

Langzaam zandfilter; een biologisch raadsel

Fenna Philipse, Marco Dignum, Cheryl Bertelkamp (Waternet), Aleida de Vos van Steenwijk (Orvion), Eric Penders (Het Waterlaboratorium)

Hoewel langzame zandfiltratie al decennia wordt gebruikt, is er nog weinig bekend over de bacteriën die aanwezig zijn in dit soort filters. Daarom is in 2020 een onderzoek gestart. De eerste resultaten geven al inzichten. De soortenontwikkeling van de *schmutzdecke* van een zandfilter toont gelijkenissen met biofilmvorming in distributieleidingen. De ontwikkeling van de dominante bacteriesamenstelling in de schmutzdeken van verschillend bedreven filters lijken op elkaar. De weerstandsopbouw is hoger bij een lagere filtratiesnelheid en de fluctuatie in de weerstand bij constante filtratiesnelheid is waarschijnlijk het effect van de biologie. Nitrificeerders komen in hoge percentages voor, wat een functionele rol suggereert.

De microbiologische processen in een langzaam zandfilter zijn waarschijnlijk de meest onbegrepen processen in de drinkwaterbereiding [1]. Het is bekend dat een dunne laag bovenin het filter, de zogeheten *schmutzdecke*, de grootste bijdrage levert aan de verwijdering van deeltjes en ziekteverwekkers. Drie processen spelen hierbij een rol: filtratie (dit hangt samen met de poriegrootte en dus de bedweerstand), hechting (dit hangt samen met de aanwezigheid van extracellulaire polymeren in de biofilm) en predatie door hogere organismen [2]. De kwaliteit van drinkwater wordt traditioneel beoordeeld op wettelijke parameters, maar hoe de microbiologische processen bijdragen aan deze kwaliteit is grotendeels een black-box. Dit komt enerzijds doordat de bemonstering een lastige opgave is en anderzijds doordat belangrijkste microbiologische techniek van het detectievenster gebaseerd is op de kweekbaarheid van micro-organismen en zichtbaarheid onder de microscoop. Met DNA-technieken zoals Next Generation Sequencing (NGS) wordt een deel van deze black-box ontrafeld. Dit onderzoek draagt daarom bij aan het verkrijgen van meer inzicht in de microbiologische ontwikkeling en processen die zich afspelen in een langzaam zandfilter. Voor de Nederlandse drinkwaterbedrijven betekent dit dat zij een beter onderbouwde indicator krijgen voor het functioneren bij inlopen en na krabben van filters. In de drinkwaterwereld is discussie over de vraag wanneer langzame zandfilters weer in gebruik mogen worden genomen na onderhoud ('inlopen', 'krabben' of 'spoelen en woelen'). De microbiologische samenstelling zou voor een beter onderbouwde indicator kunnen zorgen voor het functioneren van filters.

Experimenten

Om de ontwikkeling van de microbiologie in langzame zandfilters te onderzoeken is gebruik gemaakt van vier laboratoriumschaal- en vier uniek bedreven pilotschaalkolommen. In februari 2020 zijn de kolommen gevuld met zand (korreldiameters 0,25 en 0,6 mm). Alle verkregen filters werden gevoed met actiefkoolfiltraat uit de zuivering van Weesperkarspel. De kolommen zijn op verschillende filtratiesnelheden (0,3 en 0,5 m/h) bedreven (zie tabel 1).

Tabel 1. Specificaties van de labschaal- en pilotschaalfilters

Filternummer	Diameter zandkorrel(mm)	Porositeit (-)	Bedhoogte (m)	Filtratiesnelheid (m/u)
filter 1	0.25	0.33	1.20	0.5
filter 2	0.25	0.33	1.20	0.3
filter 3	0.6	0.37	1.20	0.3
filter 4	0.6	0.37	1.20	0.5

Van de vier pilotfilters is maandelijks het behandelde water (effluent) bemonsterd en geanalyseerd. Van de vier labschaalfilters is maandelijks de schmutzdecke bemonsterd en geanalyseerd (vanaf t=1 maand). Omdat gelijktijdig een ander onderzoek liep, kon de schmutzdecke van de pilotfilters zelf niet worden bemonsterd. Ook is steeds het te behandelen water (influent) bemonsterd. Na afronding van de pilot zijn zandmonsters van verschillende dieptes in de lab-schaalfilters genomen.

De monsters zijn door Orvion geanalyseerd met ORVIdencode-NGS-analyse om de microbiële populatie te karakteriseren en te visualiseren op basis van het DNA. De monsters zijn door Het Waterlaboratorium (HWL) geanalyseerd op additionele fysisch-chemische en microbiologische parameters. ORVIdencode-NGS-analyses geven inzicht in de samenstelling van de microbiële populatie en de relatieve abundantie van de verschillende microbiële groepen die zijn geïdentificeerd (percentages). Een toe- of afname in percentage hoeft echter niet per se te betekenen dat de absolute aantallen ook toe- of afnemen. Om een beeld te krijgen van de totale concentraties micro-organismen zijn daarom ATP-metingen uitgevoerd (adenosinetrifosfaat) in de watermonsters als maat voor microbiële activiteit en is de DNA-concentratie van het NGS-extract bepaald.

In totaal zijn 54 water- en 46 schmutzdeckemonsters geanalyseerd, waarbij in totaal $1,3 \cdot 10^7$ sequenties aan DNA zijn geïdentificeerd. De NGS-analyses leveren zeer veel data op die een eerste beeld geven van de microbiële samenstelling en werking van de langzame zandfilters. Bijvoorbeeld om te beoordelen wat het effect is van de verschillende korrelgroottes en/of filtratiesnelheden. Of om te beoordelen welke microbiële groepen consistent worden verwijderd uit het te behandelen water, of juist welke er in het effluent 'nieuw' zijn bijgekomen. Doordat overige procesparameters (temperatuur, geleidbaarheid, ATP, etc.) ook steeds zijn bepaald kan het effect hiervan op de microbiële populaties worden beoordeeld.

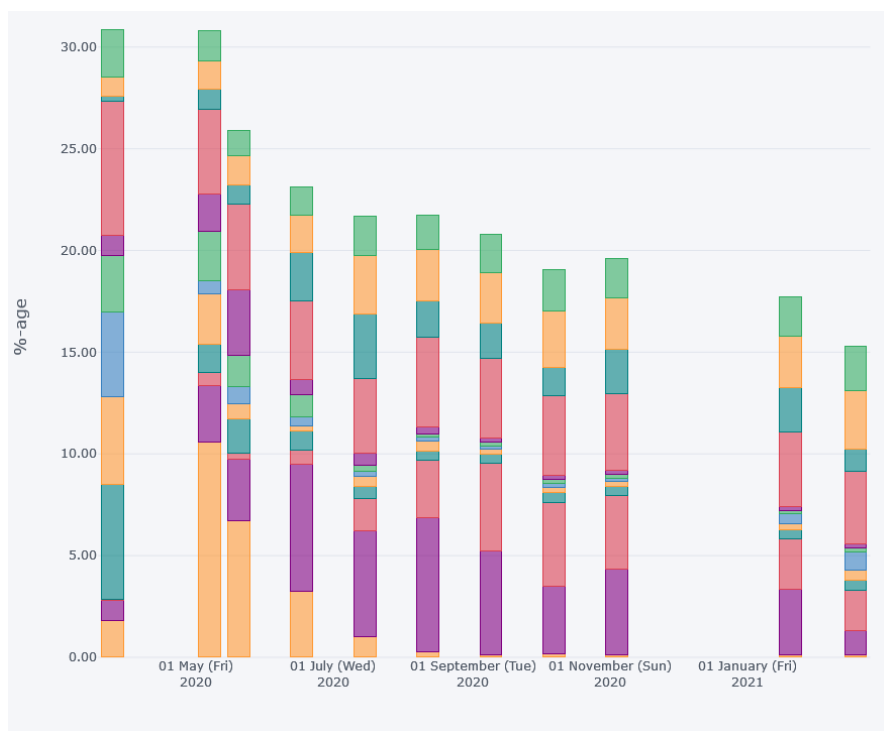
Ten behoeve van dit artikel ligt de focus echter op de ontwikkeling van de microbiële populatie in de tijd van de schmutzdecke van de labschaalfilters. Omdat de microbiële samenstelling van de schmutzdecke op hoofdlijnen vergelijkbaar was tussen de labschaalfilters, is ervoor gekozen om alleen de resultaten te laten zien van filter 2.

Resultaten

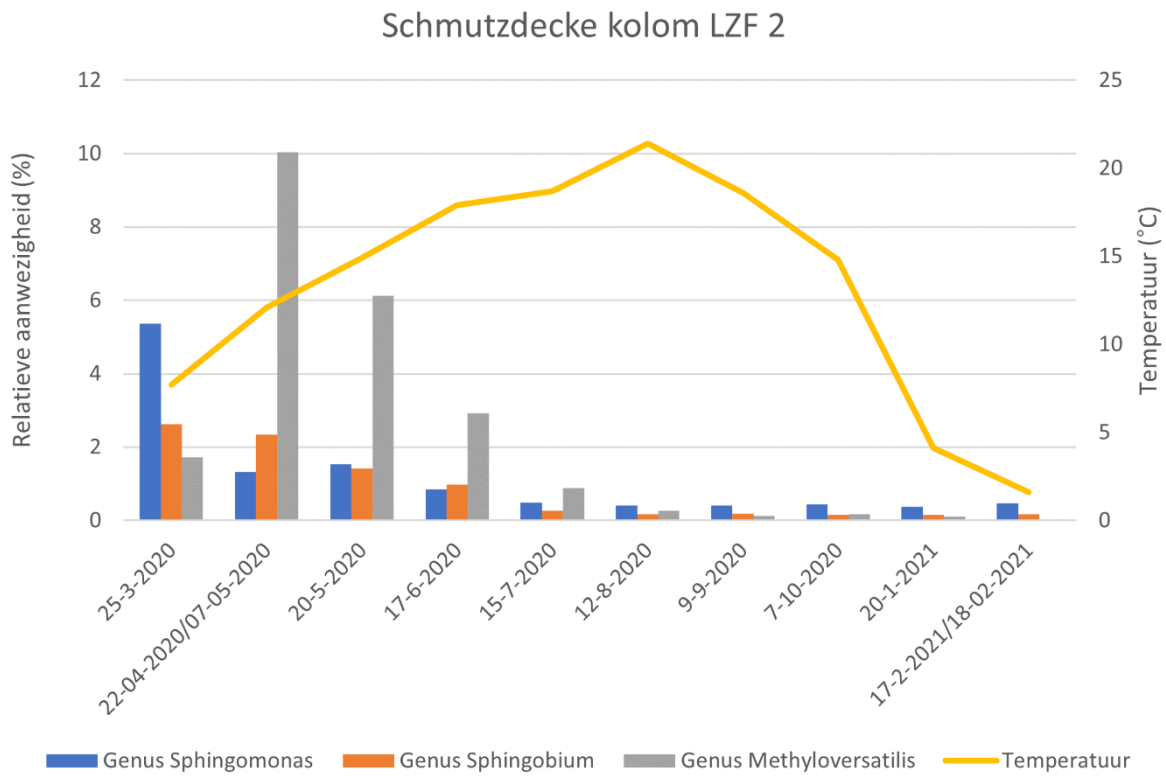
Ontwikkeling van de schmutzdecke

De ORVIdencode-NGS-resultaten visualiseren hoe de microbiële samenstelling in de schmutzdeckemonsters in de tijd verandert (zie afbeelding 1). Wat hierin opvalt is dat de samenstelling van het eerste monster aanzienlijk verschilt ten opzichte van de overige monsters. Daarna is er een verloop te zien in een aantal microbiële groepen, zoals genera binnen de *Sphingomonadaceae* en *Methyloversatilis* spp. (zie afbeelding 2). Na ongeveer vijf maanden stabiliseert de populatie zich en zijn er geen grote verschuivingen in microbiële samenstelling meer

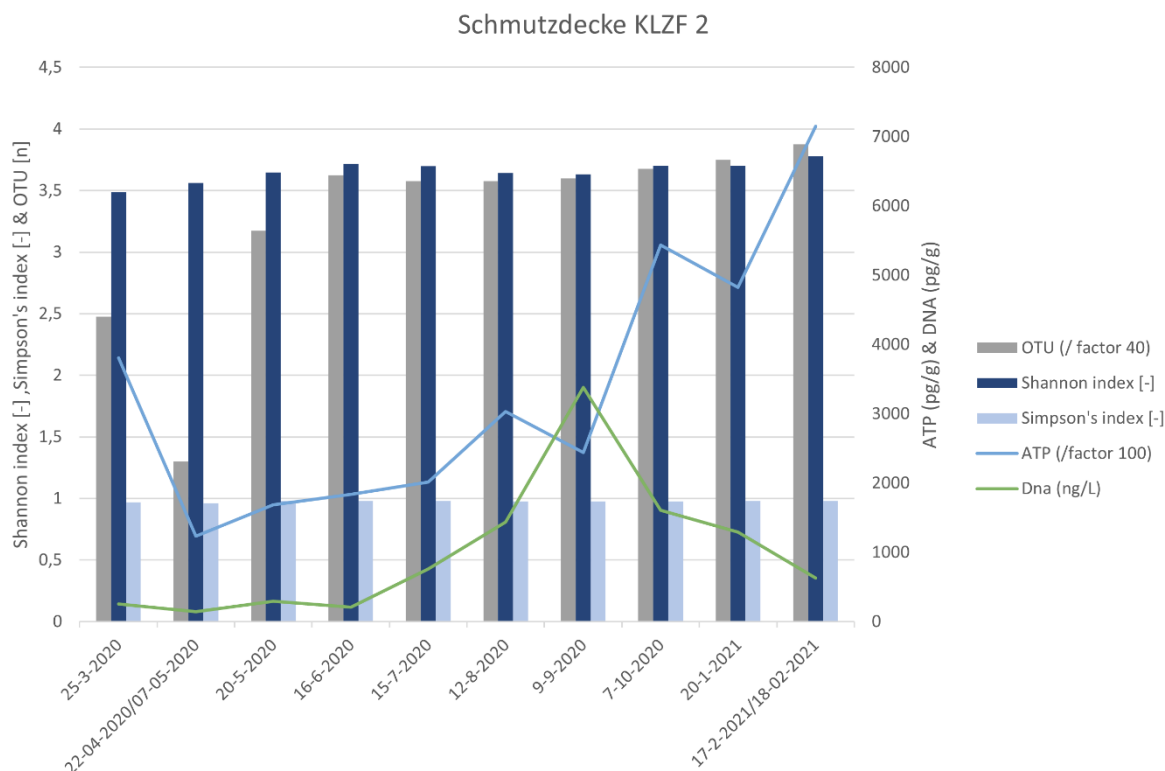
aangetroffen. In afbeelding 3 is dit ook terug te zien in de diversiteitsindici en operationele taxonomische eenheden (OTU's). OTU's zijn eenheden die van elkaar te onderscheiden zijn op basis van verschillen in DNA-sequenties in het 16S-rRNA-gen. Gedurende de eerste maanden van de ontwikkeling van de schmutzdecke is er sprake van een toename in zowel aantal OTU als diversiteit (berekend als Shannon Index en Simpson's index of diversity) van de bacteriën in het zandfilter.



Afbeelding 1. Samenstelling van de dominante microbiële populatie in filter 2 in de loop van de tijd (25 maart 2020 t/m 18 februari 2021). Alleen groepen met een relatieve abundantie van meer dan 2% in tenminste één van de monsters worden hierin weergegeven. In de eerste vijf maanden is een verloop in dominante microbiële groepen te zien, daarna blijft de populatie relatief stabiel



Afbeelding 2. Abundantie van de genera *Sphingomonas*, *Sphingobium* en *Methyloversatilis* in de water- en schmutzdeckemonsters in volgorde van genomen samples over het jaar



Afbeelding 3. Aantallen OTU van de schmutzdecke op volgorde van bemonsterde data. Mate van diversiteit (Shannon index & Simpson's index) van de schmutzdecke op volgorde van bemonsterde data. Concentraties ATP (adenosinetriofosfaat, een maat voor microbiële activiteit) en totaal-DNA in de schmutzdecke op volgorde van bemonsterde data

Op het eerste analysemoment in maart werden er in de schmutzdecke minder dan 100 taxonomische eenheden (met meer dan 0,1% abundantie) aangetroffen, een jaar later in februari was een niveau bereikt van meer dan 150 taxonomische eenheden (> 50% toename). De soortendiversiteit berekend als Shannon-index nam eveneens toe in alle filters (van gemiddeld 3,4 naar 3,7). Wat opvalt is dat de groei van aantallen OTU's stabiliseert en dat dit niveau eerder wordt bereikt bij een filter met het fijne zand dan met een filter met een grove fractie. Dit suggereert dat de bacteriepopulatie in het schmutzdecke zich sneller ontwikkelt op het fijne zand. Een toename in soortendiversiteit en aantallen bacteriën is te verwachten naarmate er meer water is behandeld met het filter. Tevens is deze trend vastgesteld in andere studies die de ontwikkeling van de schmutzdecke hebben onderzocht [3].

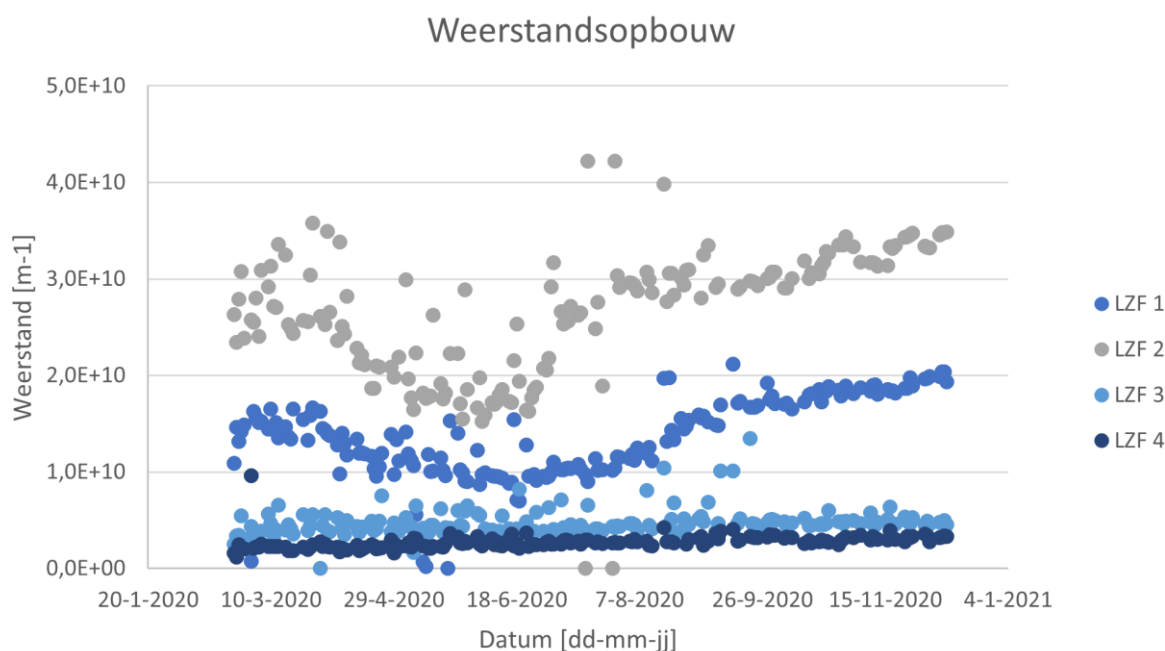
Interessant om te noemen is dat de Simpson's-diversiteit hoog is (bijna 1). Dit duidt op de aanwezigheid van veel verschillende taxa, die in gelijke abundantie voorkomen.

Biologie de verantwoordelijke voor fluctuatie in weerstandsopbouw?

Naarmate de schmutzdecke zich verder ontwikkelt, neemt ook de weerstand over het filter toe. De weerstand kan daarom ook gebruikt worden als indicatie voor de groei van de schmutzdecke. De weerstand over een zandfilter kan berekend worden door drukval (ΔP) te delen door de viscositeit en de filtratiesnelheid. Deze berekende weerstand wordt veroorzaakt door het verstopping van de poriën in het filter(en dus ook groei van de schmutzdecke).

Afbeelding 4 geeft de weerstand van de vier labschaalfilters weer. Filters 3 en 4 geven de laagste weerstand die verklaard kan worden doordat deze filterkolommen gevuld zijn met de grovere zandfractie. Zowel voor de grove als voor de fijne fractie geldt dat de filters met de lage filtratiesnelheid een hogere weerstand laten zien. Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat de bacteriën en andere waterorganismen als protozoa, zoöplankton (op hogere organismen is geen classificatie uitgevoerd) meer kans hebben zich goed te ontwikkelen bij een lagere filtratiesnelheid dan bij een hogere snelheid.

Daarbij is door het jaar heen fluctuatie te zien in de weerstand in de filters met een fijne korrel. Deze fluctuatie in weerstandsopbouw kan veroorzaakt worden door (1) meer of minder biologische afbraak van vuil in het filter en (2) meer of minder biologische activiteit door temperatuurvariatie. Nader onderzoek is nodig om vast te kunnen stellen wat de exacte oorzaak is.

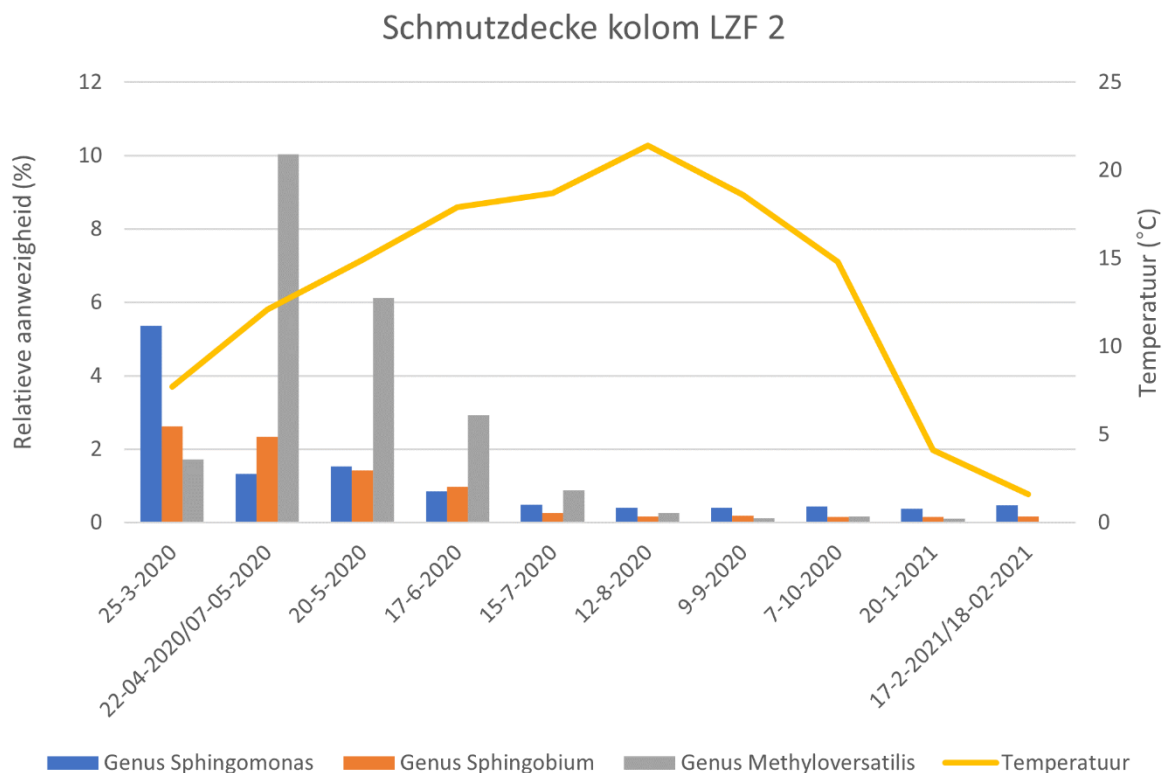


Afbeelding 4. Weerstandsopbouw, afgeleid van de drukval over de hoogte van het filterbed gecorrigeerd voor de temperatuur en filtratiesnelheid

Welke micro-organismen kwamen voor?

De opbouw van de schmutzdecke bleek zich qua bacteriegemeenschappen enigszins vergelijkbaar te ontwikkelen als een biofilm. In eerste instantie komen de zogeheten 'pionierssoorten' op. Deze staan bekend als snelle groeiers en zijn de eerste 'bewoners' van het langzame zandfilter. Deze pionierssoorten groeien op eenvoudige koolstofverbindingen, zoals die bijvoorbeeld vrijkomen bij de ozonisatie. Een typisch voorbeeld hiervan is de groep *Methyloversatilis* spp. (zie afbeelding 5). Ook bacteriën die behoren tot de *Sphingomonadaceae*-familie ontwikkelen zich in een vroeg stadium in de schmutzdecke. Deze bacteriën staan bekend als 'slijmvormers' die de vorming van biofilms initiëren (zie afbeelding 6). De aanwezigheid van deze dominante soorten komt op hoofdlijnen overeen met eerder onderzoek naar de biofilm in drinkwaterleidingen [4]. In een later stadium nemen de percentages van deze soorten af en/of worden anderen juist meer dominant. Een mogelijke uitleg is dat er inmiddels een niche is gevormd (door de slijmvormers) waarbij andere,

langzamer groeiende soorten de concurrentiestrijd winnen. Bacteriën die een afweermecanisme hebben tegen predators (zoals amoeben) zouden dan bijvoorbeeld de overhand kunnen nemen.



Afbeelding 5. Abundantie van de genera *Sphingomonas*, *Sphingobium* en *Methyloversatilis* in de water- en Schmutzdecke monsters in volgorde van genomen samples over het jaar

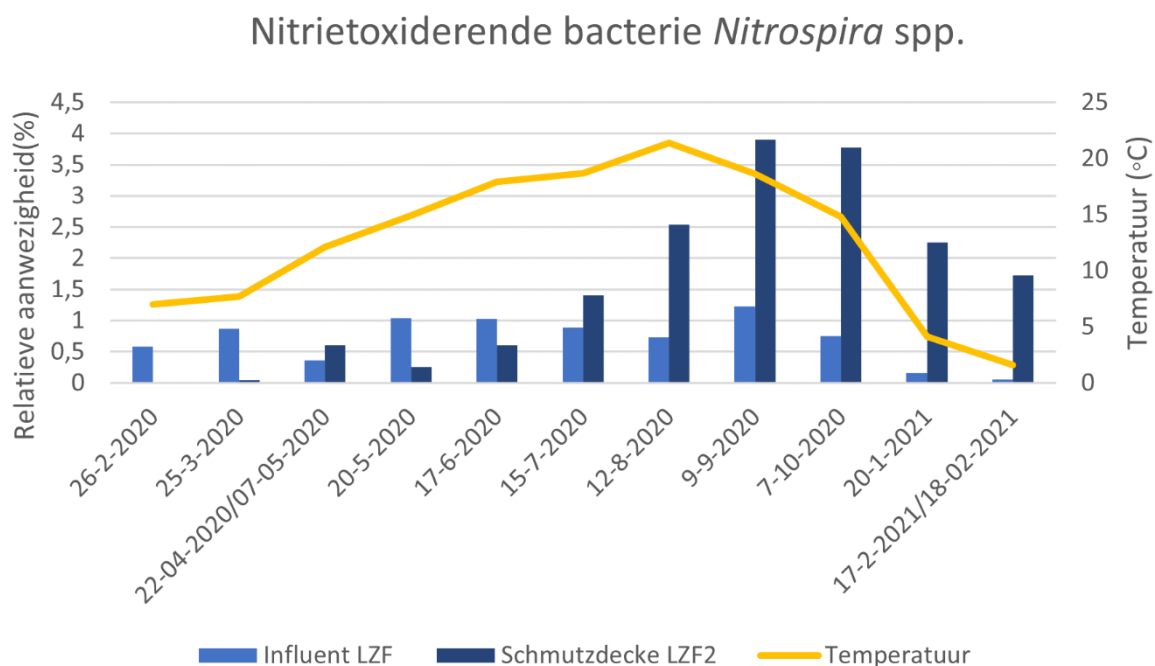
Spelen nitrificeerders een rol in het langzame zandfilter?

Een bacteriegroep die juist later in dominantie toeneemt in de schmutzdecke is die van de nitrificeerders. Deze bacteriën zijn in staat om ammonium om te zetten in nitriet (bijv. *Nitrosomonas* en *Nitrosospira*) en nitriet in nitraat (bijv. *Nitrospira* en *Nitrobacter*). Dat is opmerkelijk, omdat de ammoniumconcentraties onder het detectieniveau liggen, waardoor de aanwezigheid van nitrificeerders niet direct logisch lijkt.

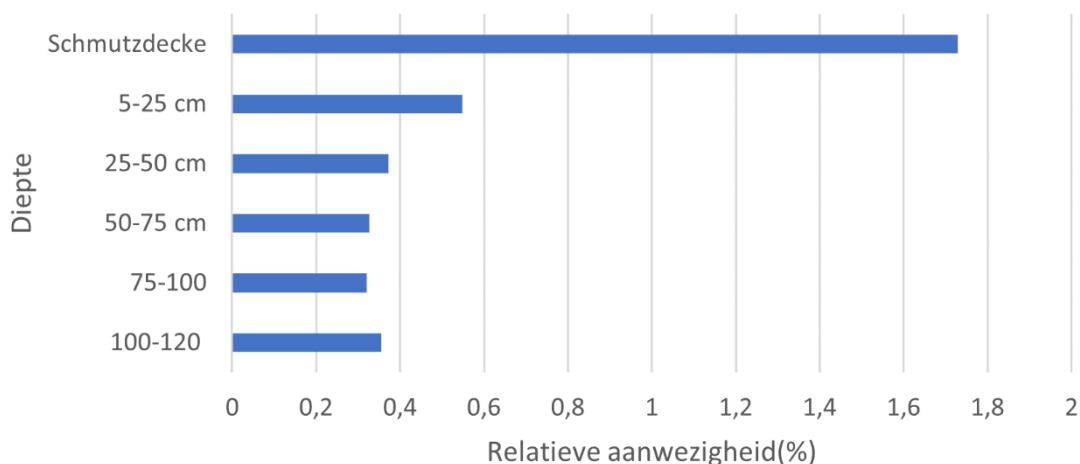
Opvallend is dat er geen ammonium oxiderende bacteriën dominant worden in de schmutzdecke, maar wel de nitriet oxiderende *Nitrospira* spp. Deze komt ook voor in het influent, maar wordt pas na ongeveer zeven maanden dominant (meer dan 2% voorkomen) in de schmutzdecke en blijft daarna in hogere percentages aanwezig (afbeelding 6a). Bekend is dat sommige *Nitrospira*-soorten in staat zijn beide stappen van nitrificatie uit te voeren. Dit wordt Comammox, complete ammoniumoxidatie, genoemd. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat deze groep een significante rol speelt in snelle zandfilters [5]. Het is daarom aannemelijk dat de geïdentificeerde *Nitrospira* spp. ook de Comammox-functie bevatten die in staat is ammonium te oxideren tot nitraat. Nader onderzoek is echter nodig om dit te kunnen bevestigen.

Temperatuur is een belangrijke factor die de ontwikkelingssnelheid van microbiële populaties bepaalt. Duidelijk is echter dat de aanwezigheid van *Nitrospira* spp. in de schmutzdecke niet alleen verklaard kan worden door toenemende temperatuur. Bij het diepteprofiel van filter 2 is te zien dat *Nitrospira* spp. een hogere abundantie heeft in de schmutzdecke dan dieper in het filterbed

(afbeelding 6b). Mogelijk speelt het micro-milieu, dat buiten het detectievenster valt (zoals hogere zuurstof-, ammonium- of nitrietconcentraties bovenin de filters) hierin een bepalende rol.



Nitrospira spp. in diepteprofiel LZF2

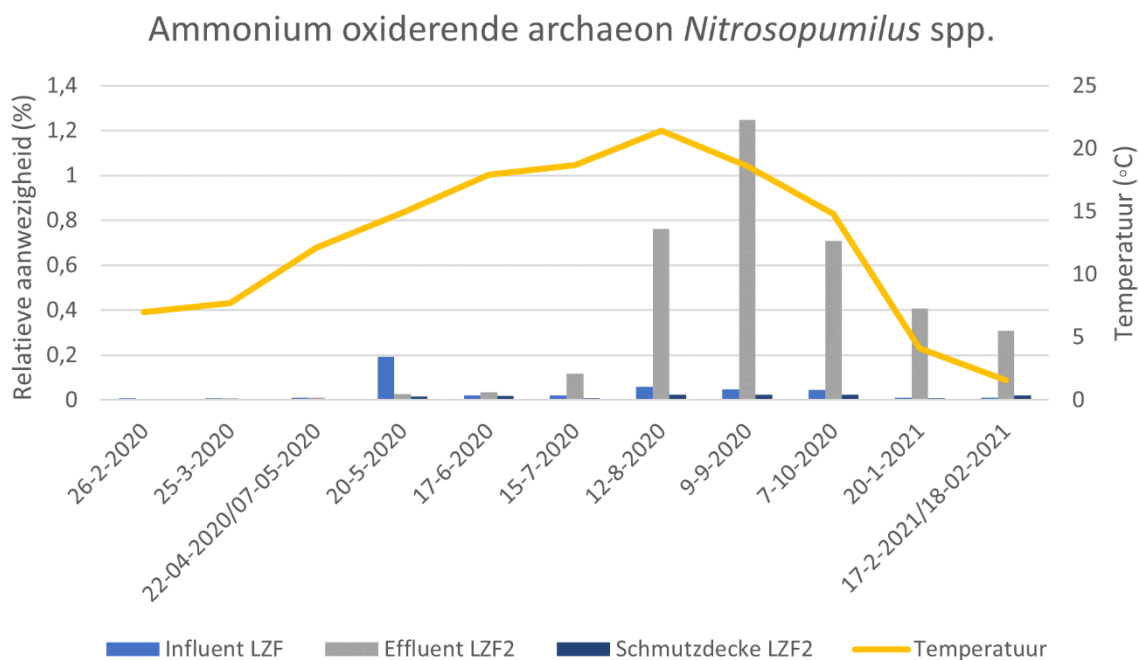


Afbeelding 6. Abundantie van *Nitrospira* spp. in het influent en schmutzdecke (boven) en in het zandbed over de diepte (onder), bemonsterd in februari 2021

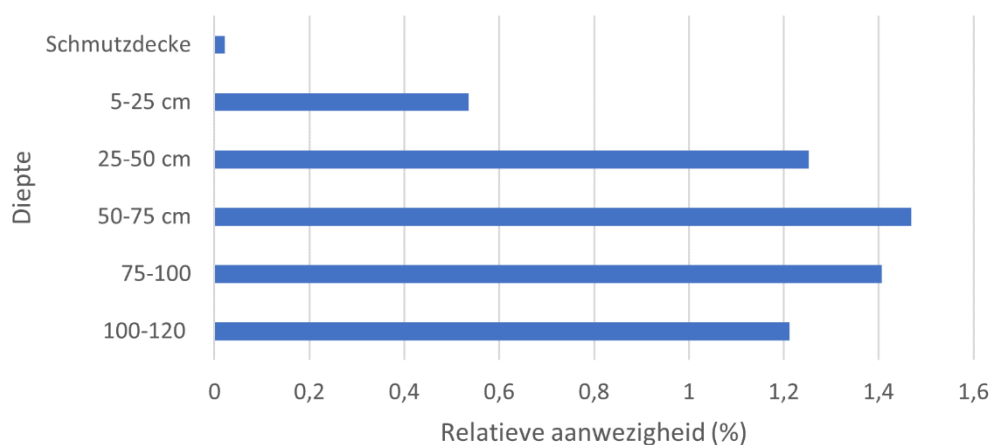
Ammonium oxiderende archaea dieper in het filterbed

Opvallend is dat de ammonium oxiderende archeon (AOA) *Nitrosopumilus* spp. in het effluent meer dominant wordt naarmate de tijd verstrijkt. Deze is echter nauwelijks aangetroffen in het influent of in de schmutzdecke (zie afbeelding 7a). Van filters 2 en 4 is een diepteprofiel geanalyseerd waaruit blijkt dat *Nitrosopumilus* spp. zich dieper in het filterbed ontwikkelt en vervolgens waarschijnlijk uitspoelt met het effluent (afbeelding 7b). Het is bekend dat de autotrofe *Nitrosopumilus* in staat is bij lage zuurstof- en ammoniumconcentraties te leven, wat kan verklaren waarom deze juist dieper in

het filterbed voorkomt. Eerdere onderzoeken bevestigen een significante rol van AOA in drinkwater [6]. De AOA kunnen dieper in het bed een rol spelen in de omzetting van aminozuren die worden vrijgemaakt uit de bacteriële levenscyclus van de schmutzdecke.



Nitrosopumilus spp. in diepteprofiel van LZF2



Afbeelding 7. Relatieve abundantie van *Nitrosopumilus* spp in influent, effluent, schmutzdeckemonster (boven) en in het zandbed (onder) over de diepte van filter 2

Samenvattend

Vier verschillende langzame zandfilters (pilotschaal en labschaal) zijn gedurende ongeveer één jaar gemonitord met behulp van Next Generation Sequencing (NGS). Het doel was om een eerste inzicht te verkrijgen in de microbiële ontwikkeling van de zandfilters in de tijd. Een aantal opvallende ontwikkelingen in de schmutzdecke van de labschaalfilters wordt hieronder kort samengevat:

- In de schmutzdecke is een toename in aantal soorten en soortendiversiteit in de tijd waargenomen. Met name in de eerste vijf maanden is er een sterk verloop in verschillende microbiële groepen te zien. Na vijf maanden blijft de microbiële samenstelling op hoofdlijnen gelijk. Deze informatie helpt om te bepalen hoe lang het duurt voordat een nieuw langzaam zandfilter in bedrijf kan worden genomen en welke basismicrobiologie nodig is voor een goede waterbehandeling. Zo kunnen mogelijk ook strategieën worden getest om de opstartfase te versnellen, zoals bijvoorbeeld het enten van de benodigde basismicro-organismen.
- De weerstandsopbouw is niet lineair in de tijd, maar wordt beïnvloed door aanwezigheid van de biologie.
- *Nitrospira* spp. is in de schmutzdecke de dominante nitrificeerder. De afwezigheid van dominante ammonium oxiderende micro-organismen in de schmutzdecke doet vermoeden dat ook *Nitrospira*-soorten die Comammox uitvoeren aanwezig zijn. De toename in percentage nitrificeerders en handhaving hiervan in de schmutzdecke suggereert dat ze een functionele rol hebben.
- Dieper in het filterbed wordt juist de ammonium oxiderende archaeon *Nitrosopumilus* spp. de dominante nitrificeerder. Dit toont aan dat zich ook dieper in het filterbed een functionele microbiële populatie ontwikkelt en handhaaft.
- Hoewel de vier filters verschillend bedreven werden (verschillende korreldiameter en/of filtratiesnelheid) wordt op hoofdlijnen eenzelfde patroon van ontwikkeling van de schmutzdecke waargenomen. Nader onderzoek van de data moet uitwijzen of – en zo ja welke – verschillen ontstaan en wat het effect hiervan is op de effluentkwaliteit.

Dit artikel is met name gericht op de algemene ontwikkeling van de schmutzdecke in de tijd. Echter bevatten de verkregen microbiële data nog veel meer informatie dan hier is behandeld. Bijvoorbeeld welke verschillen er ontstaan tussen de vier filters, hoe het effluent verschilt ten opzichte van het influent en wat dit kan betekenen voor de microbiële stabiliteit van het geproduceerde drinkwater. Zo is bijvoorbeeld waargenomen dat de microbiële samenstelling van het influentwater sterker varieert in de tijd dan het behandelde effluentwater. De inzichten die hiermee worden verkregen kunnen op termijn helpen bij het optimaliseren van de bedrijfsvoering van langzame zandfilters en het terugdringen van de periodes waarin een filter uit bedrijf is. Dit is nog maar het begin van het ontrafelen van de biologische raadsel van het langzame zandfilter.

Referenties

1. Huisman, L., & Wood, W.E. (1974). *Slow sand filtration*. World Health Organization.
2. Schijven, J. F. et al. (2013). 'A mathematical model for removal of human pathogenic viruses and bacteria by slow sand filtration under variable operational conditions'. *Water Research* 47, 2592 e2602
3. Haig, S. J., Quince, C., Davies, R. L., Dorea, C. C., & Collins, G. (2015). 'The relationship between microbial community evenness and function in slow sand filters'. *MBio*, 6(5).
4. Kooij, D. van der, Veenendaal, H. R., Italiaander, R., Mark, E. J. van der, & Dignum, M. (2018). 'Primary colonizing Betaproteobacteriales play a key role in the growth of *Legionella pneumophila* in biofilms on surfaces exposed to drinking water treated by slow sand filtration'. *Applied and environmental microbiology*, 84(24).
5. Fowler, S. J., Palomo, A., Dechesne, A., Mines, P. D., & Smets, B. F. (2018). 'Comammox *Nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities'. *Environmental microbiology*, 20(3), 1002-1015.
6. Wielen, P. W. van der, Voost, S., & Kooij, D. van der (2009). 'Ammonia-oxidizing bacteria and archaea in groundwater treatment and drinking water distribution systems'. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4687-4695.