

Ontwikkeling van een methode om de nagroei-mogelijkheid van bacteriën in drinkwater te bepalen

Inleiding gehouden tijdens het op 28 november 1978 door KIWA en VWN georganiseerde colloquium over Methodenontwikkeling ten behoeve van waterkwaliteitsmeting.

relatie watervlo/mens is nóg slechter te leggen dan de relatie vis/mens, terwijl de benodigde laboratoriumfaciliteiten aanzienlijk zijn.

Voorlopig zullen de inspanningen gericht blijven op de ontwikkeling van de reeds genoemde korte duur testen. Met nadruk moet er op gewezen worden, dat het hier gaat om de ontwikkeling van screenings-testen. In het geval dat positieve effecten gevonden worden, zullen meer testen en mogelijk langeduur onderzoeken nodig zijn om definitief zekerheid te verkrijgen omtrent de gevonden effecten.

Wanneer een bepaalde waterkwaliteit met de korteduur screeningstesten onderzocht wordt, zal een redelijke indruk verkregen kunnen worden over de actueel toxicologische kwaliteit van het water.

Bovendien zal het goed mogelijk zijn de efficiency van de zuivering, met betrekking tot het verwijderen van toxische stoffen, te bepalen.

Literatuur

1. Jung, K. D. (1973). *Extrem fischtossische Substanzen und ihre Bedeutung für ein Fischtestwarnsystem*. GWF-Wasser/Abwasser, 114, 232-234.
2. Dawson, G. W., Stradley, M. W., Shuckrow, A. J. (1975). *Determination of harmful quantities and rates of penalty for hazardous substances*, Volume II, EPA-440/9-75-005-b.
3. Genderen, H. van, Canton, J. H., Leeuwang, P., Strik, J. J. T. W. A. (1973). *Report to the commission of the European Communities on a toxicological examination of a number of micro-pollutants of surface water*.
4. Water Pollution Control (1966). WHO Techn. Rep. Ser. no. 318.
5. Poels, C. L. M., Gaag, M. A. van der, Kerkhoff, J. F. J. van de. *Longterm toxicological investigation of Rhinewater with Rainbow trout (Salmo gairdneri, Rich)*. In voorbereiding.
6. McKim, J. M. (1977). *Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity*. J. Fish. Res. Bd. Can. 34, 1148-1154.
7. Prein, A. E., Thie, G. M., Alink, G. M., Koe-man, J. H., Poels, C. L. M. (1978). *Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine*. Science of the Total Envir., 9, 287-291.
8. Chiou, C. T., Freed, V. H., Schmedding, D. W., Kohnert, R. L. (1977). *Partition coefficient and bioaccumulation of selected organic chemicals*. Envir. Sci. & Techn. 11, 475-478.

Inleiding

1. Nadelen verbonden aan nagroei

In bepaalde omstandigheden kan de kwaliteit van drinkwater tijdens het verblijf in het leidingnet zodanig veranderen, dat het waterleidingbedrijf wordt geconfronteerd met distributie-technische problemen en met klachten van consumenten. Micro-organismen spelen een belangrijke rol bij deze kwaliteitsverandering, met name wanneer ze zich sterk vermeerderen in het distributiesysteem. Met nadruk moet er echter op worden gewezen dat de nadelen verbon-



IR. D. VAN DER KOOIJ
KIWA NV

den aan deze vermeerdering van technische en esthetische aard zijn en dat de hygiënische kwaliteit van het drinkwater door deze zgn. nagroei vrijwel nooit wordt beïnvloed. De belangrijkste bezwaren verbonden aan het optreden van nagroei in drinkwater-distributiesystemen zijn:

1. Ontwikkeling van hogere organismen in het leidingnet.
2. Smaakverslechtering van het drinkwater.
3. Versterkte aantasting van leidingmaterialen.
4. Bemoeilijking van de kwaliteitscontrole.
5. Mogelijkheid tot ontwikkeling van opportunistisch pathogene bacterietypen.

Over de mate waarin deze bezwaren kunnen leiden tot klachten van de consumenten, wordt informatie verschaft door Windle Taylor (1965). De microbiologische aard en achtergronden van genoemde bezwaren zijn in een eerdere publicatie vermeld door Van der Kooij en Zoeteman (1978).

2. Nagroei-bepalende factoren

Alvorens in te gaan op methoden waarmee deze nagroei voorkómen of bestreden kan worden, eerst iets over de factoren die het optreden van nagroei beïnvloeden. De belangrijkste factoren die hierbij een rol spelen zijn:

1. Aard en concentratie van afbreekbare verbindingen in het bereide water.
2. Aard van het leidingmateriaal.
3. De watertemperatuur.
4. De verblijftijd van het water in het leidingnet.

Uiteraard heeft de aanwezigheid van een

desinfectiemiddel in water eveneens een grote invloed op de nagroei-mogelijkheid van micro-organismen. Deze 'on-natuurlijke' factor wordt in dit artikel verder buiten beschouwing gelaten.

Micro-organismen kunnen zich alleen vermeerderen in het leidingnet als de verbindingen die ze nodig hebben voor hun groei aanwezig zijn. Deze verbindingen moeten de voor de opbouw van het celmateriaal benodigde elementen (o.a. C, H, O, N, P, S) leveren, terwijl ze bovendien in de energiebehoefte van de cellen moeten voorzien. De organismen kunnen worden onderscheiden op basis van het type verbinding, dat wordt benut voor de energiebehoefte (anorg-H of org-H); de koolstofbehoefte (anorg-C of org-C) en de aard van de waterstofacceptor (O₂ of NO₃⁻, SO₄⁼, CO₂, Org-C).

De meeste nagroeiende micro-organismen, en met name de bacteriën die bijdragen in het koloniegetal van drinkwater zijn chemo-organo-heterotroof van aard, d.w.z. dat ze organische koolstofverbindingen gebruiken als C- en energiebron, terwijl ze zuurstof gebruiken als waterstof-acceptor. De mate waarin micro-organismen de verschillende typen verbindingen nodig hebben blijkt ondermeer uit de bruto-samenstelling van hun celmateriaal (droge stof). Deze bruto-samenstelling luidt: C₅ H₇ NO₂ P¹/30; waarin: C : N : P = 60 : 14 : 1. Daar van de opgenomen organische koolstof ca. 50 % wordt omgezet in CO₂ (dissimilatie) voor de energievoorziening van de cel en 50 % wordt vastgelegd in nieuw celmateriaal (assimilatie) kan als vuistregel worden gehanteerd dat de opneembare C-, N- en P-verbindingen nodig zijn in de verhouding: C : N : P = 100 : 10 : 1.

De concentratie van organische koolstofverbindingen in allerlei drinkwatertypen ligt in de regel tussen enkele tienden en enkele milligrammen per liter. Deze verbindingen hebben veelal allerlei biologische processen doorstaan en slechts een zeer gering gedeelte kan nog worden benut als V- en als energiebron. Verbindingen die als N-bron kunnen dienen, en met name nitraat, zijn eveneens in de regel aanwezig in concentraties variërend van enkele tienden tot enkele milligrammen per liter, terwijl orthofosfaat-concentraties variëren van enkele tientallen tot enkele honderden micro-grammen per liter. Gezien de relatief grote behoefte van micro-organismen aan organische verbindingen die als koolstof en energiebron dienst kunnen doen, is het gehalte aan dit type verbindingen vrijwel steeds bepalend voor de vorming van celmateriaal, d.w.z. voor de groei van micro-organismen in drinkwater.

Het is daarom van groot belang te beschikken over een methode waarmee het gehalte

van deze koolstofverbindingen, vanaf nu aangeduid met assimileerbare organische koolstof (AOC) in drinkwater kan worden bepaald. Met behulp van een meetmethode voor het AOC-gehalte van water kan dan namelijk informatie worden verkregen over de relatie tussen het optreden van nagroei en dit AOC-gehalte terwijl hiermee ook de invloed van allerlei waterbehandelingsprocessen op dit AOC-gehalte kan worden gemeten.

De bepaling van het AOC-gehalte

1. Algemeen

Over de aanwezigheid van afbreekbare verbindingen die bijdragen aan het AOC-gehalte van drinkwater zijn nauwelijks gegevens beschikbaar.

Eenzijds zijn vrijwel altijd allerlei gemakkelijk afbreekbare verbindingen zoals aminozuren, lagere vetzuren en hydroxycarbonzuren in uiterst lage concentraties in het water aanwezig, anderzijds is het niet uitgesloten dat opgeloste humus- en fulvinezuren ten dele worden benut door sommige micro-organismen. Tenslotte bestaat de mogelijkheid dat drinkwater in sommige leidingen wordt verontreinigd met afbreekbare verbindingen, die uit het leidingmateriaal afkomstig zijn (Burman and Colbourne, 1977).

2. Toepassingsmogelijkheid van chemische methoden

Het AOC-gehalte kan niet met chemische methoden worden bepaald. Dit is een gevolg van het algemene probleem, dat de biologische betekenis van een bepaalde verbinding niet zonder meer in chemische termen kan worden gedefinieerd. Wat de AOC-gehalte betreft ligt dit probleem vooral besloten in de volgende punten:

1. het AOC-gehalte bestaat uit talloze verschillende verbindingen;
2. veel afbreekbare verbindingen zijn in lage concentraties moeilijk aantoonbaar;
3. van veel verbindingen is onduidelijk of ze al dan niet afbreekbaar zijn;
4. tijdens de chemische analyse kan verontreiniging van het monster optreden.

Omdat enkele van deze bezwaren onoverkomelijk zijn, moet voor de bepaling van het AOC-gehalte van water een biologische methode (bioassay) worden toegepast.

3. De biologische AOC-bepaling

Het principe van de AOC-bepaling door middel van een bioassay berust op het meten van de groei van een geselecteerd micro-organisme in een monster van het te onderzoeken water. Het bij de uitvoering van de bepaling te gebruiken micro-organisme moet gekozen worden uit die

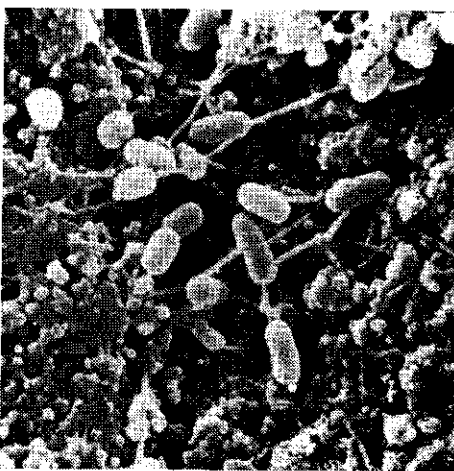
soorten, waarvan bekend is dat ze zich in drinkwater kunnen vermenigvuldigen. In eerste instantie is gekozen voor het gebruik van een uit drinkwater geïsoleerde vertegenwoordiger van de species *Pseudomonas fluorescens*. De redenen van deze keuze luiden als volgt:

1. het organisme kan veel verschillende organische koolstofverbindingen als C- en energiebron benutten (Stanier, Palleroni and Douderoff, 1966);
2. het organisme kan veel verbindingen ook bij lage concentraties nog benutten;
3. het organisme kan groeien met een eenvoudige N-bron (NH₄⁺ of NO₃⁻) en heeft geen groeistoffen nodig;
4. het organisme vormt snel zichtbare kolonies op agarplaten;
5. reinkultures zijn goed houdbaar in het laboratorium.

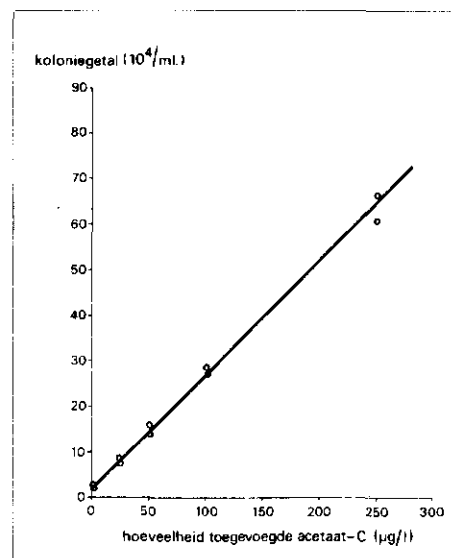
Een beeld van het uiterlijk van het organisme wordt gegeven in afb. 1.

Zoals reeds is gezegd berust het principe van de AOC-bepaling op het vaststellen van de groeicurve van de teststam in een monster van het te onderzoeken water. Deze groeicurve wordt door middel van koloniegetal-bepalingen vastgesteld. Hierbij wordt van een ijklijn gebruik gemaakt. Centraal bij de AOC-bepaling staat dat verontreiniging van het monster met afbreekbare verbindingen moet worden voorkómen. Om deze reden moet al het glaswerk waarmee het monster in contact komt uiterst schoon zijn. Dit wordt bereikt door een behandeling met een kaliumbichromaatoplossing, naspoelen met een salpeter-zuuroplossing en verhitting gedurende één nacht bij 250 °C. Bij de bepaling wordt van pyrex-glazen erlenmeyers voorzien van een slijpstuk

Afb. 1 - Cellen van de teststam P17 (*P. fluorescens*) hechtend op actieve kool. (ROW 0,8 Supra, Norit), 6000 x; opname Technische en Fysische Dienst voor de Landbouw, Wageningen).



in de vorm van een piramide, waarommen



Afb. 2 - De maximale aantallen kolonievormende bacteriën per ml van de teststam P17 als functie van de aan drinkwater toegevoegde hoeveelheden acetaat-C.

gebruik gemaakt. Het spreekt voor zich dat afsluiten van de erlenmeyers met wattenproppen absoluut onaanvaardbaar is.

Het vullen van de erlenmeyers met het te onderzoeken water (600 ml) dient zeer zorgvuldig te gebeuren. Hierbij moet verontreiniging van het watermonster door leidingmateriaal (bijv. van slangen) stof, of spatten worden voorkómen. Na transport van de monsters naar het laboratorium worden de in het water aanwezige micro-organismen gedood door pasteurisatie. Na afkoeling van de monsters wordt vervolgens geënt met de teststam, zodanig dat ca. 100 bacteriën per ml aanwezig zijn. Daarna worden de flessen bij 15 °C geïncubeerd, en wordt de groei van de teststam bepaald door koloniegetal-bepalingen met de strijkplaatprocedure. Bij gebruik van bouillonagar als voedingsbodem zijn de kolonies na 24 uren incubatie van de platen bij 25 °C, goed te tellen.

Onderzoekresultaten

1. Ijklijnen

Het maximum van de groeicurve is een maat voor het AOC-gehalte van het water. De relatie tussen groeimaximum en AOC-gehalte werd bepaald met een voor de teststam gemakkelijk afbreekbare verbinding, nl. acetaat. Deze verbinding werd in concentraties van 25, 50, 100 en 250 µg Na-acetaat-C/l toegevoegd aan drinkwater, waarna de groeimaxima van de teststam P17 werden gemeten. Het resultaat van dit experiment is in afb. 2 weergegeven. Duidelijk blijkt dat de door de meetpunten te trekken lijn niet door het nulpunt gaat. Dit is een gevolg van het AOC-gehalte van het drinkwater. Na correctie van de meet-

maat vervolgens in het alkalische darm-

Somparameters

Inleiding gehouden tijdens het op 28 november 1978 door KIWA en VWN georganiseerde colloquium over Methodenontwikkeling ten behoeve van waterkwaliteitsmeting.

basisch milieu voor gedestilleerd water. De gestippelde lijnen gelden voor niet-onthard leidingwater. De XAD-harsen 2, 4 en 7 zijn met elkaar vergeleken. Stoffen als tri-n-butylamine en dibenzylamine laten zich in zuur milieu slecht isoleren, terwijl het omgekeerde geldt voor 3,5-dichloorfenol, dibutylfalaat en nitrofenol. Een ander beeld tonen acetofenon, heptanol en fluorantheen. De pH heeft nauwelijks invloed, wel is duidelijk te zien dat het hars met de grootste oppervlakte (XAD-4) het hoogste rendement oplevert. Bij trichloorethylfosfaat wordt het verschil merkbaar tussen XAD-2 en -4 en XAD-7. Nitrofenol toont eenzelfde beeld. XAD-7 heeft affiniteit voor zowel het lipofiele als het hydrofiele deel van het molecuul wat wellicht het rendementsoptimum verklaart in neutraal milieu voor deze toch behoorlijk hydrofiele verbindingen.

Een opmerkelijk verschil is waarneembaar tussen de verschillende dichlooranilines. Een chlooratoom versterkt het zure karakter van nabije substituenten, ofwel het verzwakt het basisch karakter van nabije basische substituenten. Bij alle dichlooranilines waar de aminogroep één of twee orthogebonden chlooratomen bezit, is het basisch karakter van die aminogroep zo verzwakt dat de verbindingen zich gemakkelijk laten isoleren in zuur milieu. 3,4-dichlooraniline bezit geen orthochlooratoom en het isolatierendement in zuur milieu is dan ook gehalveerd. Deze gechlorreerde analines vormen slechts een voorbeeld van de relaties die bestaan tussen de moleculaire structuren en de te verwachten resultaten van een bepaalde isolatietechniek. Gezien het gecompliceerde karakter van het organisch pakket, is het niet waarschijnlijk dat er een techniek bestaat die bij machte is in één actie alle organische stoffen uit het water te isoleren en voor verder onderzoek beschikbaar te stellen. Het toepassen van een éénvoudige isolatietrap met een XAD-hars of een combinatie van XAD-harsen heeft een aantal beperkingen die niet uit het oog verloren mogen worden. Veel onderzoek zal dan ook nog uitgevoerd moeten worden om een duidelijk inzicht te verkrijgen in de mogelijkheden voor isolatie van zoveel mogelijk groepen van verbindingen. De eerste stappen zijn gezet. Nog zeer weinig is bekend over de grote groep van hydrofiele stoffen. Alleen een systematisch en consequent uitgevoerd onderzoeksprogramma zal wat dit betreft duidelijkheid kunnen verschaffen en in de toekomst een omlijnd en voor de bedrijven goed toepasbaar analyseprogramma mogelijk maken.

Literatuur

1. G. A. Junk e.a.; J. Chromatography 99 (174) 745-762, Rohm en Haas; Productinformatie.

Inleiding

Een belangrijk deel van het speurwerk dat binnen de Projectgroep Analytische Chemie van het KIWA wordt uitgevoerd, richt zich op de ontwikkeling van eenvoudige en snelle analytische methoden, die inzicht kunnen verschaffen in de hoeveelheid en aard van de organische microverontreinigingen in water.

Hierbij is gekozen voor een chemische karakterisering van het pakket organische microverontreinigingen door middel van organische elementanalyses (definitie:



DRS. G. VEENENDAAL
KIWA NV

Bepaling van de concentratie van een bepaald element voor zover het voorkomt in organische verbindingen). Deze bepalingen worden internationaal 'somparameters' genoemd, hoewel deze term veel meer kan omvatten dan alleen de organische elementanalyses, denk aan COD, geleidbaarheid etc.

Uitgaande van de definitie is de meest voor de hand liggende somparameter TOC, het totaal organisch koolstof. Deze parameter kan echter uitsluitend in water gemeten worden en geeft alleen informatie over het totale organische pakket, terwijl juist behoefte is aan een parameter die uitsluitend informatie geeft over de ongewenste verbindingen. Een parameter die direct hierover informatie geeft bestaat helaas niet.

Het enige mogelijke is het kiezen van die elementen waarvan bekend is dat ze veel in ongewenste verbindingen voorkomen. Behalve een zuiver chemische karakterisering van de in het water aanwezige microverontreinigingen is ook een fysisch-chemische karakterisering van deze verbindingen van groot belang, omdat hierdoor inzicht verkregen kan worden in de mogelijkheden om de betreffende verbindingen tijdens de verschillende zuiveringsprocessen te verwijderen. Om op dit gebied meer informatie te verkrijgen over de somparameter, kan een selectieve isolatie van groepen organische verbindingen uit water (m.b.v. bijv. XAD) toegepast worden, welke plaats kan vinden op basis van de fysisch-chemische eigenschappen (zoals bijv. vluchtig - niet-vluchtig, lipofiel - hydrofiel, en zuur-basisch).

Door te trachten een verband te leggen tussen de somparameters in de verschillende geïsoleerde groepen en de toxiciteit kan op deze wijze een snelle methode verkregen

worden voor de karakterisering van ongewenste verbindingen op toxicologisch, chemisch en fysisch gebied.

Elementen

Er is gekozen voor de volgende elementen:

TABEL I - Somparameters met enkele interessante verbindingen.

parameter	interessesgebied
organochloor	chloorpesticiden, PCB's, chloorfenolen
organofosfor	fosforpesticiden
organostikstof	nitrosaminen, aromatische aminen
organozwavel	mercaptanen (vooral esthetisch interessant)

Zowel organochloor als organofosforverbindingen komen als groep voor op de zwarte lijst (Bijlage I van de 'Overeenkomst inzake de bescherming van de Rijn tegen chemische verontreinigingen').

Voor al deze parameters worden methoden ontwikkeld om deze te kunnen meten in organische oplosmiddelen (bij de isolatie worden de organische verbindingen overgebracht in een organisch oplosmiddel). De meetmethoden berusten allen op hetzelfde principe: Volledige destructie bij hoge temperatuur in een reactiegas, waarbij het te bepalen element omgezet wordt in één anorganische verbinding, waarna deze anorganische verbinding kwantitatief gemeten wordt met een voor deze verbinding specifiek detectiesysteem.

In tabel II is dit systeem toegelicht voor de verschillende elementen.

TABEL II - Overzicht van de bepalingsmethoden voor de verschillende somparameters.

parameter	destructie	gevormde verbinding	detector
organochloor	oxidatief	HCl	coulometer
organofosfor	reductief	PH ₃	vlamfotometer
organostikstof	reductief	NH ₃	coulometer
organozwavel	reductief	H ₂ S	vlamfotometer
	oxidatief	SO ₂	coulometer

Uit deze tabel blijkt dat er twee typen detectoren toegepast worden: de coulometrische titratie en de vlamfotometerdetector.

Microcoulometer

De coulometrische titratie wordt toegepast voor de bepaling van zoutzuur (organochloor), ammoniak (organostikstof) en zwaveldioxide (organozwavel).

Het principe van de coulometrische titratie is weergegeven in afb. 1 en kan als volgt worden samengevat.

Bij de coulometrische titratie wordt een systeem kunstmatig in evenwicht gehouden. Wordt dit evenwicht verstoord door de introductie van een hoeveelheid te bepalen