



Willem Jan Knibbe, Oasen

Ruud Kolpa, Oasen

Andrew Mercer, TU Delft, thans Watercare Services Ltd. New Zealand

Jasper Verberk, TU Delft

Biologische stabiliteit van drinkwater verkend met flowcytometrie

De biologische stabiliteit van drinkwater in het leidingnet is van grote invloed op de kwaliteit van het water dat de klant bereikt. Ook het optreden van bacteriologische besmettingen wordt mede bepaald door de biologische stabiliteit. Voor meer kwantitatieve informatie over deze biologische stabiliteit hebben Oasen en de TU Delft flowcytometrie uitgeprobeerd als een snelle nieuwe meetmethode. Flowcytometrie is een techniek voor het tellen en karakteriseren van biologische cellen. De techniek is toegepast in enkele zuiveringsstations en het distributienet van Oasen. De resultaten zijn vergeleken met het gehalte aan de energiedrager ATP, een andere maat voor de hoeveelheid levend materiaal. De gevonden niveaus variëren afhankelijk van de ruwwaterbron, nemen toe in de zuivering en nemen af na filtratie. Het gehalte aan ATP volgt in de zuivering ruwweg hetzelfde patroon. In het distributienet nemen zowel het aantal cellen als ATP licht af. We concluderen dat flowcytometrie nuttige nieuwe informatie oplevert over aantallen cellen. Op basis hiervan is goed te zien waar de hoeveelheid levend materiaal toe- of afneemt.

Drinkwater dat bereid is uit (oever) grondwater, wordt in Nederland gedistribueerd zonder desinfectiemiddel. Daarmee is het voor kwaliteit en veiligheid noodzakelijk dat er geen of weinig nagroei van (pathogene) bacteriën plaatsvindt in het water vanaf het zuiveringsstation tot bij de klant thuis. Groei van bacteriën kan leiden tot smaakklachten of gezondheidsrisico's. Nieuwe meettechnieken bieden de mogelijkheid voor het snel en inzichtelijk karakteriseren van bacteriën in het drinkwater. In dit onderzoek verkennen we één van deze technieken: flowcytometrie. Een overzicht van mogelijke technieken is te vinden in een IWA-publicatie¹. Flowcytometrie biedt in vergelijking met bestaande technieken als potentieel voordeel de mogelijkheid tot het snel tellen en karakteriseren van cellen, als maat voor het aantal bacteriën.

Flowcytometrie is gebaseerd op lichtverstrooiing en fluorescentie. Een bundel laserlicht die verstrooid wordt door een dunne straal water, wordt beïnvloed door het passerende levend materiaal. Fluorescentie treedt op door fluorescerend materiaal toe te

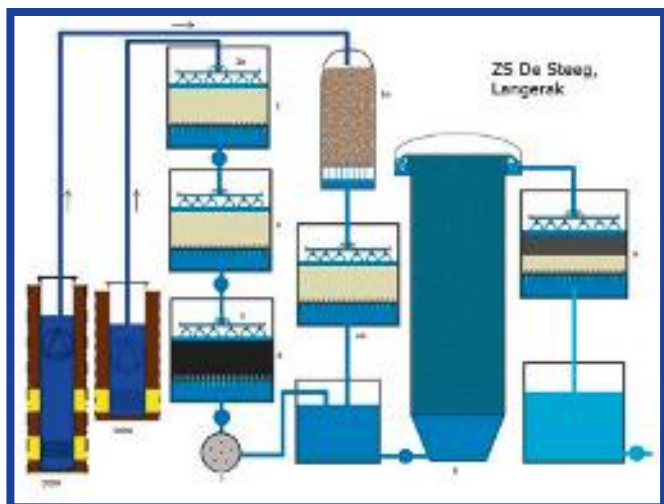
voegen dat, afhankelijk van de cellen, hieraan hecht. Door het verstrooide licht te meten, evenals het door fluorescentie opgewekte licht, kan bepaald worden hoeveel en welke typen cellen in water aanwezig zijn. De gemeten signalen worden via een geautomatiseerde analyse vertaald in aantallen en eigenschappen van cellen. In dit onderzoek is de techniek beperkt tot het tellen van cellen, in aantallen per ml. De eigenschappen zijn niet bepaald. Dit is een mogelijkheid voor verder onderzoek, om bijvoorbeeld meer informatie over de aanwezige soorten te verkrijgen². Biologische activiteit in water kan ook gemeten worden met ATP (adenosine trifosfaat), een energiedrager voor levende cellen. Het gehalte ATP, gemeten in ng/l, is in dit onderzoek gebruikt als vergelijking met de gemeten aantallen cellen. Meer informatie over ATP in drinkwater als maat voor biologische activiteit is te vinden in Water Research³.

Onderzochte zuiveringsstations en distributienet

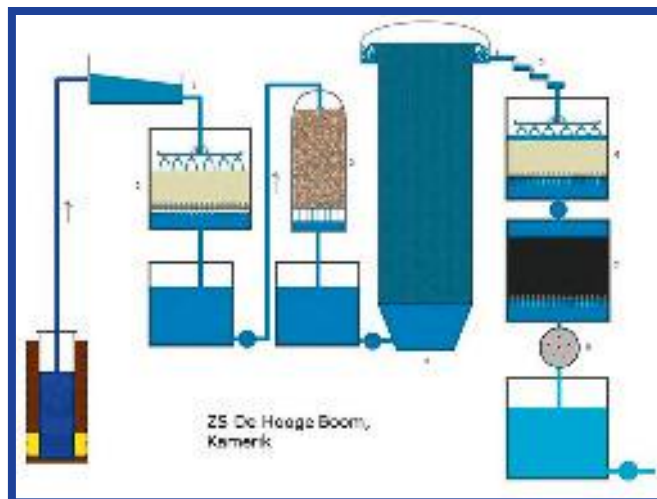
Twee zuiveringsstations met het achterliggende distributienet zijn onderzocht: De

Steeg bij Langerak dicht bij de Lek, en De Hooge Boom bij Woerden. Beide zuiveringsstations zuiveren anaeroob (oever) grondwater. De Steeg zuivert water zowel uit het eerste als het tweede watervoerend pakket; De Hooge Boom alleen uit het eerste watervoerend pakket. Het zuiveringsproces van De Steeg bestaat voor diep grondwater (tweede watervoerend pakket) uit achtereenvolgens torenbeluchting en snelfiltratie en voor ondiep grondwater (1e watervoerend pakket) uit twee maal snelfiltratie gevolgd door actief koolfiltratie. Na actief kool volgt een lage dosering UV voor het verlagen van kiemgetallen na reactivatie van het actief kool. Beide stromen worden vervolgens samengevoegd voor pelletontharding en carry-overfiltratie. Het zuiveringsproces van De Hooge Boom bestaat uit plaatbeluchting en snelfiltratie, gevolgd door torenbeluchting, pelletontharding en carry-overfiltratie en actief koolfiltratie, ook hier gevolgd door een lage dosis UV.

Het bemeten reine water van zuiveringsstation De Steeg kent relatief lage gehalten



Afb. 1: Schematische weergave van zuiveringsstation De Steeg.



Afb. 2: Schematische weergave van zuiveringsstation De Hooge Boom.

aan potentiële voedingsstoffen voor biologie (AOC en DOC), een lagere belasting aan biologie (gemeten als ATP) en een relatief lage nagroeipotentie (BFP) en -snelheid (BFR) (zie tabel). Zuiveringsstation De Hooge Boom is juist rijk aan potentiële voedingsstoffen en kent dan ook hogere ATP-gehalten en BFR- en BFP-waarden. De biologische stabiliteit van De Steeg is hoger dan die van De Hooge Boom. Dit verschil in biostabiliteit was de reden om beide zuiveringsstations en het achterliggende distributienet te selecteren voor onderzoek. Meer informatie over de relevante verschillen in waterkwaliteit is te vinden in een publicatie van Oasen⁴⁾.

Metingen van flowcytometrie en ATP zijn voor beide zuiveringsstations verricht na elke zuiveringsstap. Hiervoor zijn standaard monsterkranen gebruikt, doorgelopen tot de temperatuur stabiel was, vervolgens thermisch gesteriliseerd en daarna weer door doorstroming gekoeld. In het distributienet van beide zuiveringsstations zijn metingen verricht op verschillende afstanden, waaraan via het distributienetmodelprogramma Aleid

verblijftijden zijn gekoppeld. Metingen van TCC zijn uitgevoerd via kranen bij klanten thuis, gericht op het netwerk van De Hooge Boom.

Meetresultaten zuiveringsstations

Metingen op het zuiveringsstation De Steeg van TCC en het gehalte aan ATP in oktober 2010 zijn weergegeven in afbeelding 3. In beide figuren is te zien dat de laagste waarden worden gevonden in ruw water, wat overeenkomt met de ervaring dat dit water bacteriologisch betrouwbaar en biologisch stabiel is. Verder valt op dat voor De Steeg de beginwaarden liggen op 2 ng/l ATP en een TCC van 40.000/ml en dat beide waarden stijgen bij de eerste zuiveringsstappen. Naar verwachting verhoogt met name de snelfiltratie - waar ijzer biologisch wordt omgezet⁵⁾ - de waarden van TCC en ATP. Actief koolfiltratie verhoogt beide waarden verder. Bekend is dat zich ook in deze stap biologische processen afspelen. De biologische parameters dalen pas weer na de carry-overfiltratie. Als laatste stap is te zien

dat in de reinwaterbergingen (Zoeterwoude en Hazerswoude) de TCC licht en het gehalte aan ATP duidelijk stijgt.

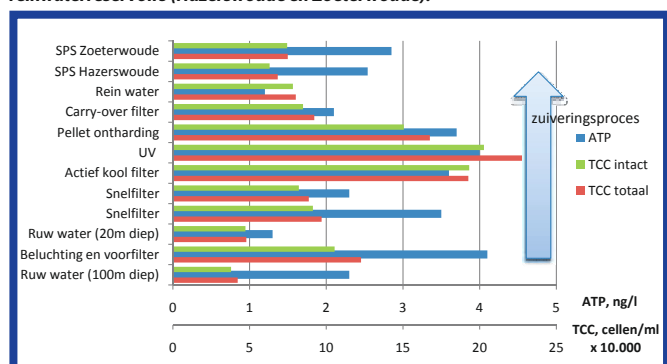
Afbeelding 4 toont de metingen voor De Hooge Boom. Het ruwe water bevat 20 ng/l ATP en 80.000/ml TCC. Dit is voor beide parameters aanmerkelijk hoger dan voor De Steeg. Wij verwachten dat dit samengaat met de hogere waarden voor organisch materiaal, zoals te zien is in de tabel. Beluchten en snelfiltratie verhoogt ook hier de TCC. Het leidt echter tegelijkertijd tot een verlaging van het gehalte aan ATP. Dit laatste wijst op minder activiteit van de cellen, mogelijk omdat voor dit grotere aantal het voedingsaanbod in het gezuiverde water ontbreekt. Verder op in de zuivering neemt de TCC niet af, terwijl na actief koolfiltratie het gehalte aan ATP wel afneemt. Dit zou er ook op kunnen wijzen dat in het filter voedingsmateriaal voor de cellen achterblijft. In tegenstelling tot zuiveringsstation De Laak is in de reinwaterberging het gehalte ATP gedaald. Het gedrag van TCC en ATP verschilt dus tussen de verschillende zuiveringen.

In het algemeen zijn de verschillen tussen TCC_{totala} en TCC klein. Na de UV op De Steeg en na pelletontharding op De Hooge Boom zijn de verschillen het grootst. Blijkbaar leidt UV hier direct tot beschadigingen. Onduidelijk is waarom dit effect op De Hooge Boom niet te zien is. Voor het effect van pelletontharding op dit verschil bij De

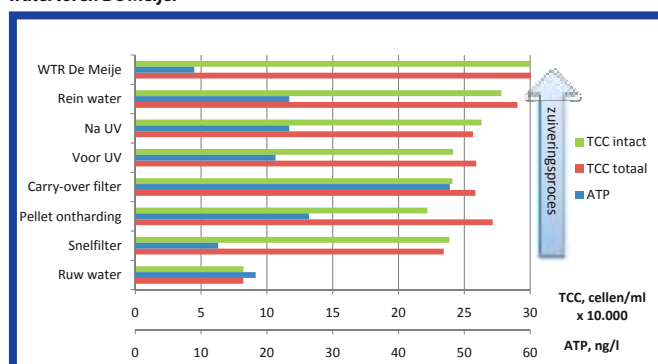
Gehaltes assimileerbaar organisch koolstof (AOC), opgelost organisch koolstof (DOC), biofilmgroeisnelheid (BFR), biofilmvormingspotentie (BFP) en gehalte ATP voor zuiveringsstations De Steeg en De Hooge Boom.

	AOC (µg/l)	DOC (mg/l)	BFR (pg/cm2/dag)	BFP (pg/cm2)	ATP (ng/l)
De Steeg	6,4	1,9	0,9	110	2,4
De Hooge Boom	10,8	5,5	18,3	2.100	9,7

Afb. 3: Metingen van TCC en ATP in zuiveringsstation De Steeg. De stappen in het zuiveringsproces lopen in de figuur van onder naar boven en eindigen bij twee reinwaterreservoirs (Hazerswoude en Zoeterwoude).



Afb. 4: Metingen van TCC en ATP in zuiveringsstation De Hooge Boom. De stappen in het zuiveringsproces lopen van onderen naar boven en eindigen bij de watertoren De Meije.



Hooge Boom hebben we vooralsnog geen verklaring. Dit effect treedt overigens ook op De Steeg op.

Meetresultaten distributienet

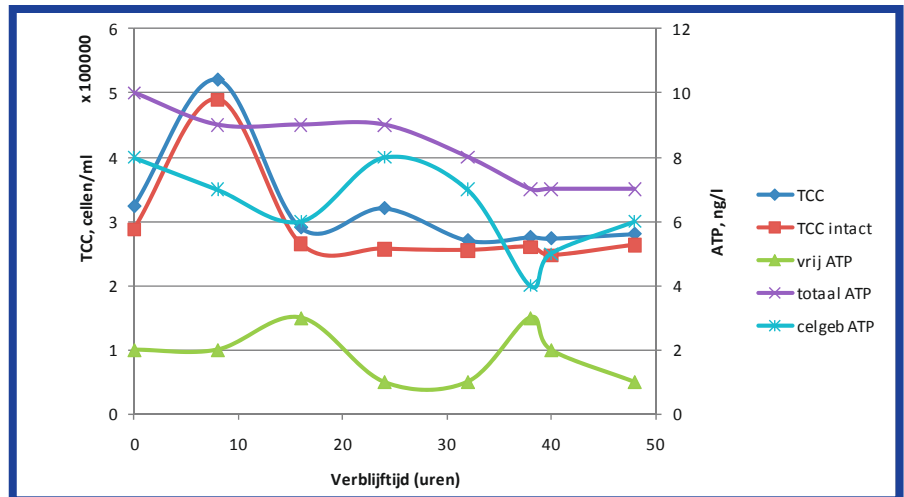
Afbeelding 5 toont metingen van de tweede meet sessie in december 2010, uitgevoerd voor het distributienet van zuiveringsstation De Hooge Boom. Deze metingen zijn verricht aan binnenkranen, om opwerveling van sediment en daaraan gekoppelde biologie te vermijden. De TCC-waarden aan het begin van het distributienet bedragen 300.000/ml en van ATP 10 ng/l. Deze zijn ruwweg gelijk aan de waarden die gevonden zijn in een eerdere meet sessie op de zuiveringsstations in oktober. De trend in het gehalte van ATP is dalend, met een klein verschil tussen totaal en celgebonden ATP. ATP functioneert als energiedrager in cellen. Meer ATP buiten cellen bij een groot verschil tussen celgebonden en vrij ATP kan wijzen op celbeschadigingen. De waarden vallen in dezelfde orde van grootte als gevonden door Van der Wielen en Van der Kooij in 2011³⁾. De trend voor TCC in het distributienet als functie van de tijd toont meer variatie, met een duidelijke piek op t = 8 uur in de watertoren. Hierna blijft het ruwweg constant.

Dit resultaat is enigszins verrassend, omdat hier geen duidelijke aanwijzingen volgen voor biologisch instabiel water. Gegeven de hoeveelheid organisch materiaal werd dit wel verwacht. Het seizoen (winter) kan dit mogelijk verklaren. Van der Wielen & Van der Kooij³⁾ vonden bijvoorbeeld hogere waarden voor het ATP-gehalte in de lente en de herfst dan in de winter.

Conclusies

Uit het onderzoek blijkt dat TCC en ATP inzicht geven in de biologische stabiliteit van ongezuiverd, gezuiverd en gedistribueerd drinkwater. Het valt op dat in ongezuiverd water lage waarden voor zowel TCC als ATP gevonden worden, vergeleken met de waarden in gezuiverd en gedistribueerd water.

In het zuiveringsproces verhoogt beluchting en snelfiltratie van het ruwe water de TCC, terwijl snelfiltratie na ontharding de TCC reduceert. Beluchting en met name biologische processen in het filter zijn de oorzaak van de verhoging. Hetzelfde geldt voor verhogingen na actief koolfilters.



Afb. 5: Metingen van TCC en ATP in het distributienet van De Hooge Boom. Meetlocaties zijn omgerekend naar verblijftijden. Het eerste meetpunt is direct bij de zuivering, het tweede in de watertoren, de volgende punten zijn in het net.

Biologische processen vinden in veel mindere mate plaats in het carry-over filter na ontharding.

Het distributienet toont een geleidelijk verloop van TCC en ATP met een constante of dalende trend. Slechts de watertoren toont stijging in TCC, maar niet in ATP. Het is interessant in een vervolgonderzoek te meten bij een hete zomer, evenals de metingen te vergelijken met overige parameters zoals *Aeromonas* en kolonietellingen. Een vergelijking van ATP, *Aeromonas* en kolonietellingen is recent langjarig onderzocht⁶⁾. Het onderzoek van Vitens en enkele andere organisaties naar de biodiversiteit in het leidingnet, waar met DNA-technieken naar de samenstelling van het water wordt gekeken, zal zeker ook tot meer inzicht leiden. Dit inzicht is nodig voordat Oasen een besluit zal nemen over het gebruik van TCC en ATP voor analyses van biologische stabiliteit.

LITERATUUR

- 1) Dufour A., M. Snozzi, W. Koster, J. Bartram, E. Ronchi en L. Fewtrell (2003). Assessing microbial safety of drinking water - Improving approaches and methods. IWA Publishing for WHO & OECD.
- 2) Hammes F., C. Berger, O. Köster en T. Egli (2010). Assessing biological stability of drinking water without disinfectant residuals in a full-scale water supply system. *Journal of Water Supply: Research and Technology*, pag. 31-40.
- 3) Van der Wielen P. en D. van der Kooij (2010). Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated water in the Netherlands. *Water Research*, pag. 4860-4867.
- 4) Mercer A. (2010). Rapid measurement tools for the biological quality of drinking water. Oasen.
- 5) De Vet W. (2011). Biological drinking water treatment of anaerobic groundwater trickling filters. TU Delft.
- 6) Van der Mark E., A. Magic-Knezev, L. Zandvliet en T. Ramaker (2012). Biologische stabiliteit van drinkwater in een ander daglicht. *H₂O* nr. 4, pag. 30-32.
- 7) Rompré A., P. Servais, J. Baudart, M.-R. de-Roubin en P. Laurent (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods* pag. 31-54.
- 8) Siebel E., Y. Wang, T. Egli en F. Hammes (2008). Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during heterotrophic plate counts during. *Drinking Water Engineering and Science Discussions*, pag. 71-86.
- 9) 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.
- 10) Veal D., D. Deere, B. Ferrari, J. Piper en P. Attfield (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, pag. 191-210.