

BTO 2015.019 | April 2015

BTO rapport

Validatie en standaardisatie van de BPP-test voor drinkwater

BTO

Validatie en standaardisatie van de BPP-test voor drinkwater

BTO 2015.019 | April 2015

Opdrachtnummer

400554/008/005

Projectmanager

Luc Hornstra

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteurs

Paul van der Wielen

Jaar van publicatie
2015

Meer informatie

T 642
E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

Keywords
Biologische activiteit

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 69 642
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

The logo for KWR (Watercycle Research Institute) features the letters 'KWR' in a bold, blue, sans-serif font. The 'K' and 'W' are connected, and the 'R' is slightly separated.

Watercycle
Research
Institute

BTO 2015.019 | April 2015 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Voorwoord

De studie beschreven in dit rapport is uitgevoerd door verschillende watermonsters te analyseren op het KWR laboratorium. Dank gaat uit naar Marco Dignum (Waternet), Melanie van Schijndel (Brabant Water), Peter Schaap (PWN), Geo Bakker (Vitens) voor het organiseren van de bemonstering bij de drinkwaterbedrijven, Ronald Italiaander en Ton Braat voor het organiseren en analyseren van de monsters op het microbiologisch laboratorium van KWR en Dick van der Kooij voor het kritisch doorlezen van de rapportage.

Samenvatting

Nagroeï van micro-organismen in het distributiesysteem is onwenselijk en daarom streven de Nederlandse drinkwaterbedrijven naar productie van drinkwater dat een lage groeipotentie heeft voor micro-organismen. Binnen het BTO is de biomassaproductiepotentie (BPP)-test ontwikkeld, waarmee de groeipotentie van drinkwater wordt bepaald met behulp van ATP-metingen volgens NEN-EN 16421:2014. Uit een vergelijking tussen de resultaten van de traditionele AOC-test en de BPP-test is gebleken dat de BPP-test een vollediger beeld geeft van de hoeveelheid microbiologische afbreekbare stoffen dan de AOC-methode. Voordat de BPP test grootschaliger kan worden toegepast is het echter van belang om de test verder te optimaliseren en standaardiseren. Het doel van dit deelproject is om groeiopbrengst van de BPP-methode te valideren met een acetaatijklijn in diverse watertypen en om het effect van toevoegen van een ent te bepalen, zodat de procedure van de methode verder kan worden gestandaardiseerd.

Ijklijn met acetaat

De groeiopbrengst van micro-organismen is bepaald in het reinwater van ps Amersfoortseweg, ps Nuland, ps Weesperkarspel en het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal waar 0, 5, 10, 15 en 20 μg acetaat-C l⁻¹ aan werd toegevoegd. De resultaten tonen aan dat de groeiopbrengst afhankelijk is van het watertype. De hoogste groeiopbrengst ($0,64 \pm 0,04$ ng ATP/ μg ac-C) is waargenomen in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal, terwijl de laagste opbrengst ($0,22 \pm 0,04$ ng ATP/ μg ac-C) is waargenomen in het reinwater van ps Amersfoortseweg. Deze groeiopbrengsten zijn lager dan de groeiopbrengsten die zijn gerapporteerd in eerdere publicaties. Mogelijke verklaringen voor deze verschillen zijn dat de groeiopbrengst in deze studie is uitgevoerd bij zeer lage concentraties aan substraat (ultraoligotrofe condities) in tegenstelling tot de andere studies en dat de groeiopbrengst is bepaald van een natuurlijke microbiële gemeenschap in plaats van een reincultuur van één bacteriesoort. Door de invloed van het watertype op de groeiopbrengst is het omrekenen van de resultaten van de BPP-test naar een AOC-concentratie met behulp van een vaste waarde voor de groeiopbrengst minder betrouwbaar. Er wordt daarom aanbevolen om deze omrekening naar AOC concentraties niet uit te voeren, maar de resultaten van de BPP-test te rapporteren als de maximale ATP concentratie gedurende de eerste zeven dagen (BP_7) en de cumulatieve biomassaproductie gedurende 14 dagen (BPC_{14}). Aangezien nagroeïproblemen in het drinkwaterdistributiesysteem voornamelijk zijn gekoppeld aan de mate van biomassavorming, zullen deze twee parameters een betrouwbaardere voorspellende waarde hebben voor eventuele nagroeïproblemen dan de omgerekende AOC-concentratie.

Het omrekenen van groeiopbrengst naar een AOC-concentratie met een vaste waarde voor deze groeiopbrengst wordt ook toegepast bij andere methoden, zoals de AOC-methode volgens Werner & Hamsch (1986) of Hammes & Egli (2005). Hammes & Egli (2005) gebruiken daarbij bijvoorbeeld een theoretische groeiopbrengst ($1,0 \times 10^7$ cellen/ μg AOC-C) die niet wordt bereikt in het drinkwater waar ze acetaat aan hebben toegevoegd (waargenomen groeiopbrengst: $5,2 - 5,4 \times 10^6$ cellen/ μg AOC-C). Dit roept de vraag op in hoeverre deze theoretisch gebruikte groeiopbrengst leidt tot betrouwbare AOC-concentraties. Daarnaast is de groeiopbrengst in verschillende

watertypen niet bepaald door Hammes & Egli (2005) en Werner & Hamsch (1986). De verwachting is dat die groeiopbrengst ook afhankelijk zal zijn van het watertype, omdat de maximale troebelheid (Werner & Hamsch, 2005) en celaantallen (Hammes & Egli, 2005) afhankelijk zijn van de mate van energie (ATP) die beschikbaar is om biomassa te vormen. Het is daarom onduidelijk in hoeverre de gerapporteerde AOC-concentraties met deze twee alternatieve AOC-methoden een betrouwbare weergave is van de AOC-concentratie in verschillende drinkwatertypen.

Effect ent

Het effect van het toevoegen van een ent in de BPP-test is onderzocht door rivierwaterent en/of actief koolfiltraatent toe te voegen aan het reinwater van ps Amersfoortseweg, ps Nuland, ps Andijk en het water na ozonisatie bij ps Weesperkarspel. De rivierwaterent was afkomstig van het Lekkanaal bij Nieuwegein, terwijl de actief koolfiltraatent afkomstig was van ps Weesperkarspel. De resultaten laten zien dat het toevoegen van een rivierwaterent, actief koolfiltraatent en rivierwaterent & actiefkoolfiltraatent geen effect had op de BP_7 en BPC_{14} in de BPP-test met het reinwater van ps Amersfoortseweg, ps Nuland en ps Andijk. Dit laatste resultaat is verrassend omdat in eerdere experimenten is waargenomen dat het toevoegen van een actief koolfiltraatent aan het reinwater van ps Andijk (dat met chloordioxide is behandeld) wel tot hogere BP_7 - en BPC_{14} -waarden leidden. Waarschijnlijk komt dit verschil doordat destijds een actief koolfiltraatent is toegevoegd uit de zuivering van ps Andijk, terwijl nu een actief koolfiltraatent uit de zuivering van een ander pompstation is toegevoegd. Het toevoegen van een rivierwaterent had ook geen effect op de BPP-parameters met het water van ps Weesperkarspel na ozonisatie. Het toevoegen van een actief koolfiltraatent zorgde echter wel voor verhoogde BP_7 - en BPC_{14} -waarden in de BPP-test met dit ozonbehandelde water van ps Weesperkarspel. Deze verhoging komt waarschijnlijk doordat in het ozonbehandelde water micro-organismen zijn afgedood, waardoor de beginconcentratie aan levende micro-organismen en/of verschillende soorten micro-organismen in de BPP-test zonder ent te laag is om tot volledige groei op alle afbreekbare stoffen in het water te komen. Op basis van deze resultaten wordt aanbevolen om in het vervolg standaard geen ent toe te voegen aan de BPP-test. Wanneer echter watermonsters worden onderzocht die kort daarvoor zijn behandeld met een proces waarbij de autochtone microflora wordt geïnactiveerd of verwijderd, dan is het aan te bevelen om een ent toe te voegen van water uit dezelfde zuivering waar wel een autochtone flora aanwezig is. Bij voorkeur is dit (biologisch) AKF, maar het is te verwachten dat ook (biologisch) snelfiltraat of langzame zandfiltraat hiervoor kan worden gebruikt.

Inhoud

1	Introductie	9
1.1	Achtergrond	9
1.2	Doelstelling	9
2	BPP-methode voor drinkwater	11
2.1	Groeiopotentie drinkwater	11
2.2	De BPP-methode	11
3	Ijklijn met acetaat	15
3.1	Introductie	15
3.2	Resultaten	15
3.3	Discussie	17
3.3.1	Groeiopbrengst	17
3.3.2	AOC-methode volgens Werner & Hambsch (1986) en Hammes & Egli (2005)	21
3.3.3	Betrouwbaarheid BPP-methode	22
4	Effect ent	25
4.1	Introductie	25
4.2	Materiaal en methode	25
4.3	Resultaten	26
4.4	Discussie	29
5	Conclusies en aanbevelingen	31
5.1	Conclusies	31
5.2	Aanbevelingen	31
6	Referenties	33

1 Introductie

1.1 Achtergrond

Distributie van drinkwater van hoge kwaliteit, zonder een restgehalte van een desinfectiemiddel, is het 'watermerk' van de drinkwatervoorziening in Nederland. Nagroei van (micro)organismen in het leidingwater bij transport en distributie en in drinkwaterinstallaties kan echter kwaliteitsproblemen veroorzaken. Met de huidige bedrijfsvoering lijkt nagroei op meerdere locaties nog onvoldoende te worden beperkt. Dat kan zich uiten in consumentenklachten over dierlijke organismen, bruinwater en/of overschrijding van de wettelijke parameters. De mate van nagroei is afhankelijk van de beschikbaarheid van afbreekbare verbindingen die aanwezig zijn in opgeloste vorm en als biomassa in het water 'af pompstation'. Ook bepaalde leidingmaterialen kunnen afbreekbare stoffen afgeven. Daarnaast zijn verblijftijd, afstand en temperatuur van invloed op de nagroei. In het BTO-project 'Bepaling en beoordeling van de biologische stabiliteit van drinkwater', dat heeft gelopen van 2009 t/m 2012, zijn nieuwe meetmethoden ontwikkeld om de microbiologische groeipotentie (biologische stabiliteit) van het drinkwater te bepalen. Eén van deze nieuwe meetmethoden is de biomassaproductiepotentie (BPP) van drinkwater, waarmee de hoeveelheid gemakkelijk en moeilijk afbreekbaar (organisch) materiaal in drinkwater kan worden bepaald. De resultaten die tot nu toe zijn behaald met de BPP-methode laten zien dat de methode vollediger en meer accuraat is om de groeipotentie van het drinkwater te beschrijven dan de traditionele AOC-methode (van der Kooij & Veenendaal, 2014). De verwachting is daarom dat de BPP-methode een betere indicator is om de groeipotentie van het Nederlandse drinkwater te beschrijven. De resultaten van de BPP-methode zijn met behulp van een conversiefactor omgerekend naar een AOC-concentratie. Deze conversiefactor is gebaseerd op de ATP-opbrengst van een ijklijn met acetaat in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal. Er zijn echter aanwijzingen dat deze ATP-opbrengst met acetaat afhankelijk is van de drinkwatersamenstelling. Daarnaast is tijdens de ontwikkeling van de BPP-methode naar voren gekomen dat het toevoegen van een inoculum de resultaten in sommige watertypen kan beïnvloeden.

1.2 Doelstelling

Het doel van dit deelproject, dat onderdeel is van het BTO-project 'Optimalisatie/validatie nieuwe meetmethoden biologische stabiliteit', is om de groeiopbrengst in de BPP-methode te valideren met een acetaatijklijn in diverse watertypen en om het effect van toevoegen van een ent te bepalen, zodat de methode verder kan worden gestandaardiseerd.

2 BPP-methode voor drinkwater

2.1 Groeipotentie drinkwater

Drinkwater bevat over het algemeen lage concentraties organische stoffen die door micro-organismen kunnen worden afgebroken. Wanneer de concentraties van deze afbreekbare stoffen te hoog zijn, kunnen er nagroeiproblemen in het distributiesysteem optreden. Om te achterhalen in hoeverre het drinkwater stoffen bevat waar micro-organismen op kunnen groeien, wordt de groeipotentie van het drinkwater bepaald. Hiervoor zijn in het (verre) verleden methoden ontwikkeld waarmee de concentratie van gemakkelijk afbreekbaar organisch koolstof (AOC) en de biofilmvormingssnelheid (BVS) van drinkwater wordt bepaald. De methode waarmee de AOC-concentratie wordt bepaald heeft echter als nadeel dat (i) alleen de afbreekbare stoffen worden gemeten die de teststammen (*Pseudomonas fluorescens* stam P17 en *Spirillum* sp. stam Nox) kunnen afbreken in de AOC-test en (ii) het water moet worden gepasteuriseerd, dat mogelijk leidt tot vorming van AOC. In het bedrijfstakonderzoek (BTO) is daarom onderzocht of de biomassaproductiepotentie (BPP)-methode geschikt is om de groeipotentie van het drinkwater te bepalen (van der Kooij & Veenendaal, 2014).

2.2 De BPP-methode

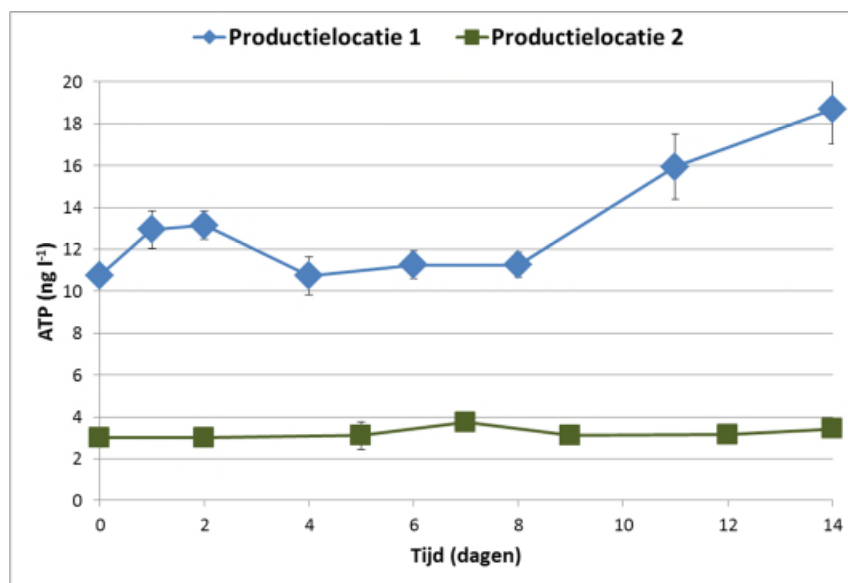
De BPP-methode voor het bepalen van de groeipotentie is uitgebreid beschreven in de BTO rapportage 'Bepaling van de biomassaproductiepotentie (BPP) van drinkwater' (van der Kooij & Veenendaal, 2014). In deze paragraaf zullen kort de methode en de parameters van de methode worden beschreven. Voor een gedetailleerde beschrijving van de BPP-methode wordt naar het eerder genoemde rapport verwezen.

Bij de BPP-test worden monsters (600 ml) van het te onderzoeken water zonder behandeling toegevoegd aan erlenmeyers die zijn schoongemaakt conform de AOC-bepaling. Vervolgens worden 1 ml membraan gefiltreerd water van het Lekkanaal en een oplossing van fosfaat en nitraat toegevoegd, waarna het monster 14 dagen wordt geïncubeerd bij 25°C. Periodiek (om de twee tot drie dagen) wordt de concentratie actieve biomassa gemeten door de ATP-concentratie van het water te bepalen volgens NEN-EN 16421:2014 .

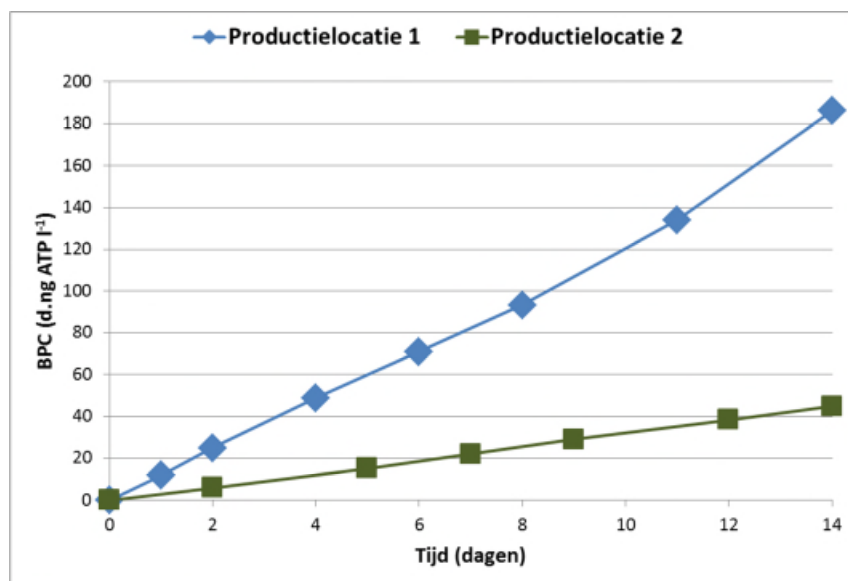
Op basis van de ATP-metingen in de tijd worden twee parameters bepaald: de maximale ATP-concentratie in de eerste zeven dagen, weergegeven als de maximale biomassaproductie in de eerste zeven dagen (BP_7) én de cumulatieve ATP-concentratie gedurende 14 dagen, weergegeven als de cumulatieve biomassaproductie over 14 dagen (BPC_{14}).

In Figuur 2.1 zijn twee voorbeelden weergegeven van het ATP-verloop tijdens de BPP test van het reinwater van twee productielocaties. In het reinwater van productielocatie 1 neemt de ATP-concentratie van dag 0 t/m dag 2 toe, waarbij de maximale concentratie in de eerste zeven dagen (BP_7) 13,2 ng ATP l⁻¹ is. In dit watertype vindt dus groei plaats van micro-organismen in de eerste dagen na het inzetten van de BPP-test. Deze 'snelle' groei wordt veroorzaakt door gemakkelijk afbreekbare stoffen. Van dag 6 t/m dag 14 wordt een tweede toename van de ATP-concentratie waargenomen, waarbij de ATP-concentratie vanaf dag 11 hoger is dan de BP_7 . In dit watertype vindt dus ook

groei plaats vanaf dag 6. Deze 'langzame' groei wordt veroorzaakt door moeilijk afbreekbare stoffen. In het reinwater van productielocatie 2 blijft de ATP-concentratie gedurende de eerste 14 dagen constant. Er vindt in dit watertype dus geen groei van micro-organismen plaats, maar wel weten de micro-organismen zich te handhaven. Dit betekent dat de micro-organismen in dit watertype nog steeds afbreekbare stoffen omzetten om hun interne ATP-pool op peil te houden, maar dat er niet voldoende substraat aanwezig is voor de productie van extra actieve biomassa (van der Kooij & Veenendaal, 2014). De BP_7 van dit watertype is $3,7 \text{ ng ATP l}^{-1}$.



Figuur 2.1 De ATP-concentratie in het reinwater van twee productielocaties gedurende de 14 dagen incubatietijd van de BPP-test.



Figuur 2.2 De cumulatieve biomassaproductiepotentie in d.ng ATP l^{-1} van het reinwater van twee productielocaties gedurende de 14 dagen incubatietijd van de BPP-test.

De cumulatieve BPP-concentratie van deze twee watertypen gedurende 14 dagen is weergegeven in Figuur 2.2. De BPC_{14} van het reinwater van productielocatie 1 is 186,1 d.ng ATP l⁻¹, terwijl de BPC_{14} van het reinwater van productielocatie 2 44,8 d.ng ATP l⁻¹ is.

3 Ijklijn met acetaat

3.1 Introductie

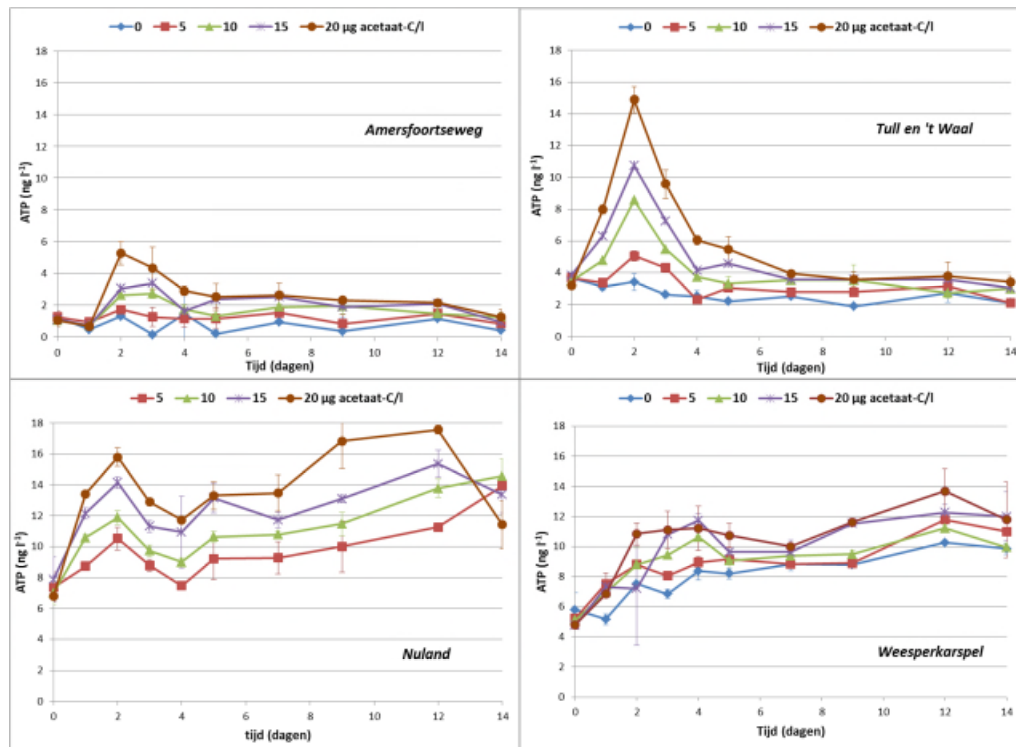
Tijdens de ontwikkeling van de BPP-methode voor drinkwater werd in 2006 een ijklijn gemaakt voor de BP_7 -en BPC_{14} -waarden in het gedistribueerde drinkwater van productielocatie Tull en 't Waal, waar verschillende concentraties acetaat aan toe zijn gevoegd (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Uit de relatie tussen acetaat en BP_7 kon worden afgeleid dat de groeiopbrengst van de micro-organismen over het concentratietraject van 0 tot 25 μg acetaat- C l^{-1} $0,91 \pm 0,06$ ng ATP/ μg ac-C is. Deze groeiopbrengst werd afgerond naar 1 ng ATP/ μg ac-C om het AOC-gehalte uit de BP_7 te kunnen berekenen (van der Kooij & Veenendaal, 2014). In een vervollexperiment werd vervolgens onderzocht of toediening van 10 μg acetaat-C aan andere drinkwatertypen ook resulteerde in een groeiopbrengst van 1 ng ATP/ μg ac-C. Uit deze resultaten volgde dat de opbrengst van de micro-organismen varieerde tussen 0,13 en 1,1 ng ATP/ μg ac-C, wat duidt op verschil in groeiopbrengst tussen de verschillende watertypen. Omdat deze opbrengst in verschillende watertypen is gebaseerd op slechts één concentratie (10 μg acetaat- C l^{-1}), is het niet mogelijk om hier een betrouwbare conclusie aan te verbinden. Zo was de groeiopbrengst van micro-organismen met 10 μg acetaat- C l^{-1} in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal 0,79 ng ATP/ μg ac-C, dat lager is dan de gemiddelde opbrengst van de ijklijn met acetaatconcentraties tussen 5 en 25 μg acetaat- C l^{-1} . In hoeverre de groeiopbrengst van 1 ng ATP/ μg ac-C ook in andere drinkwatertypen wordt waargenomen, en dus betrouwbaar kan worden gebruikt om de AOC concentratie uit de BP_7 waarde te berekenen, is in de hier beschreven studie onderzocht door verschillende acetaathoeveelheden toe te voegen aan het reinwater van ps Amersfoortseweg, ps Nuland, ps Weesperkarspel en het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal (bemonsterd aan de tap op het KWR laboratorium), zodat een eindconcentratie werd verkregen van 0, 5, 10, 15 en 20 μg acetaat- C l^{-1} . Aan alle monsters werd ook een rivierwaterent toegevoegd.

3.2 Resultaten

In Figuur 3.1 zijn de groeicurven weergegeven van de vier verschillende watertypen met acetaatconcentraties tussen 0 en 20 $\mu\text{g C l}^{-1}$. In het reinwater van ps Amersfoortseweg neemt de hoeveelheid actieve biomassa tijdens de eerste twee tot drie dagen van de incubatie toe met toenemende acetaatconcentratie. De toevoeging van een gemakkelijk afbreekbare stof zoals acetaat aan het water leidt dus tot groei van micro-organismen, zoals ook in eerdere experimenten is waargenomen (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Ook in het reinwater van ps Nuland en in het gedistribueerde water van ps Tull en 't Waal neemt de maximale ATP-concentratie de eerste dagen toe bij toenemende acetaatconcentratie in het water. In het reinwater van Weesperkarspel verloopt de ATP-toename bij toenemende acetaatconcentratie anders, omdat gedurende de eerste twee dagen er geen duidelijk verschil is in ATP-concentratie tussen de kolven met verschillende acetaatconcentraties, met uitzondering van het reinwater met 20 μg acetaat- C l^{-1} . Vanaf dag 2 worden de verschillen in ATP-concentratie tussen het water met de verschillende acetaatconcentraties zichtbaar, en de maximale ATP-concentratie wordt pas behaald op dag 4 of later, dat twee dagen later is dan bij de andere watertypen.

Tevens volgt uit Figuur 3.1 dat de maximale ATP-concentratie (BP_7) die wordt bereikt op de verschillende acetaatconcentraties verschilt tussen de verschillende watertypen. Zo

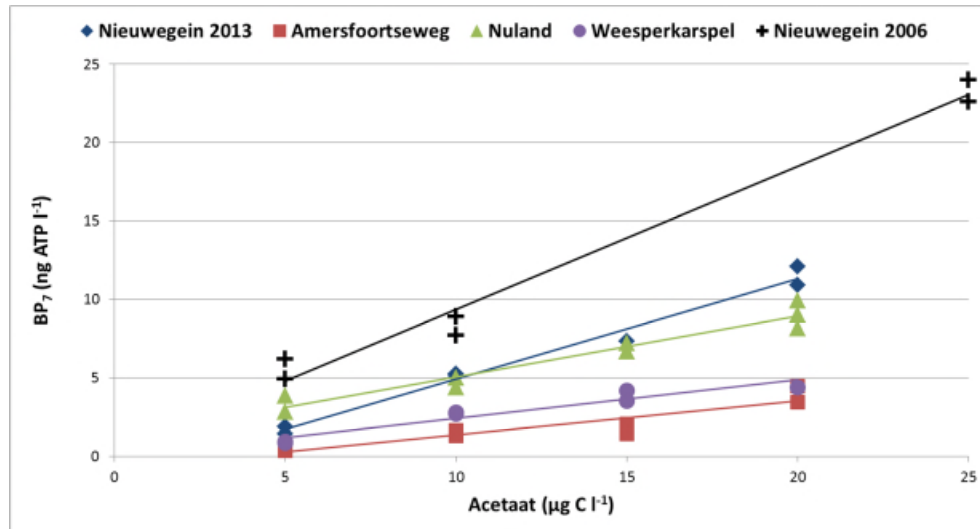
varieert de BP_7 bij 20 μg acetaat- C l^{-1} tussen $5,3 \pm 0,7$ ng ATP l^{-1} in het reinwater van ps Amersfoortseweg en $14,9 \pm 0,8$ ng ATP l^{-1} in het gedistribueerde water van ps Tull en 't Waal. Ook na aftrek van de blanco waarde (ATP-concentratie in watertype zonder toevoeging van acetaat) blijft dit verschil aanwezig ($3,9 \pm 0,7$ ng ATP l^{-1} in reinwater van ps Amersfoortseweg en $11,5 \pm 0,8$ ng ATP l^{-1} in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal).



Figuur 3.1 De groeicurven van de BPP test met het reinwater van ps Amersfoortseweg, ps Nuland en ps Weesperkarspel en het water van ps Tull en 't Waal bemonsterd aan de tap van het KWR laboratorium waar acetaat aan is toegevoegd tot een eindconcentratie van 0, 5, 10, 15 en 20 μg acetaat- C l^{-1} .

De maximale ATP-concentratie in de eerste zeven dagen van de BPP-test (BP_7), met aftrek van de ATP-concentratie van de blanco (watertype zonder acetaatdosering), is bepaald als maat voor de opbrengst van de micro-organismen op de verschillende acetaatconcentraties. Deze BP_7 is vervolgens per watertype uitgezet tegen de gedoseerde acetaatconcentratie (Figuur 3.2) en de helling van de lijn is vervolgens bepaald om de gemiddelde opbrengst (Y_{BP_7} , ng ATP/ μg ac-C) van de concentratierange van 5 tot 20 μg acetaat- C l^{-1} per watertype te bepalen (Tabel 3.1). Daarnaast zijn ook de gegevens toegevoegd die in 2006 zijn bepaald aan het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en verrijkt met acetaat tot eindconcentratie 5, 10 en 25 μg acetaat- C l^{-1} (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Uit Figuur 3.2 blijkt dat er een duidelijke lineaire correlatie is tussen de BP_7 en de acetaatconcentratie voor ieder watertype en de R^2 van deze correlaties liggen in vier van de vijf gevallen boven de 0,90 (Tabel 3.1). De helling van de lijn varieert echter tussen de verschillende watertypen en daarmee samenhangend varieert de groeiopbrengst per μg acetaat-C ook per watertype. De laagste groeiopbrengst werd waargenomen in het reinwater van ps Amersfoortseweg ($0,22 \pm 0,04$ ng ATP/ μg ac-C), terwijl de hoogste groeiopbrengst is vastgesteld in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal in 2006 ($0,91 \pm 0,06$ ng ATP/ μg ac-C;

Tabel 3.1). Deze resultaten laten dus zien dat de groeiopbrengst op acetaat in de range van 5 tot 20 μg acetaat-C l⁻¹ en bepaald met de BPP-test afhankelijk is van het watertype.



Figuur 3.2 De maximale ATP-concentratie tijdens de eerste zeven dagen (BP_7 ; ng ATP l⁻¹) uitgezet tegen de toegevoegde acetaatconcentratie voor het drinkwater van het KWR laboratorium (Nieuwegein) in 2006 en 2013 en voor het reinwater van ps Amersfoortseweg, Nuland en Weesperkarspel in 2013.

Tabel 3.1 De groeiopbrengst van micro-organismen in verschillende watertypen verrijkt met acetaatconcentraties tussen 5 en 20 μg acetaat-C l⁻¹ en de R² van de correlatie tussen groeiopbrengst (BP_7) en acetaatconcentratie.

Watertype	Jaar	Groeiopbrengst (ng ATP/ μg ac-C)	R ²
A'foortseweg ^a	2013	0,22 ± 0,04	0,84
Nuland ^a	2013	0,39 ± 0,04	0,94
Weesperkarspel ^a	2013	0,25 ± 0,03	0,92
Tull en 't Waal ^b	2013	0,64 ± 0,04	0,98
Tull en 't Waal ^{b,c}	2006	0,91 ± 0,06	0,98

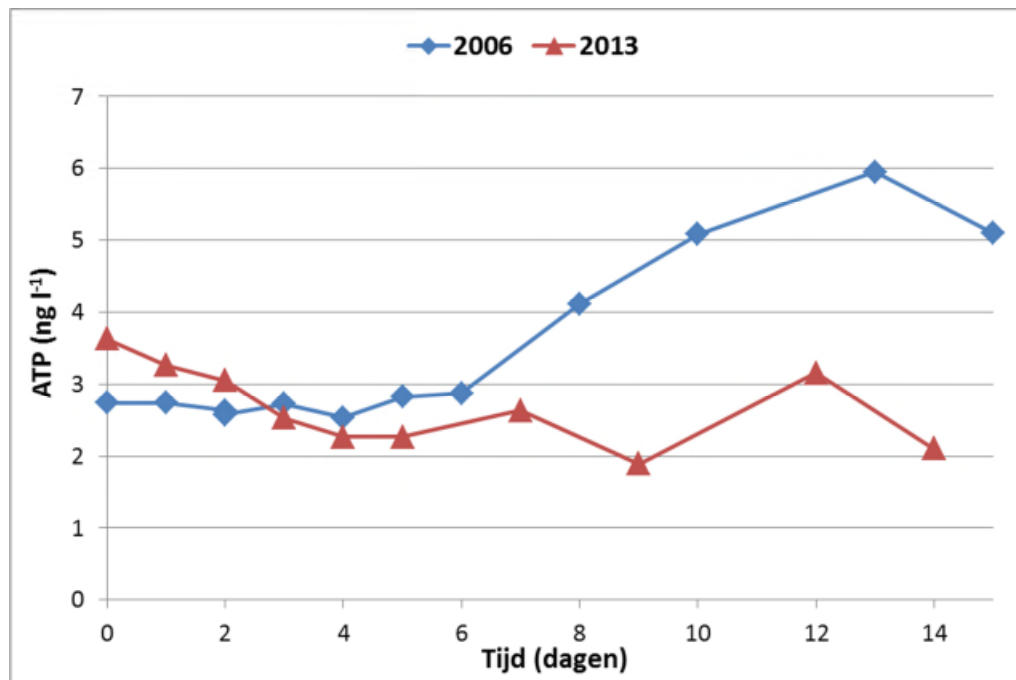
^a reinwater; ^b gedistribueerd drinkwater bemonsterd op het KWR laboratorium; ^c de groeiopbrengst is bepaald met 5, 10 en 25 μg acetaat-C l⁻¹

3.3 Discussie

3.3.1 Groeiopbrengst

De resultaten laten duidelijk zien dat de groeiopbrengst op bekende concentraties acetaat afhankelijk is van het watertype. De hoogste groeiopbrengst op acetaat werd waargenomen in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal, terwijl de laagste groeiopbrengst werd waargenomen in het reinwater van ps Amersfoortseweg. Opvallend is dat de groeiopbrengst die is waargenomen in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal in 2013 beduidend lager was dan in 2006. De resultaten van de BPP-test van het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal zonder acetaatdosering waren overigens ook verschillend tussen 2006 en 2013 (Figuur

3.3). Tussen 2006 en 2013 is de zuivering van ps Tull en 't Waal aangepast door introductie van een onthardingsproces, waardoor de waterkwaliteit is veranderd. De verschillen in waterkwaliteit tussen 2006 en 2013 zijn waarschijnlijk de oorzaak voor het waargenomen verschil in de BPP van het drinkwater en de groeiopbrengst op acetaat, aangezien de resultaten laten zien dat het watertype een invloed heeft op de groeiopbrengst van de micro-organismen op acetaat.



Figuur 3.3 De resultaten van de BPP-test met het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal (bemonsterd op het KWR laboratorium in Nieuwegein) in 2006 en 2013.

Tijdens het onderzoek naar de ontwikkeling van de BPP-test om de microbiologische groeipotentie van het drinkwater te beschrijven, werd ook de groeiopbrengst op 10 μg acetaat-C l⁻¹ in verschillende watertypen bepaald (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Die resultaten lieten zien dat deze groeiopbrengst op 10 μg acetaat-C l⁻¹ varieerde met watertype (Tabel 3.2). De gegevens die in 2013 zijn verzameld bevestigen deze trend (Tabel 3.2) en laten bovendien zien dat deze groeiopbrengst varieert over de range van 5 tot 20 μg acetaat-C l⁻¹.

Heijnen & van Dijken (1992) rapporteren in een publicatie over de groeiopbrengst van bacteriën (als reïnculturen) op acetaat en deze blijkt ongeveer 0,41 g biomassa-C per g acetaat-C te zijn. In de studie beschreven in dit rapport wordt de groeiopbrengst echter uitgedrukt in ng ATP/ μg acetaat-C. De verhouding tussen biomassa-C en ATP is voor verschillende bacteriesoorten bepaald en een overzicht van deze verhouding is gepubliceerd door Karl (1980). Gemiddeld is de verhouding tussen biomassa-C en ATP 250, d.w.z. 4 ng ATP/ μg biomassa-C. Met deze gemiddelde verhouding wordt de groeiopbrengst voor bacteriën op acetaat 1,64 ng ATP/ μg acetaat-C. Deze groeiopbrengst uit de literatuur is dus duidelijk hoger dan de groeiopbrengst die is waargenomen in de BPP-testen met de verschillende watertypen. In het overzichtsartikel van Karl (1980) zijn de laagste en hoogste biomassa-C/ATP verhoudingen echter 28 en 547. Wanneer een verhouding van 28 wordt gebruikt, is de groeiopbrengst aanzienlijk hoger (14,6 ng ATP/ μg acetaat-C), terwijl bij een verhouding

van 547 de groeiopbrengst 0,75 ng ATP/ μ g acetaat-C is. Dus zelfs bij die hoogste door Karl (1980) gerapporteerde verhouding is de groeiopbrengst hoger dan waargenomen voor de in dit rapport beschreven drinkwatertypen.

Tabel 3.2. De groeiopbrengst op 10 μ g acetaat-C l⁻¹ in verschillende watertypen die zijn bepaald in 2006 (data uit van der Kooij & Veenendaal, 2014) en in 2013.

Locatie	Jaartal	Groeiopbrengst (ng ATP/ μ g C)
Drinkwater KWR	2006	0,83 \pm 0,085
Drinkwater KWR	2013	0,52 \pm 0,007
Spannenburg	2006	0,94
Oldeholtpade	2009	0,41
Weesperkarspel	2010	0,17
Weesperkarspel	2013	0,27 \pm 0,007
Leiduin	2010	0,13
Haaren	2010	0,39
St Jansklooster	2010	1,10
Zuidwolde	2010	0,65
Amersfoortseweg	2013	0,15 \pm 0,022
Nuland	2013	0,47 \pm 0,045

Er zijn een aantal verklaringen te bedenken waarom de groeiopbrengst op acetaat in de verschillende drinkwatertypen lager is dan de groeiopbrengst van reïncultures op een gedefinieerd medium:

- Door de lage substraatconcentraties gaat percentueel een groot gedeelte van de door de bacteriecel gegenereerde energie naar handavingsprocessen in de cel, waardoor de opbrengst lager uitvalt

Onderzoek met continu cultuur opstellingen in de jaren '70 van de vorige eeuw heeft laten zien dat de opbrengst van bacteriën afhankelijk kan zijn van de groeisnelheid, waarbij lagere groeiopbrengsten worden verkregen bij lagere groeisnelheden (Veldkamp, 1976). De biomassa-C opbrengst per g acetaat-C die is gerapporteerd door Heijnen & van Dijken (1992), zijn uitgevoerd met een overmaat aan acetaat, waarbij de bacteriën dus groeiden met de maximale groeisnelheid. Tijdens de validatiestudies van de BPP-methode zijn zeer lage acetaatconcentraties toegevoegd (5 tot 20 μ g acetaat-C l⁻¹). Dergelijke lage acetaatconcentraties resulteren in groeisnelheden die lager zijn dan de maximale groeisnelheid, waardoor het mogelijk is dat de groeiopbrengsten lager zijn dan de groeiopbrengst die door Heijnen & van Dijken (1992) zijn gerapporteerd. De oorzaak van een lagere groeiopbrengst bij lage groeisnelheden is dat de bacteriën een relatief groter deel van de gegenereerde energie gebruiken voor handavingsprocessen van de cel, waardoor relatief een kleiner deel van de gegenereerde energie beschikbaar is voor biomassavorming (Tempest & Neijssel, 1984).

- C/ATP verhoudingen van bacteriën onder oligotrofe condities zijn hoger dan bij de organismen die zijn onderzocht op laboratorium onder niet oligotrofe condities

De groeiopbrengst is door Heijnen & van Dijken (1992) gerapporteerd in g biomassa-C per g acetaat-C en omgerekend naar ng ATP per μ g acetaat-C door gebruik te maken

van de door Karl (1980) gerapporteerde gemiddelde C/ATP ratio van 250 voor bacteriën. Deze gemiddelde ratio is gebaseerd op laboratoriumtesten met reïncultures van bacteriën op relatief hoge substraatconcentraties onder continu cultuur of batchcondities. Het is niet duidelijk in hoeverre dergelijke C/ATP ratio's ook gelden voor bacteriën die groeien bij zeer lage substraatconcentraties (μg per liter niveau) in drinkwater. Het is niet ondenkbaar dat wanneer bacteriën groeien onder condities met zeer lage concentraties van een energiebron, de cellen een minder grote interne ATP-pool in stand houden, zodat meer energie besteed kan worden aan de vorming van biomassa. Het gevolg is dan dat de C:ATP ratio hoger wordt, wat resulteert in een lagere ATP groeiopbrengst, zoals waargenomen in de validatiestudie. Laboratorium-experimenten zijn echter nodig om deze hypothese te testen.

- De groeiopbrengst is bepaald van een natuurlijke microbiële gemeenschap in plaats van een reïncultuur.

De groeiopbrengst die in de watertypen met verschillende acetaatconcentraties werd gevonden, zijn gebaseerd op een actieve biomassa-toename van de gehele microbiële gemeenschap. Dat is een andere situatie dan wanneer deze experimenten met een reïncultuur van één bacteriesoort wordt uitgevoerd. In een natuurlijke microbiële gemeenschap treedt concurrentie tussen micro-organismen op, waarbij onder oligotrofe condities bacteriën met de hoogste affiniteit voor het substraat in het voordeel zijn. Micro-organismen kunnen elkaar onderling echter ook beschadigen door het uitscheiden van enzymen, toxische producten en/of predatie, waardoor het niet ondenkbaar is dat bacteriën in een natuurlijke gemeenschap meer energie moeten besteden aan herstel van de cel, waardoor een lagere hoeveelheid van de gegeneerde energie overblijft voor vorming van biomassa.

Naast de relatief lage groeiopbrengst die werd waargenomen in alle watertypen, valt ook op dat de groeiopbrengst tussen de watertypen aanzienlijk verschilde. Het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en het reinwater van ps Nuland resulteerde in een hogere groeiopbrengst per μg acetaat-C dan het reinwater van ps Amersfoortseweg en ps Weesperkarspel. Onduidelijk is waar deze verschillen door worden veroorzaakt, maar de hierboven genoemde oorzaken waarom de groeiopbrengst in de watertypen lager is dan eerder gerapporteerd in de literatuur, zouden de verschillen die tussen watertypen zijn waargenomen ook kunnen verklaren, omdat ieder watertype een andere soortensamenstelling van micro-organismen heeft (van der Wielen et al., 2014).

In de eerdere rapportage van de BPP-test zijn uit waarden voor de BP_7 en BPC_{14} AOC-concentraties berekend (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Voor deze berekening is een groeiopbrengst van $1,0 \text{ ng ATP}/\mu\text{g}$ acetaat-C gebruikt, die is afgeleid van de acetaatijklijn bepaald in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal in 2006. De resultaten van de acetaatdoseringen aan verschillende watertypen in deze aanvullende studie hebben echter laten zien dat een groeiopbrengst van $1,0 \text{ ng ATP}/\mu\text{g}$ acetaat-C meestal niet wordt bereikt en dat de groeiopbrengst op acetaat verschilt tussen watertypen. Hierdoor is onduidelijk in hoeverre de berekende AOC-concentraties betrouwbaar zijn. De correlaties die zijn berekend tussen de BP_7 en AOC (P17/Nox) en BPC_{14} en AOC (P17/Nox) voor drinkwater bereid uit grondwater en drinkwater bereid uit oppervlaktewater zijn weliswaar significant, maar de R^2 varieert van 0,29 tot 0,68 (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Dus een groot deel van de variatie in de AOC-waarden wordt niet beschreven met de BP_7 en/of BPC_{14} parameter. Het verschil in groeiopbrengst per watertype zou hiervan een oorzaak kunnen zijn. Hoewel het ook mogelijk is dat met

stammen P17 en Nox niet alle afbreekbare stoffen die in het drinkwater aanwezig zijn, worden bepaald (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Gezien deze overwegingen is het dus niet aan te raden om AOC-concentraties te berekenen uit de BP_7 en BPC_{14} gegevens van de BPP-test. Ook in de eerdere rapportage over de BPP-test werd overigens al voorgesteld om de resultaten van de BPP test te rapporteren als BP_7 - en BPC_{14} -waarden in plaats van de berekende AOC-concentraties (van der Kooij & Veenendaal, 2014). De resultaten van deze validatiestudie van de BPP-test bevestigen dus die aanbeveling.

3.3.2 AOC-methode volgens Werner & Hamsch (1986) en Hammes & Egli (2005)

Bij enkele andere methoden om de groeipotentie van drinkwater te bepalen worden ook gemiddelde groeiopbrengsten gebruikt voor het bepalen van de AOC-concentratie met behulp van natuurlijke microbiële gemeenschappen (Werner & Hamsch, 1986, Hammes & Egli, 2005). In de AOC-methode volgens Hammes & Egli (2005) wordt een theoretische groeiopbrengst gebruikt van $1,0 \times 10^7$ cellen/ μg AOC-C om de maximale celaantallen om te rekenen naar AOC-concentratie (Hammes et al., 2006). Deze theoretische groeiopbrengst is echter niet gevalideerd met een range van substraatconcentraties (ijklijn) in verschillende watertypen, waardoor onduidelijk blijft in hoeverre deze groeiopbrengst representatief is voor groei van de natuurlijke microbiële populatie (die als inoculum wordt gebruikt). Hierdoor blijft ook onduidelijk hoe betrouwbaar deze berekende AOC-concentraties zijn. Uit de publicatie van Hammes & Egli (2005) kan een eerste indruk worden verkregen over de juistheid van deze theoretische groeiopbrengst, omdat in het artikel groeicurven van de natuurlijke microbiële populatie op 0, 50 en 100 μg acetaat-C l^{-1} worden weergegeven. Wanneer de maximale celaantallen worden afgeleid uit de groeicurven en de groeiopbrengst met behulp van die gegevens wordt berekend, varieert de groeiopbrengst tussen $5,2 \times 10^6$ en $5,4 \times 10^6$ cellen/ μg AOC-C (Tabel 3.3), dat duidelijk lager is dan de gebruikte $1,0 \times 10^7$ cellen/ μg AOC-C. Het toepassen van theoretische groeiopbrengsten, zonder deze verder te valideren, kan er dus toe leiden dat onbetrouwbare AOC-concentraties worden berekend. Het is daarom aanbevelingswaardig om alleen goed gevalideerde groeiopbrengsten te gebruiken om AOC-concentraties van drinkwater te berekenen uit biomassa- en/of celopbrengsten in groeitesten.

Tabel 3.3. Groeiopbrengst in cellen/ μg acetaat-C zoals die is waargenomen in groeicurven die zijn bepaald volgens de AOC-methode van Hammes & Egli (2005).

Acetaat (μg C l^{-1})	Maximale celaantallen (N ml^{-1})	Groeiopbrengst (N cellen/ μg acetaat-C) ^a
0	$2,5 \times 10^5$	Nvt
50	$5,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^6$
100	$7,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^6$

^a gecorrigeerd voor de blanco (0 μg C l^{-1} acetaat)

Het is overigens ook te verwachten dat wanneer de groeiopbrengsten van de AOC-methode van Werner & Hamsch (1986) en Hammes & Egli (2005) worden gevalideerd met meerdere watertypen, de resultaten vergelijkbaar zullen zijn met de resultaten van de validatie van de BPP-test, omdat ook deze maximale troebelheid (Werner & Hamsch, 1986) en celaantallen (Hammes & Egli, 2005) afhankelijk zijn van de mate van energie die bruikbaar is voor micro-organismen om biomassa te vormen.

Het ontbreken van validatie en standaarden voor deze alternatieve AOC-methoden is ook problematisch om te testen of een laboratorium voldoet aan de kwaliteitseisen om deze alternatieve AOC-methoden op een betrouwbare manier uit te voeren. De AOC-

methode volgens Hammes & Egli (2005) is ondertussen toegepast op meerdere laboratoria (bijvoorbeeld Ross et al., 2013, Peter-Varbanets et al., 2011, Ramseier et al., 2011), maar bij al deze publicaties worden geen gegevens getoond waaruit blijkt dat de groeiopbrengst op bijvoorbeeld 50 en/of 100 µg acetaat-C l⁻¹ vergelijkbaar is met de groeiopbrengst die door Hammes & Egli (2005) is waargenomen. Zonder dergelijke vergelijking blijft onduidelijk of een laboratorium in staat is om de AOC-methode op een betrouwbare manier uit te voeren. Bij het uitvoeren van de AOC-methode zijn dergelijke kwaliteitscontroles erg belangrijk, omdat de AOC-methode gevoelig is voor contaminatie met AOC van externe bronnen. Zo kan niet goed schoongemaakt en behandeld glaswerk, het gebruik van vluchtige organische stoffen (bijvoorbeeld ethanol) op het laboratorium en/of filtratie van watermonsters de uitkomsten van de AOC-methode beïnvloeden (pers. comm. van der Kooij). De BPP-test zal ook gevoelig zijn voor dergelijke verstoringen en het is daarom belangrijk om de BPP-test periodiek te valideren met bekende concentraties acetaat, zoals momenteel in het KWR laboratorium ook wordt gedaan voor de traditionele AOC test methode. Het is daarbij van belang om deze validatie uit te voeren in hetzelfde watertype en bij verandering van de waterkwaliteit de groeiopbrengst opnieuw te bepalen. Daarnaast is het ook belangrijk om bij het inzetten van de BPP-test van watermonsters een controlemonster mee te nemen, waarvan de BP₇ en BPC₁₄ waarden bekend zijn. Dit zou bijvoorbeeld een drinkwatermonster kunnen zijn dat wordt genomen na doorspoeling bij één van de drinkwaterpunten op het laboratorium.

3.3.3 Betrouwbaarheid BPP-methode

Het verschil in groeiopbrengst op acetaat tussen de verschillende watertypen roept ook de vraag op in hoeverre de BP₇- en BPC₁₄-waarden tussen verschillende watertypen kunnen worden vergeleken en in welke mate deze twee parameters voorspellend zijn voor de eventuele nagroeiproblemen in het distributiesysteem.

Nagroeiproblemen die in het distributiesysteem kunnen worden waargenomen zijn: (i) groei van micro-organismen die een risico vormen voor de volksgezondheid (bv *Legionella pneumophila*), (ii) esthetische en technische klachten door dierlijke organismen, (iii) geur/smaak klachten, (iv) bruinwaterklachten en (v) overschrijding van wettelijke parameters nagroei (*Aeromonas*, KG22, coliformen en *Legionella*). De meeste van deze problemen hebben een directe relatie met de hoeveelheid biomassa op de buiswand en sediment. Zo kunnen dierlijke organismen en *Legionella pneumophila* zich pas vermeerderen wanneer er voldoende biofilm heeft gevormd op buiswand en sediment. Ook *Aeromonas* lijkt secundair te groeien in het distributiesysteem, dat wil zeggen dat het organisme zich weet te vermeerderen op stoffen die vrijkomen door groei van andere (micro-)organismen (Hijnen & van der Wielen, 2014).

Een methode die in staat is om de biomassaproductiepotentie van drinkwater te achterhalen lijkt dus het meest betrouwbaar als indicator voor eventuele nagroeiproblemen. De mate van groeiopbrengst per µg substraat van het watertype lijkt een minder belangrijke rol te spelen in relatie tot nagroeiproblemen in het distributiesysteem. Studies hebben laten zien dat ATP een betrouwbare maat is voor de hoeveelheid biomassa van micro-organismen in niet fosfaatgelimiteerde milieus (Karl, 1980). Het is daarom aannemelijk dat de maximale ATP-concentratie (BP₇) en de cumulatieve hoeveelheid gevormd ATP (BPC₁₄) in een watertype is gerelateerd aan eventuele nagroeiproblemen in het distributiesysteem. In de eerdere studie naar de BPP-methode is bijvoorbeeld waargenomen dat bij hoge BPC₁₄ en/of BP₇-waarden er een groter risico is op het overschrijden van de wettelijke norm voor *Aeromonas* in het distributiesysteem (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Uitbreiding van de database met

BP₇- en BPC₁₄-waarden van reinwatertypen moet meer duidelijkheid geven in hoeverre aandachtswaarden voor de BP₇ en BPC₁₄ zijn af te leiden in relatie tot nagroei van *Aeromonas* en/of eventuele andere nagroei problemen. In 2015 start daarom binnen de TG Biologische Activiteit een BTO-project waarin de BPP-parameters van een twintigtal reinwatertypen worden bepaald, zodat eventuele aandachtswaarden statistisch onderbouwd kunnen worden afgeleid.

4 Effect ent

4.1 Introductie

Tijdens de ontwikkeling van de BPP-test is ook onderzoek gedaan naar het toevoegen van rivierwater als ent in de BPP-bepaling (van der Kooij & Veenendaal, 2014). De hypothese hierbij was dat door een ent van bacteriën uit rivierwater toe te voegen, de groei in het te onderzoeken water niet wordt beperkt door een te beperkte diversiteit van verschillende soorten micro-organismen.

De resultaten van het toevoegen van een rivierwaterent aan verschillende watertypen liet zien dat in de meeste gevallen het toevoegen van een rivierwaterent niet leidde tot verhoogde BP_7 - en/of BPC_{14} -waarden (van der Kooij & Veenendaal, 2014). Daarnaast liet het onderzoek zien dat in sommige gevallen gepasteuriseerd drinkwater met rivierwaterent een lagere BP_7 en BPC_{14} vertoonde dan ongepasteuriseerd drinkwater. Deze laatste resultaten tonen aan dat de van nature aanwezige micro-organismen in drinkwater beter in staat zijn om de afbreekbare verbindingen in het drinkwater om te zetten, dan de micro-organismen die aanwezig zijn in rivierwater. Op basis van deze onderzoeksresultaten lijkt het dus niet nodig om een rivierwaterent aan het te onderzoeken water toe te voegen. Onderzoek aan drinkwater bemonsterd direct na chloordioxidosedering in de zuivering toonde echter aan dat het toevoegen van een actief koolfilteraat (AKF)-ent naast een rivierwaterent tot hogere BP_7 - en BPC_{14} -waarden leidden. De reden hiervoor zou kunnen zijn dat chloordioxide de van nature aanwezige micro-organismen in het water heeft afgedood en dat de bacteriën in rivierwater onvoldoende zijn aangepast om in het oligotrofe drinkwater te groeien. Bacteriën in het AKF zijn wel aangepast aan deze condities, waardoor na toevoeging van een AKF-ent meer groei optrad. Op basis van deze resultaten lijkt het dus aanbevelingswaardig om in sommige watertypen wel een AKF-ent toe te voegen.

Het onderzoek van destijds heeft echter niet achterhaald wanneer het toevoegen van een rivierwaterent en/of AKF-ent in de BPP-test nodig is. Om de BPP-test verder te standaardiseren is het belangrijk om te weten of een inoculum moet worden toegevoegd aan de te onderzoeken watermonsters. Daarom is in het onderzoek beschreven in dit rapport achterhaald in hoeverre rivierwaterent, AKF-ent of beide de BP_7 en BPC_{14} beïnvloeden van het reinwater van de productielocaties Amersfoortseweg, Nuland, Andijk en het water na ozonisatie bij productielocatie Weesperkarspel. Er is voor deze watertypen gekozen om zowel drinkwater bereid uit grondwater en oppervlaktewater te onderzoeken. Daarnaast is het reinwater van ps Amersfoortseweg een voorbeeld van een drinkwater dat is bereid uit grondwater en dat een zeer lage microbiologische groeipotentie heeft, terwijl het reinwater van ps Nuland een voorbeeld is van een drinkwater dat is bereid uit grondwater en een relatief hoge microbiologische groeipotentie heeft. Het reinwater van ps Andijk is een voorbeeld van een drinkwater dat kort daarvoor is behandeld met chloordioxide, terwijl het water na ozonisatie bij ps Weesperkarspel een voorbeeld is van een water dat kort daarvoor is behandeld met ozon.

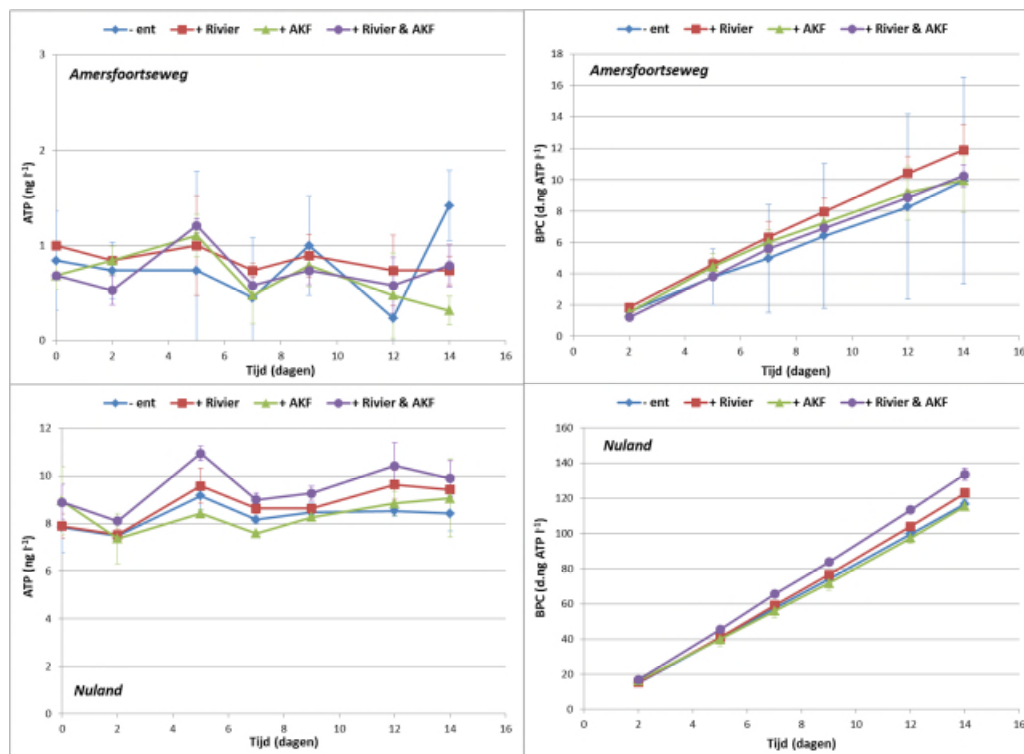
4.2 Materiaal en methode

Het reinwater van de productielocaties Amersfoortseweg, Nuland en Andijk en het water na ozonisatie in de zuivering van productielocatie Weesperkarspel werd

bemonsterd in AOC-kolven, die vrij zijn van organische stoffen. Aan iedere AOC-kolf werd 600 ml water toegevoegd. Vervolgens werd 0,6 ml van een fosfaat/nitraatoplossing ($1,5 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ en $6,0 \text{ g KNO}_3$) aan iedere kolf met 600 ml water toegevoegd, zodat fosfor en stikstof niet limiterend zijn voor de groei van de bacteriën in de BPP-test. Per watertype werd vervolgens in duplo (i) geen ent, (ii) een rivierwaterent (1 ml $1,2 \mu\text{m}$ gefilterd water van het Lekkanaal bij Nieuwegein), (iii) een AKF-ent (5 ml van het AKF van ps Weesperkarspel) en (iv) een combinatie van een rivierwater- en AKF-ent toegevoegd. De kolven werden vervolgens geïncubeerd bij 25°C en op dag 0, 2, 5, 7, 9, 12 en 14 werden monsters genomen om het ATP-gehalte te bepalen volgens NEN-EN 16421:2014. Deze ATP-concentraties zijn vervolgens gebruikt om de maximale ATP-concentratie in de eerste zeven dagen (BP_7) en de cumulatieve ATP-concentratie na 14 dagen incubatie (BPC_{14}) te bepalen.

4.3 Resultaten

Het verloop van de ATP-concentratie en de cumulatieve ATP-concentratie (BPC) gedurende de 14 dagen incubatieperiode voor de verschillende watertypen met en zonder ent zijn weergegeven in Figuur 4.1 en 4.2.



Figuur 4.1 De groeicurven en BPC toename in de BPP-testen met het reinwater van ps Amersfoortseweg en ps Nuland waaraan geen ent (- ent), een rivierwaterent (+ Rivier), een AKF-ent (+ AKF) en een rivierwater- en AKF-ent (+ Rivier & AKF) werd toegevoegd.

De ATP-concentratie in het reinwater van ps Amersfoortseweg met of zonder ent verliep vergelijkbaar (Figuur 4.1). Het verloop van de cumulatieve ATP-concentratie was echter iets hoger in het reinwater met rivierwaterent dan zonder of met de andere enten, maar ook dit verschil was klein. Het toevoegen van een ent had ook geen effect op de BP_7 en BPC_{14} van het reinwater van ps Amersfoortseweg (Tabel 4.1 en 4.2).

Tabel 4.1 Gemiddelde BP_7 waarden in $ng\ ATP\ l^{-1} \pm$ standaarddeviatie voor de BPP test van vier watertypen waarbij geen ent (- ent, een rivierwaterent (+ Rivier), een AKF-ent (+ AKF) of een rivierwater- en AKF-ent (+ Rivier & AKF) werd toegevoegd.

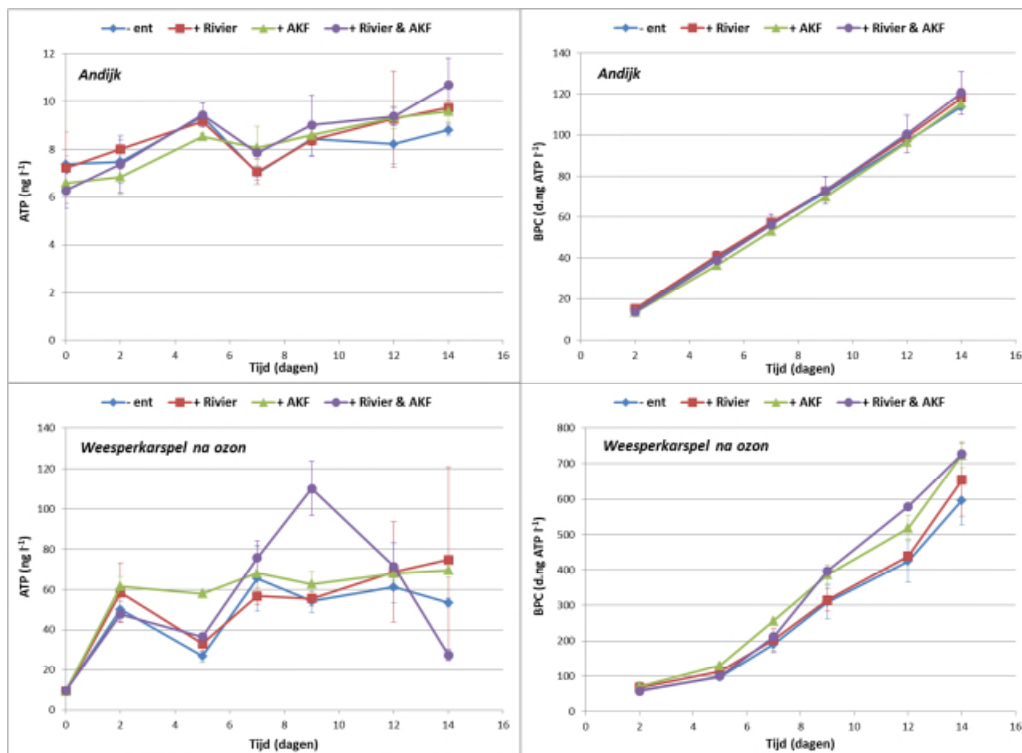
Locatie	Type water	- ent	+ Rivier	+ AKF	+ Rivier & AKF
Amersfoortseweg	Reinwater	$0,7 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
Nuland	Reinwater	$9,2 \pm 0,6$	$9,6 \pm 0,7$	$8,4 \pm 0,1$	$10,9 \pm 0,3$
Andijk	Reinwater	$9,4 \pm 0,1$	$9,2 \pm 0,0$	$8,5 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,5$
Weesperkarspel	Water na ozon	$65,4 \pm 16,2$	$58,4 \pm 15,0$	$68,1 \pm 13,1$	$75,7 \pm 8,3$

De groeicurves van de BPP-testen met het reinwater van ps Nuland en verschillende enten laten kleine verschillen zien. De ATP-concentratie van het water met rivierwater- en AKF-ent was over de gehele incubatieperiode van 14 dagen hoger dan de ATP-concentraties van de andere monsters. Doordat de ATP-concentratie in het watermonster met rivierwater- en AKF-ent gedurende de incubatieperiode hoger was dan in de andere monsters, was ook de BPC van dit watermonster over de gehele periode hoger (Figuur 4.1). De groeicurven en de BPC-waarden van de overige drie monsters waren echter vergelijkbaar. De BP_7 en BPC_{14} van het reinwater van ps Nuland waaraan rivierwater- en AKF-ent aan werd toegevoegd, waren ook hoger dan de BP_7 en BPC_{14} van de reinwatermonsters waar geen ent of waar rivierwater of AKF afzonderlijk werden toegevoegd (Tabel 4.1 en 4.2). De BP_7 en BPC_{14} van de reinwatermonsters waar geen ent, een rivierwaterent of een AKF-ent aan werden toegevoegd, waren vergelijkbaar.

De groeicurves en het verloop van de BPC in het reinwater van ps Andijk werd niet beïnvloed door het toevoegen van een rivierwaterent, een AKF-ent of een combinatie van beiden (Figuur 4.2). De verschillen tussen de BP_7 - en BPC_{14} -waarden in het reinwater van ps Andijk zonder of met ent(en) waren klein en vielen binnen de spreiding van de getallen (Tabel 4.1 en 4.2). Uit deze resultaten volgt dus dat het toevoegen van een ent aan het reinwater van ps Andijk niet leidt tot andere waarden voor de BPP-parameters dan wanneer er geen ent werd toegevoegd.

Tabel 4.2 Gemiddelde BPC_{14} waarden in $d.ng\ ATP\ l^{-1} \pm$ standaarddeviatie voor de BPP test van vier watertypen waarbij geen ent (- ent, een rivierwaterent (+ Rivier), een AKF-ent (+ AKF) of een rivierwater- en AKF-ent (+ Rivier & AKF) werd toegevoegd.

Locatie	Type water	- ent	+ Rivier	+ AKF	+ Rivier & AKF
Amersfoortseweg	Reinwater	$9,9 \pm 6,6$	$11,9 \pm 1,6$	$10,0 \pm 2,0$	$10,3 \pm 0,7$
Nuland	Reinwater	$117 \pm 2,6$	$123 \pm 1,6$	$115 \pm 1,0$	$134 \pm 3,3$
Andijk	Reinwater	$114 \pm 1,7$	$118 \pm 4,6$	$115 \pm 1,0$	$121 \pm 10,5$
Weesperkarspel	Water na ozon	$596 \pm 68,8$	655 ± 103	$724 \pm 37,1$	$727 \pm 9,6$



Figuur 4.2 De groeicurven en BPC toename in de BPP-testen met het reinwater van ps Andijk en het water na ozonisatie bij ps Weesperkarspel waaraan geen ent (- ent), een rivierwaterent (+ Rivier), een AKF-ent (+ AKF) en een rivierwater- en AKF-ent (+ Rivier & AKF) werd toegevoegd.

De groeicurves en het verlopen van de BPC in het water na ozonisatie bij Weesperkarspel werden wel beïnvloed door het toevoegen van een bepaalde ent. In het water zonder toevoeging van een ent werd op dag 2 een piek gezien in de groeicurve, waarna de ATP-concentratie op dag 5 weer lager lag. Vervolgens nam de ATP-concentratie op dag 7 weer toe en van dag 7 tot en met 14 bleef de ATP-concentratie ongeveer gelijk. Een zelfde soort groeicurve werd waargenomen in het water waaraan een rivierwaterent was toegevoegd, dus deze rivierwaterent lijkt geen invloed te hebben op de uitkomsten van de BPP-test. In het water waaraan een AKF-ent werd toegevoegd, nam de ATP-concentratie na dag 2 niet af en bleef de ATP-concentratie van dag 2 tot en met 14 onveranderd hoog. Wanneer naast een AKF-ent ook een rivierwaterent werd toegevoegd, was het ATP-verloop in de groeicurve ook anders. Na dag 2 werd wel een ATP-afname waargenomen die vergelijkbaar was met het water zonder ent, maar van dag 5 tot en met 9 nam de ATP-concentratie sterk toe en op dag 9 was de ATP-concentratie beduidend hoger dan bij de andere monsters. Na deze piek op dag 9 nam de ATP-concentratie ook weer sterk af tot dag 14 en op dag 14 was de ATP-concentratie beduidend lager dan bij de andere monsters. De BP_7 -waarden van de watermonsters zonder ent, met rivierwaterent, met AKF-ent en met een combinatie van rivierwater- en AKF-ent verschilden onderling van elkaar (Tabel 4.1), maar deze verschillen vallen binnen de spreiding van de getallen. De BPC_{14} -waarden van het water waaraan een AKF-ent werd toegevoegd, waren beduidend hoger dan de BPC_{14} -waarden waaraan deze ent niet werd toegevoegd (Tabel 4.2). Dit duidt erop dat het toevoegen van een AKF-ent aan het water na ozonisatie tot meer actieve biomassa leidt.

Samengevat had het toevoegen van een rivierwaterent en/of AKF-ent aan de BPP-test van vier watertypen weinig effect op de BPP-parameters BP_7 en BPC_{14} . Alleen in het

reinwater van ps Nuland waar een rivierwater- en AKF-ent werd toegevoegd en in het water na ozonisatie bij ps Weesperkarspel waar een AKF-ent (met of zonder rivierwaterent) werd toegevoegd, waren de BP_7 - (Nuland) en BPC_{14} - (Nuland en Weesperkarspel) waarden hoger dan in hetzelfde water zonder ent.

4.4 Discussie

Het toevoegen van een rivierwaterent en/of AKF-ent aan de BPP-test had over het algemeen niet veel invloed op de BP_7 en BPC_{14} -waarden in de onderzochte drinkwatermonsters. In een eerder project werd ook gevonden dat het toevoegen van een rivierwaterent weinig invloed had op de uitkomsten van de BPP-test (van der Kooij & Veenendaal, 2014). In die studie werd echter wel waargenomen dat wanneer geen ent of een rivierwaterent werd toegevoegd aan water dat met een lage concentratie chloordioxide is behandeld, de BPP achter bleef dan wanneer een AKF-ent werd toegevoegd. In een andere studie werd een AKF-ent toegevoegd aan het chloordioxide behandelde water van ps Andijk nadat de BPP-test al 37 dagen liep. De toevoeging van deze AKF-ent resulteerde in een sterke toename van het ATP-gehalte na dag 37 (van 9 naar 28 ng ATP l⁻¹) (van der Kooij et al., 2010). In de hier beschreven studie is het effect van het direct toevoegen (bij start van de BPP-test) van een rivierwaterent en/of AKF-ent op het chloordioxide behandelde drinkwater onderzocht. De resultaten lieten zien dat het toedienen van deze enten geen effect had op de uitkomsten van de BPP-test met dit watertype. In de experimenten werd echter een AKF-ent van ps Weesperkarspel gebruikt en het is mogelijk dat de bacteriën in dit AKF minder goed zijn aangepast aan de condities in het drinkwater van ps Andijk, dan wanneer een AKF-ent van ps Andijk was gebruikt.

In de hier beschreven studie werd een effect van toedienen van een ent wel waargenomen voor het ozonbehandelde water van ps Weesperkarspel. Hierbij werd waargenomen dat het enten met rivierwater geen invloed had op de uitkomsten van de BPP-test, maar dat het enten met AKF (afzonderlijk of samen rivierwaterent) resulteerde in een hogere BPC_{14} -waarde. Het is te verwachten dat door ozonisatie een groot deel van de autochtone flora wordt afgedood, waardoor de diversiteit aan micro-organismen waarschijnlijk afneemt. Het is aannemelijk dat daardoor ook de metabolische diversiteit afneemt, waardoor bepaalde afbreekbare stoffen niet langer worden omgezet. Door het toedienen van een AKF-ent van dezelfde productielocatie (maar dus niet door het toedienen van een rivierwaterent) worden bacteriesoorten toegevoegd die in staat zijn om deze stoffen af te breken, waardoor de biomassa toeneemt. Aangezien het toedienen van een AKF-ent geen effect had op de BP_7 , gaat het waarschijnlijk om omzetting van moeilijk afbreekbare stoffen die in de tweede week van de BPP-test worden afgebroken.

Ook bij ps Nuland werd een effect van toedienen van een ent waargenomen, maar dit resultaat was minder eenduidig. Er werd namelijk een verhoogde BP_7 en BPC_{14} waargenomen wanneer zowel werd geënt met rivierwater en AKF. Dit duidt er op dat bacteriesoorten in rivierwater of AKF in staat waren om stoffen in het reinwater van ps Nuland af te breken, die niet door de autochtone flora werden afgebroken. In dat geval zouden echter ook verhoogde BP_7 - en BPC_{14} -waarden moeten worden waargenomen wanneer een rivierwater- of AKF-ent apart wordt toegevoegd, maar de afzonderlijke enten resulteerden niet in verhoogde BP_7 - en BPC_{14} -waarden. Hierdoor blijft het onduidelijk of de verhoogde BP_7 - en BPC_{14} -waarden in de BPP test met het reinwater van ps Nuland, waaraan een rivierwater- en AKF-ent werd toegevoegd, daadwerkelijk is veroorzaakt door de toegevoegde enten. Zo was bijvoorbeeld opvallend dat de ATP-concentratie bij aanvang van de BPP-test met rivierwater- en AKF-ent 1,1 ng ATP l⁻¹

hoger was dan bij de BPP-test met hetzelfde watertype zonder een ent. Gedurende de incubatietijd van 14 dagen bleef de ATP-concentratie van het monster met beide enten ook ongeveer $1,1 \text{ ng ATP l}^{-1}$ hoger dan in monster zonder een ent. Wanneer voor deze verhoging van $1,1 \text{ ng ATP l}^{-1}$ wordt gecorrigeerd, dan is de BP_7 $9,8 \pm 1,0 \text{ ng ATP l}^{-1}$ en de BPC_{14} $118,2 \pm 6,6 \text{ d.ng ATP l}^{-1}$ voor het reinwatermonster waaraan rivierwater- en AKF-ent werd toegevoegd. Deze BP_7 - en BPC_{14} -waarden vallen binnen de spreiding van de resultaten van de BPP-test met hetzelfde water zonder of met één ent. Het lijkt er dus op dat het verschil bij het reinwater van ps Nuland eerder is veroorzaakt door introductie van actieve biomassa op $t=0$, dan dat met toevoegen van een ent meer afbreekbare stoffen worden omgezet tot biomassa.

In deze en een vorige studie (van der Kooij & Veenendaal, 2014) werd gevonden dat het toedienen van een rivierwaterent geen invloed heeft op de resultaten van de BPP-test. Er wordt daarom aanbevolen om niet langer een rivierwaterent toe te voegen in de BPP-test. Het enten met AKF in de BPP-test heeft meestal ook geen invloed op de resultaten van de BPP-test, dus het is ook niet nodig om standaard een AKF-ent toe te voegen. Wanneer echter monsters worden ingezet met de BPP-test van water dat (kort) daarvoor is behandeld met een proces waarbij de autochtone microflora wordt geïnactiveerd of verwijderd, dan is het aan te bevelen om een ent toe te voegen van water uit dezelfde zuivering waar wel een autochtone flora aanwezig is. Bij voorkeur is dit (biologisch) AKF, maar het is te verwachten dat ook (biologisch) snelfiltraat of langzame zandfiltraat hiervoor kan worden gebruikt. Deze aanpak is dus nodig voor water dat (kort) daarvoor is behandeld met ozon, UV, H_2O_2 , UV/ H_2O_2 , chloor, chloordioxide, choramine, of filtratieprocessen waarbij bacteriën worden verwijderd (bv ultrafiltratie, nanofiltratie, RO).

Tot slot is het belangrijk om te benadrukken dat de ATP-methode een essentieel onderdeel uitmaakt van deze BPP-test. Er bestaan twee verschillende methodieken om het ATP-gehalte te bepalen: de 'flash'-reactie en de 'glow'-reactie. Een ringonderzoek heeft aangetoond dat de toegepaste methodiek van invloed kan zijn op de hoogte van de ATP-concentratie en daarmee dus de BP_7 en BPC_{14} kan beïnvloeden. Wanneer deze BPP-methode (met daaraan gekoppeld de opgebouwde database) wordt geïmplementeerd bij de drinkwaterlaboratoria, is het aanbevelingswaardig om het ATP-gehalte te bepalen zoals beschreven in het normalisatieprotocol NEN-EN 16421:2014. Wanneer een drinkwaterlaboratorium besluit om van dit protocol af te wijken, kunnen de BPP-gegevens alleen met de opgebouwde database worden vergeleken als is aangetoond dat het afwijkende protocol leidt tot dezelfde ATP-concentraties.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

De groeiopbrengst van de BPP-test met acetaatconcentraties variërend van 5 tot 20 µg acetaat-C I-1 is afhankelijk van het watertype. Tevens wordt een groeiopbrengst van 1,0 ng ATP/µg ac-C niet bereikt in de onderzochte watertypen (gedistribueerd drinkwater ps Tull en 't Waal en reinwater van pompstations Amersfoortseweg, Nuland en Weesperkarspel). Het is daarom niet mogelijk om de AOC-concentratie in drinkwater betrouwbaar te berekenen uit de resultaten van de BPP-test met behulp van een vaste waarde voor de groeiopbrengst.

De hoeveelheid biomassa die wordt gevormd lijkt gerelateerd aan eventuele nagroeiproblemen in het distributiesysteem. Een methode die in staat is om de biomassaproductiepotentie van drinkwater te achterhalen is daarmee betrouwbaar als indicator voor eventuele nagroeiproblemen. De mate van groeiopbrengst per µg substraat van het watertype lijkt een minder belangrijke rol te spelen in relatie tot nagroeiproblemen in het distributiesysteem. Het is dus aannemelijk dat de resultaten van een BPP-test van (drink)water (zonder toevoeging van substraten) kunnen worden gerelateerd aan eventuele nagroeiproblemen, ongeacht de groeiopbrengst van micro-organismen op toegevoegd acetaat in het watertype.

Het toepassen van theoretische niet gevalideerde groeiopbrengsten om de AOC-concentratie te berekenen uit de troebelheid (AOC-methode volgens Werner & Hamsch, 1986) of het aantal cellen (AOC-methode volgens Hammes & Egli, 2005) kan tot onbetrouwbare AOC-concentraties leiden.

Doordat standaarden en/of ijklijnmonsters ontbreken in de AOC-methode volgens Werner & Hamsch (1986) of Hammes & Egli (2005) is het niet mogelijk om te achterhalen in hoeverre een laboratorium in staat is om dergelijke groeipotentiemetingen van drinkwater (die erg gevoelig zijn voor contaminatie) betrouwbaar uit te voeren.

Het toevoegen van een rivierwaterent en/of een AKF-ent aan de BPP-test van drie watertypen (reinwater van pompstations Amersfoortseweg, Nuland en Andijk) heeft geen effect op de resultaten van de BPP-test. Het toevoegen van een AKF-ent aan ozonbehandeld water van ps Weesperkarspel resulteerde in hogere BP₇- en BPC₁₄-waarden dan van ozonbehandeld water zonder een AKF-ent, dus de groei in ozonbehandeld water van ps Weesperkarspel werd beperkt door het aantal aanwezige bacterie(soorten).

5.2 Aanbevelingen

Het is niet aan te raden en ook niet nodig om AOC-concentraties te berekenen uit de resultaten van de BPP-test van een watermonster. Het is aan te bevelen om de BP₇ en BPC₁₄ van de BPP-test van een watermonster te rapporteren en onderling te vergelijken.

Het is aanbevelingswaardig om alleen goed gevalideerde groeiopbrengsten toe te passen om de AOC-concentratie te berekenen uit biomassa en/of celaantallen uit groeiproeven. Wanneer uit validatie blijkt dat dergelijke groeiopbrengsten niet constant

zijn, is het raadzaam om biomassa- en/of celopbrengst niet om te rekenen naar AOC-concentraties.

Het is aan te bevelen om de BPP-test van het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal jaarlijks te valideren met bekende concentraties acetaat, zoals dat momenteel ook wordt gedaan op het KWR laboratorium voor de traditionele AOC-test. Daarnaast is het ook belangrijk om een controlemonster, waarvan de BP_7 - en BPC_{14} -waarden bekend zijn, mee te nemen in de BPP-test van één of meerdere watertypen.

Er wordt aanbevolen om niet langer standaard een rivierwaterent (of een ent van een ander water) toe te voegen aan de BPP test.

Het is wel aan te bevelen om bij watertypen die kort daarvoor zijn behandeld met een proces waarbij de autochtone microflora wordt geïnactiveerd of verwijderd, een ent toe te voegen van een watertype uit dezelfde zuivering, maar waar de autochtone microflora nog aanwezig is (bv water na AKF, langzame zandfiltratie of snelfiltratie).

Na het doorvoeren van de aanpassingen die hierboven zijn genoemd is het aan te bevelen om de BPP-test op grotere schaal te gaan toepassen om de groeipotentie van het drinkwater te bepalen. Voordat de BPP-test de AOC-methode kan gaan vervangen is het echter wel aan te bevelen om betrouwbare aandachtswaarden voor de BPP-parameters te definiëren. Binnen het BTO-programma van de themagroep Biologische Activiteit start in 2015 een project om dergelijke aandachtswaarden af te leiden.

Bij implementatie van deze BPP-methode bij de drinkwaterbedrijven is het essentieel dat het ATP-gehalte van de monsters worden bepaald volgens NEN-EN 16421:2014 . Indien wordt afgeweken van dit normalisatieprotocol kan dat de uitkomsten van de BP_7 en BPC_{14} beïnvloeden, waardoor dergelijke resultaten zich niet betrouwbaar laten vergelijken met de opgebouwde database en de nog te definiëren aandachtswaarden.

6 Referenties

Hammes, F.A. and Egli, T. (2005) New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. *Environmental Science & Technology* 39(3289), 3289-3294.

Hammes, F., Salhi, E., Koster, O., Kaiser, H.P., Egli, T. and von Gunten, U. (2006) Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. *Water Research* 40(12), 2275-2286.

Heijnen, J.J. and Van Dijken, J.P. (1992) In search of a thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 39(8), 833-858.

Hijnen, W.A.M and van der Wielen, P.W.J.J. (2014) Groeifactoren van *Aeromonas* in watersystemen. KWR 2014.052, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

Karl, D.M. (1980) Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 44(4), 739-796.

Peter-Varbanets, M., Margot, J., Traber, J. and Pronk, W. (2011) Mechanisms of membrane fouling during ultra-low pressure ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 377(1-2), 42-53.

Ramseier, M.K., Peter, A., Traber, J. and von Gunten, U. (2011) Formation of assimilable organic carbon during oxidation of natural waters with ozone, chlorine dioxide, chlorine, permanganate, and ferrate. *Water Research* 45(5), 2002-2010.

Ross, P.S., Hammes, F., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Hambsch, B. and Rietveld, L.C. (2013) A comparative study of three different assimilable organic carbon (AOC) methods: Results of a round-robin test. *Water Science and Technology: Water Supply* 13, 1024-1033.

Tempest, D.W. and Neijssel, O.M. (1984) The status of YATP and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. *Annual Review of Microbiology* 38, 459-486.

van der Wielen, P.W.J.J., Bakker, G., Atsma, A., Lut, M., Roeselers, G. and de Graaf, B. (2014) Bacterial regrowth in unchlorinated drinking water during distribution in the Netherlands cannot be determined with biomass, cell numbers or community composition. In preparation.

van der Kooij, D. and Veenendaal, H. (2014) Bepaling van de biomassa-productiepotentie (BPP) van drinkwater. BTO rapport 2014.038, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

Veldkamp, H. (1976) *Continuous culture in microbial physiology and ecology*, Meadowfield Press Ltd., Durham, Great Britain.