



## AUTEURS



Maartje van Kessel en Lianna Poghosyan  
(Radboud Universiteit)



Sebastian Lücker  
(Radboud Universiteit)

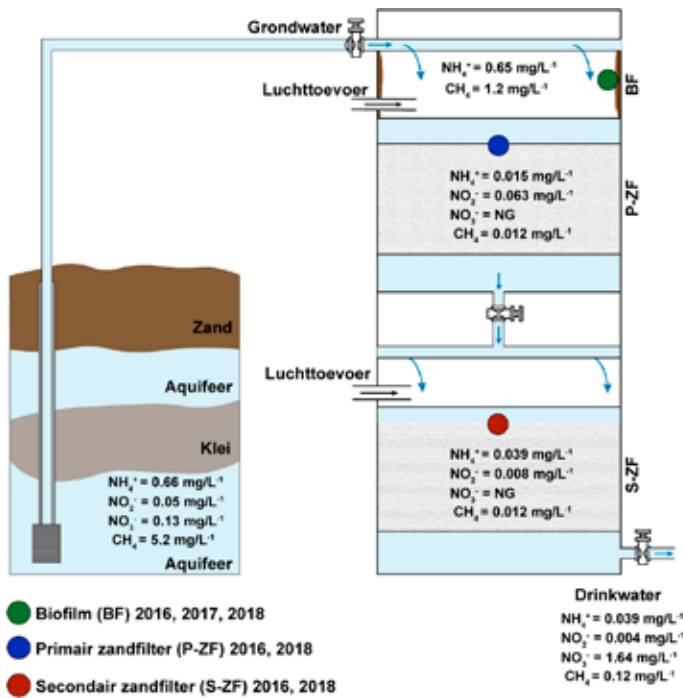


Martine Kox  
(Deltares)

## WELKE MICRO-ORGANISMEN ZORGEN VOOR ONS SCHONE DRINKWATER?

Zandfiltratie is belangrijk voor de productie van drinkwater uit grondwater. De precieze werking van zandfilters is nog omgeven met veel vragen. In deze studie wordt onderzocht welke micro-organismen betrokken zijn bij het verwijderen van ammonium en methaan.

In Nederland wordt meer dan tweederde van het drinkwater geproduceerd uit grondwater. Grondwater heeft een relatief stabiele samenstelling en is van zichzelf al van hoge kwaliteit. Het voldoet echter nog niet aan de kwaliteitseisen waaraan drinkwater dient te voldoen ter voorkoming van gezondheidsrisico's en problemen tijdens de distributie. Met name de concentratie van ammonium en methaan is vaak te hoog, maar ook andere stoffen, zoals nitriet, nitraat, mangaan en ijzer, moeten worden verwijderd. Deze stoffen zijn toxisch, zorgen voor een vreemde geur of smaak van het water en/of voor groei van micro-organismen



Afbeelding 1: Schematische weergave van het bestudeerde pompstation. Grondwater wordt opgepompt en over twee zandfilters geleid (het primaire zandfilter; P-ZF en het secundaire zandfilter; S-ZF). De concentraties van methaan ( $CH_4$ ), ammonium ( $NH_4^+$ ), nitriet ( $NO_2^-$ ) en nitraat ( $NO_3^-$ ) op verschillende locaties zijn weergegeven. Monsters van P-ZF, S-ZF en de biofilm (BF) zijn genomen op verschillende tijdstippen. NG = niet gemeten

in waterleidingen. Gasvormige stoffen, zoals methaan en sulfide, worden als eerste verwijderd uit ruw grondwater, meestal door extensieve beluchting (strippen). Vervolgens vindt verdere zuivering plaats door zandfiltratie, een techniek die al lange tijd gebruikt wordt voor de zuivering van drinkwater. In het zandfilter zorgt een combinatie van fysieke, chemische en biologische processen voor het verwijderen van allerlei verontreinigingen, waaronder de bovengenoemde stoffen.

### De microbiële populatie bepalen

In deze studie wordt de microbiële samenstelling op diverse plekken in de zandfilters in pompstation Breehei (Waterleiding Maatschappij Limburg, WML) onderzocht, met de focus op de verwijdering van ammonium ( $NH_4^+$ ) en methaan ( $CH_4$ ). Er zijn op diverse tijdstippen monsters genomen van het primaire en het secundaire zandbed en van de biofilm op de wand van het primaire filter. Op dezelfde tijdstippen werd ook de concentratie van methaan en stikstof bepaald (afbeelding 1).

De meeste bekende micro-organismen kunnen nog steeds niet gekweekt worden in een laboratorium. Voor het bepalen van de microbiële samenstelling van de monsters gebruikten we daarom *Next generation sequencing* (NGS). Met NGS wordt van DNA uit een monster de basenvolgorde bepaald (se-

quencing). Vervolgens worden de DNA-fragmenten geïdentificeerd aan de hand van DNA van bekende micro-organismen in databanken. Zo ontstaat een 'microbiële vingerafdruk' van het monster. Ook kan bekeken worden of er zogenaamde markergenen gevonden worden; dit zijn genen die coderen voor enzymen die bepaalde omzettingen katalyseren. Dit geeft een indruk van de potentiële conversies van stoffen door micro-organismen in het zandfilter. Voorbeelden van dit soort genen zijn *amo* (een subunit van ammonia-mono-oxygenase, katalyseert de omzetting van ammoniak in nitriet) en *mmo* (methaan mono-oxygenase, katalyseert de omzetting van methaan naar methanol) (afbeelding 2). Door naast de samenstelling van de microbiële populatie in het filter ook diverse parameters van de waterkwaliteit te meten kan worden afgeleid welke micro-organismen verantwoordelijk kunnen zijn voor een bepaalde conversie.

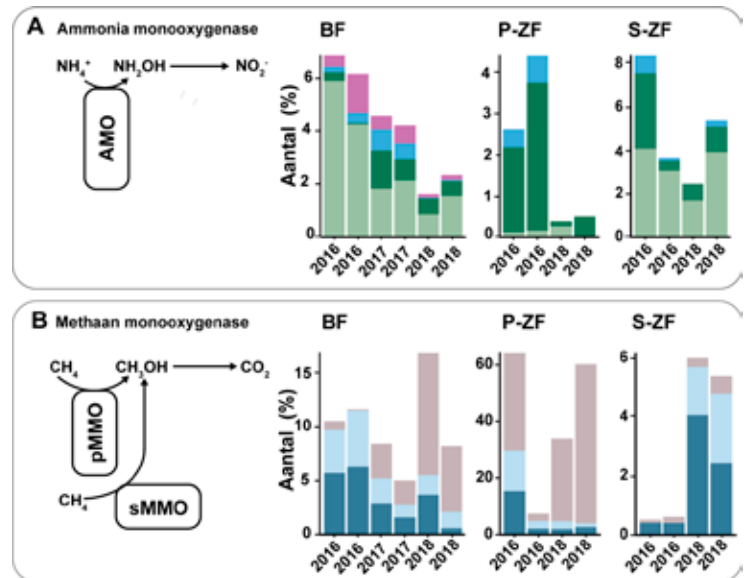
### Comammox Nitrospira

Afbeelding 1 laat zien dat vanuit het meeste ammonium uit het grondwater wordt verwijderd door het primaire zandbed. Aangezien de nitrietconcentratie hier hoger is dan in het secundaire zandbed en omdat het zuurstofgehalte in het water hoog is, kan worden aangenomen dat het ammonium wordt verwijderd via nitrificatie: de omzetting van ammonium (ammoniak) via nitriet naar nitraat.

Micro-organismen en zandfiltratie

40

**Afbeelding 2:** Het voorkomen van ammonium- en methaan-mono-oxygenase (*amo* en *mmo*)-genen in het primaire en secundaire zandbed (P-ZF en S-ZF) en de biofilm. Het aantal gevonden *amo* en *mmo* genen is genormaliseerd. A. Het archaeale *amoA*-gen (roze) werd alleen gevonden in de biofilm. Het merendeel van de gevonden *amoA*-genen is bacterieel (groen en blauw) waarvan het aandeel comammox *Nitrospira* het grootst is (donker groen: A-variant; licht groen: B-variant). B. Het methaan-mono-oxygenasegen werd gevonden in alle monsters. Opvallend is dat de verhouding tussen *p-mmo* (blauw) en *s-mmo* (grijs) in de biofilmmonsters varieert in de tijd. Over het algemeen is *s-mmo* het meest voorkomende gen in het primaire zandfilter en *p-mmo* in het secundaire, waarbij moet worden opgemerkt dat de hoeveelheid *mmo*-genen in het primaire zandbed beduidend groter is



Diverse soorten micro-organismen zijn in staat om de verschillende stappen van nitrificatie te katalyseren. De bacterie *Nitrosomonas* en het in 2005 gevonden archaeon *Nitrosopumilus* bijvoorbeeld zetten ammonium om in nitriet, dat vervolgens wordt geoxideerd tot nitraat door bijvoorbeeld *Nitrospira*. Zowel ammonium- als nitriet-oxiderende micro-organismen zijn gevonden in zandfilters, maar vaak waren de zogenaamde *Nitrospira* oververtegenwoordigd. Dat is minder vreemd dan het lijkt, aangezien *Nitrospira* ook in staat zijn tot ammoniumoxidatie. *Nitrospira* kunnen dus beide oxidatiestappen voor hun rekening nemen, van ammonium naar nitriet én van nitriet naar nitraat. Dit proces heet *complete ammonium oxidatie* (comammox). Het ammonium-mono-oxigenase enzym van deze zogenaamde comammox *Nitrospira*, wijkt af van het amo dat we al kenden van andere ammonium oxiderende micro-organismen.

#### Microbiële verwijdering van ammonium

Met NGS werden in de monsters, onafhankelijk van tijdstip en locatie van de monsternamen, *amo*-genen gevonden van zowel *Nitrosomonas* als *Nitrosopumilus* (afbeelding 2). Echter, het grootste deel van de aangetroffen *amoA* varianten behoort tot de comammox *Nitrospira*. Daarmee zijn deze micro-organismen dus hoogstwaarschijnlijk de belangrijkste ammonium oxiderende micro-organismen in dit zandbed. Dit verklaart de oververtegenwoordiging van *Nitrospira* bacteriën in de zandfilters. Ook komt het overeen met andere studies naar de microbiële samenstelling

van zandfilters, in onder andere Deense drinkwater-productiefaciliteiten. De concentraties nutriënten in het te zuiveren grondwater zijn laag. Het lijkt erop dat comammox *Nitrospira* goed zijn aangepast op het leven in zulke condities; het zijn typische K-strategisten, organismen met een lage groeisnelheid maar een zeer efficiënte energieconversie.

Opvallend genoeg zijn er twee verschillende soorten comammox *Nitrospira amoA*-genen gevonden, de A- en de B-variant. Comammox bacteriën met de A-variant van het *amoA*-gen zijn de belangrijkste groep in het eerste zandbed, terwijl de groep met de B-variant het meest voorkomt in het tweede zandbed en in de biofilm aan de wand van het primaire zandbed. Er is nog maar weinig bekend over de comammox *Nitrospira* met een B-variant van het *amoA*-gen. Van deze organismen zijn alleen genomesequenties bekend, er zijn nog geen rein- of verrijkingculturen beschikbaar in laboratoria, dus naar de fysiologie en de rol van deze micro-organismen in drinkwater-productie blijft het voorlopig gissen.

#### Microbiële verwijdering van methaan

Naast ammonium bevat het ruwe grondwater van pompstation Breehei ook veel methaan ( $\text{CH}_4$ ). Het meeste hiervan ontsnapt tijdens de aeratiestap (beluchting) naar de lucht. Een klein deel blijft echter opgelost in het ruwe grondwater. Micro-organismen in het zandbed verwijderen het door het stapsgewijs te oxideren tot  $\text{CO}_2$ . De eerste stap van methaanoxidatie

wordt gekatalyseerd door het enzym methaan-mono-oxygenase (mmo) waarvan twee varianten bekend zijn: de membraan-gebonden (*particulate*, p-mmo) en de ongebonden (*soluble*, s-mmo) variant. Beide vormen zijn gevonden in de sequentiedata (afbeelding 2). De gevonden p-mmoA-genen zijn kenmerkend voor de methaan oxiderende micro-organismen behorende tot de gammaproteobacteriën. Dit zijn bacteriën waarvan al lange tijd bekend is dat ze methaan kunnen oxideren. De gevonden s-mmo-sequenties horen bij organismen van de familie van de *Methylomonadaceae*. Hiervan is nog nooit aangetoond dat ze de genen voor methaanoxidatie tot haar beschikking heeft. Dit micro-organisme is echter in groten getale aanwezig in het primaire zandbed en het is dus aannemelijk dat het ook een rol speelt in de omzetting van methaan naar CO<sub>2</sub> in het zandbed. Of dit daadwerkelijk zo is moet nog verder onderzocht worden.

### Conclusies

In deze studie is door *next generation sequencing* (NGS) van monsters uit de twee zandbedden van het zandfilter van een pompstation inzicht verkregen in de daar aanwezige populatie van micro-organismen. Comammox *Nitrospira* blijkt hier het meest voorkomende ammonium-oxiderende micro-organisme te zijn, waarbij de comammox bacterie in het eerste zandbed een iets ander *amoA*-gen heeft (A-variant) dan in het tweede zandbed (B-variant). Er is verder onderzoek nodig om te kunnen concluderen wat de rol is van de comammox bacteriën met de B-variant van het *amoA*-gen. Misschien kan kennis over de verhouding tussen comammox bacteriën en andere nitrificerende micro-organismen antwoord geven op de vraag waarom zandfilters ammonium soms niet meer volledig verwijderen of er nitriet ophoping plaatsvindt. Ook dit verdient nader onderzoek. Verder is het een interessant gegeven dat in het zandbed methaan-oxiderende bacteriën actief zijn. Wellicht kan hiervan in de toekomst gebruik gemaakt worden om de emissie van het sterke broeikasgas methaan bij drinkwaterproductie te verlagen. Op dit moment worden in zandbedden op laboratoriumschaal deze ammonium- en methaan-oxide-

rende micro-organismen nader onderzocht. Deze studie draagt bij aan een beter begrip van de processen in het zandbed. Deze kennis kan leiden tot het voorkomen van problemen bij zandfiltratie of tot het sneller opstarten van nieuwe zandfilters.

Maartje van Kessel, Lianna Poghosyan,  
Sebastian Lücker (*Radboud Universiteit*)  
Martine Kox (*Deltares*)

### Referenties

Fowler SJ, Palomo A, Dechesne A, Mines PD, Smets BF (2018) Comammox *Nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities, *Environmental Microbiology* 20

Kessel MAHJ van, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJM, Kartal B, Jetten MSM, Lücker S (2015) Complete nitrification by a single microorganism, *Nature* 528

Kits KD, Sedlacek CJ, Lebedeva LV, Han P, Bulaeva A, Pjevac P, Daebeler A, Romano S, Albertsen M, Stein LY, Daims H, Wagner M (2017) Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals a oligotrophic lifestyle, *Nature* 549

Poghosyan L, Koch H, Frank J, van Kessel MAHJ, Cremers G, van Alen T, Jetten MSM, Op den Camp HJM, Lücker S (2020) Metagenomic profiling of ammonia- and methane-oxidizing microorganisms in two sequential rapid sand filters, *Water Research* 185.

### SAMENVATTING

Voor de productie van drinkwater wordt gebruik gemaakt van zandfiltratie. In de zandfilters worden verontreinigingen uit het ruwe water, meestal grondwater, verwijderd door een combinatie van fysische, biologische en chemische processen. In deze studie wordt onderzocht welke micro-organismen betrokken zijn bij het verwijderen van ammonium en methaan. Ammonium wordt grotendeels omgezet door comammox (complete ammonium oxidatie) *Nitrospira*, een bacterie die ammonium volledig kan oxideren tot nitraat. Methaan wordt vooral verwijderd door strippen (beluchten) maar wordt ook door micro-organismen in het zandfilter geoxideerd tot CO<sub>2</sub>. Een goed inzicht in de micro-organismen betrokken bij drinkwaterproductie kan ons helpen zandfiltratie beter te begrijpen en te optimaliseren.

Micro-  
organismen en  
zandfiltratie