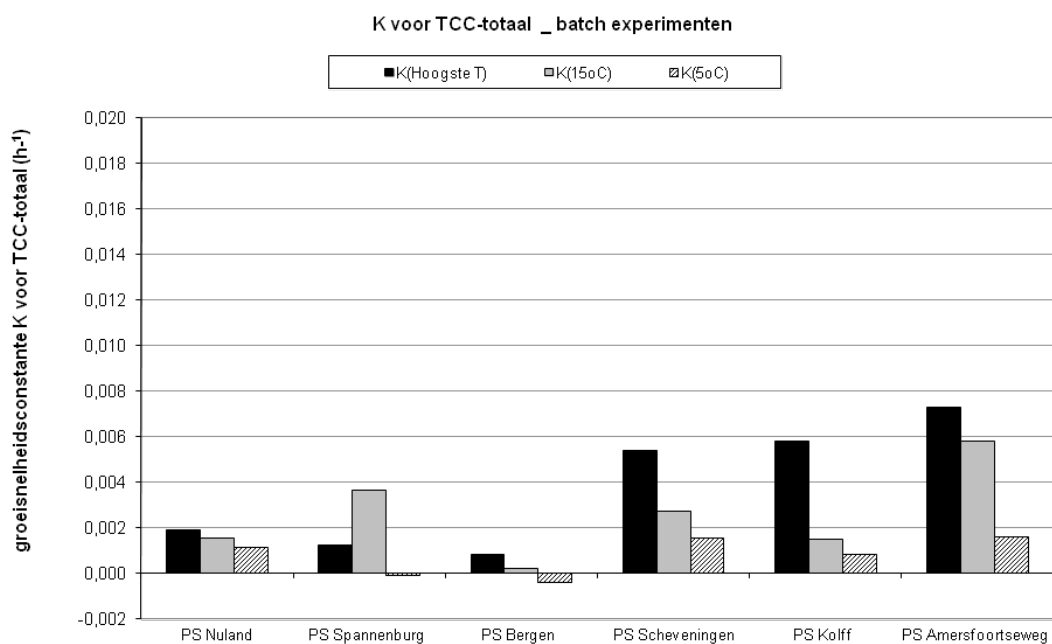
Afbeelding 2f. TCC-totaal Amersfoortseweg



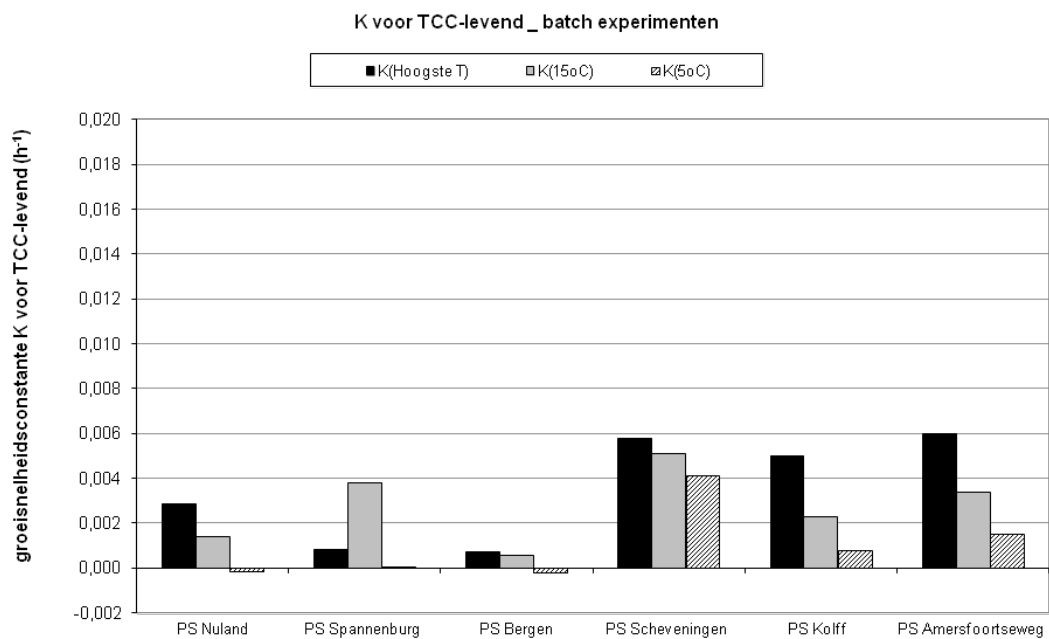
Afb. 3a. Overzicht van C_0 en C_e waarden van TCC-totaal



Afb. 3b. Overzicht van C_0 en C_e waarden van TCC-intact



Afb. 4a. Overzicht van k waardes van TCC-totaal



Afb. 4b. Overzicht van k waardes van TCC-intact

ATP

De ATP-waarden vertoonden bij geen van de watersoorten een duidelijke S-vormige groeicurve in de incubatieproeven. ATP is een maat voor biologische energie en hangt niet direct samen met het totale aantal organismen. De ATP-concentratie kan dalen terwijl het aantal organismen stijgt, en kan stijgen bij een gelijkblijvende TCC.

Effect van de watertemperatuur

Er is een duidelijke stijging van de maximale TCC waarneembaar in de monsters die zijn geïncubeerd bij temperaturen van 15 °C en hoger, terwijl bij een incubatietemperatuur van 5 °C geen duidelijke stijging te zien is, zie daarvoor ook afbeelding 3a en 3b. Dit bevestigt het beeld dat het risico van bacteriegroei in distributienetwerken vooral speelt bij watertemperaturen boven de 15 °C. Voor de meeste monsters zijn de waarden voor k en C_e hoger naarmate de temperatuur hoger is. Alleen het water van Spannenburg toont een sterkere groei en hogere evenwichtsconcentratie bij 15 °C dan bij 22 °C (zie afbeelding 3a, 3b, 4a en 4b).

Effect van de waterkwaliteit

Afbeelding 3a en 3b laten zien dat een hogere initiële TCC-waarde in grote lijnen correspondeert met een hogere TCC evenwichtsconcentratie, met uitzondering van het water van pompstation Spannenburg bij 15 °C en de TCC-intact waardes van het water van pompstation Bergen. De C_0 waardes en de C_e waardes voor TCC-totaal vertonen allemaal dezelfde volgorde van laag naar hoog:

Amersfoortseweg, Kolff, Scheveningen, Bergen, Spannenburg, Nuland. Eerder uitgevoerd KWR onderzoek [7] liet dezelfde volgorde voor de biologische stabiliteit van deze zes watersoorten zien op basis van historische gegevens van het koloniegetal bij 22 °C en *Aeromonas* in de distributienetwerken. De C_0 en C_e waarden van TCC kunnen dus goede indicatoren zijn voor de biologische stabiliteit.

Effect van het monstervolume

Voor de batchexperimenten in 2011 zijn monsterflessen van 1.000 ml gebruikt. Voor enkele experimenten in 2012 zijn monsterflessen van 100 ml gebruikt, in verband met de beschikbare ruimte in de klimaatkamers voor de relatief grote aantallen monsterflessen.

Het verschil tussen de gemeten TCC-waarde en de gemiddelde TCC-waarde van de duplometingen in een 1.000 ml fles (0-5%) is kleiner dan in de 100 ml fles (0-20%). Dit geeft aan dat het monstervolume van 100 ml leidt tot een aanzienlijke extra onnauwkeurigheid en dus te klein is. Bij grotere monstervolumina volstaan metingen in duplo om betrouwbare resultaten te bereiken.

Conclusies

In batchexperimenten kunnen de proefomstandigheden worden ontworpen en beheerst. Het effect van verschillende factoren op de bacteriegroei kan afzonderlijk worden onderzocht voor een bepaald type water.

Uit de analyse van de testresultaten kunnen oplossingen worden afgeleid voor het verbeteren van de biologische stabiliteit in een distributienetwerk. Zo kan bijvoorbeeld het reduceren van de TCC-concentratie in het geproduceerde water de biologische stabiliteit van het water verbeteren.

Uit de resultaten van de batchtests trekken wij een aantal conclusies::

- Voor alle onderzochte watersoorten vertoont de TCC een duidelijk groei bij temperaturen tussen 15 en 25 °C, maar geen duidelijk groei bij 5 °C.
- De constanten C_e en k voor TCC kunnen worden afgeleid uit de resultaten van de batchexperimenten. Beide hebben een positieve correlatie met de watertemperatuur, met uitzondering van het water van pompstation Spannenburg.
- C_0 en C_e voor TCC zijn bruikbare indicatoren voor de biologische stabiliteit van drinkwater.
- Op basis van de C_0 en C_e voor TCC is de rangorde van de biologische stabiliteit van de onderzochte locaties van meest stabiel naar minst stabiel: Amersfoortseweg, Kolff, Scheveningen, Bergen, Spannenburg, Nuland.
- 100 ml flessen zijn te klein voor batchgroeiexperimenten. Bij gebruik van 1.000 ml flessen is uitvoering in duplo voldoende voor het bereiken van betrouwbare resultaten.

Het is onmogelijk om conclusies te trekken over het effect van sedimenten op bacteriegroei zonder dat er een gestandaardiseerde testmethode is. Er zijn meer tests nodig om de effecten beter te begrijpen.

Vervolg

Aanvullende batchexperimenten en praktijkmetingen in de zomerperiode worden gebruikt voor validatie van het waterkwaliteitsmodel. De batchexperimenten worden aangepast om betere resultaten te verkrijgen. Er wordt gebruik gemaakt van 250 ml flessen (met 200 ml watermonster) voor deze tests. Dat heeft een heel praktische reden: er is te weinig incubatieruimte beschikbaar om 1l-flessen te kunnen gebruiken. Verder zullen tijdens de batchexperimenten in de zomerperiode de effecten van de seizoenen op de bacteriegroei en biologische stabiliteit worden onderzocht.

Er wordt nog meer aandacht besteed aan de monsternamen op de zuivering en aan de analyses op het lab. Het verdient bijvoorbeeld de voorkeur om de analyses door dezelfde laborant uit te laten voeren.

Dit onderzoek is door onderzoekster Hanning Guo uitgevoerd in het DisConTO project (Distribution Control Training & Operation). Dit project is een samenwerking van de waterleidingbedrijven Vitens, Dunea, PWN en Brabant Water, Technische Universiteit Delft, het RIVM, RoyalHaskoningDHV en UReason. Het project wordt financieel ondersteund door het InnoWater programma van AgentschapNL (thans RVO).

Literatuur

1. Hammes F., M. Berney, Y. Wang, M. Vital, O.Koster en Th. Egli (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research* 42(1-2), pag. 269-277.
2. Van der Wielen, P. en D. van der Kooij (2010). Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Water Research* 44(17): 4860-4867.
3. Zwietering, M.H., I. Jongenburger, F.M. Rombouts en K. van 't Riet (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. Juni 1990. p. 1875-1881.
4. Magic-Knezev, A., D. van der Kooij, D. (2004). Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Research* 38 (2004): 3971–3979.
5. Teleken, J. T., W. S. Robazza, G. A. Gomes (2011). Mathematical modeling of microbial growth in milk. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2011 Vol. 31 No. 4 pp. 891-896.
6. Dhanasekar. R., T. Viruthagiri en P.L. Sabarathinam (2002). Poly (3-hydroxy butyrate) synthesis from mutant strain *Azobacter vinelandi* utilizing glucose in a batch reactor. *Biochem. Eng. J.*, 10:1-8.
7. KWR rapport, BTO 2011.001, Inventarisatie van *Aeromonas* en koloniegetal 22 °C in drinkwater en relaties met fysisch/chemische parameters. Januari 2011.