A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size and are scattered across the page, with some larger circles acting as hubs.

Bedrijfstakonderzoek
BTO 2020.037 | Augustus 2020

**Groei en overleving
van bacteriën van de
coligroep in de
snelfilters van ps.
Bergen in voorjaar
2020**

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in de snelfilters van ps. Bergen in voorjaar 2020

BTO 2020.037 | Augustus 2020

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

Opdrachtnummer

402045-135

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Bedrijfsonderzoek

Auteur

dr. ir. Nikki van Bel

Kwaliteitsborger

dr. Paul van der Wielen (gedelegeerde borger: dr. ir. Patrick Smeets)

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Bacteriën van de coligroep, snelfilter, snel zandfilter, nagroei, BTO, AMVD

Jaar van publicatie
2020

Meer informatie
dr. ir. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR

Augustus 2020 ©

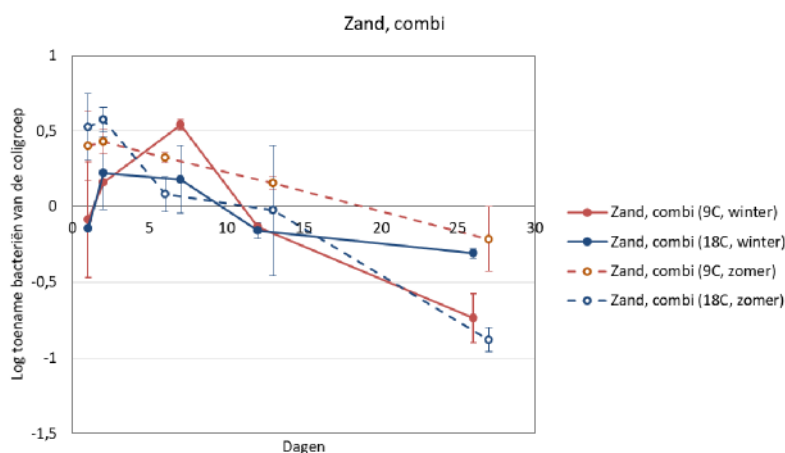
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Bacteriën van de coligroep kunnen groeien en overleven in snelfilters van ps. Bergen

Auteur(s) dr. ir. Nikki van Bel.

Bacteriën van de coligroep kunnen groeien en overleven in filtermateriaal en influent van de snelfilters van ps. Bergen, zo blijkt uit onderzoek naar de effecten van watertemperatuur, samenstelling van het filtermateriaal en van het influent. Groei van deze bacteriën in de snelfilters lijkt een robuust, maar beïnvloedbaar proces. Om deze groei af te remmen of de bacteriën zelf te verwijderen kan mogelijk het terugspoelregime worden geïntensiveerd of het filterbed geheel worden vervangen. Als dit inderdaad effectief is, zal het nieuwe spoelregime echter standaard moeten worden toegepast. Wanneer het oude, minder intensieve spoelregime wordt hervat, kunnen de bacteriën zich waarschijnlijk weer in het snelfilter gaan vestigen en groeien. Vervanging van het filterbed en/of intensiveren van het terugspoelregime kan praktisch echter lastig zijn. Daarom is het belangrijk om een integer winsysteem en stabiele bedrijfsvoering te hebben waarmee de nagroei waarschijnlijk beheerst, maar niet voorkomen, kan worden. Het aantreffen van bacteriën van de coligroep is een bedrijfstechnisch probleem. Overleving en groei van deze bacteriën in snelfilters maskeren een mogelijke besmetting van buitenaf en maakt ze niet meer goed bruikbaar als indicator voor microbiologische veiligheid van het water van dit deel van de zuivering.



Bacteriën van de coligroep kunnen groeien en langdurig overleven in water en op filtermateriaal van de snelfilters van ps. Bergen bij 9°C en 18°C

Belang: groei bacteriën van de coligroep in snelfilters als bedrijfstechnisch probleem

Bij pompstations Bergen en Mensink zijn sinds 2011 tussen mei en november bacteriën van de coligroep aanwezig in het filtraat van de snelfilters. De hoeveelheid bedraagt maximaal 100 kve/100 liter. Tot 2014 was de herkomst van deze bacteriën te herleiden tot het onttrokken duinfiltraat. Dankzij maatregelen is deze bron sinds 2015 nagenoeg uitgesloten, maar worden de bacteriën wel

aangetroffen in het filtraat van de snelfilters. Aanwezigheid van bacteriën van de coligroep is een bedrijfstechnisch probleem, omdat overleving en groei ervan in de snelfilters een mogelijke besmetting van buitenaf of een verandering in de microbiologische waterkwaliteit maskeren. Als gevolg hiervan zijn in dit deel van de zuivering deze bacteriën niet meer goed bruikbaar als indicator voor microbiologische veiligheid. Om maatregelen te

kunnen treffen moeten het mechanisme en de oorzaak van hun aanwezigheid worden achterhaald.

Aanpak: invloed watersamenstelling en temperatuur op bacteriegroei onderzoeken

Eerder onderzoek toont aan dat bacteriën van de coligroep minstens 27 dagen in snelfilters kunnen overleven en dat groei hoger is bij 18°C dan bij 9°C (BTO 2018.043). Naast de watertemperatuur kunnen verschillen in watersamenstelling van het onttrokken duininfilttraat tussen winter en zomer mogelijk effect hebben op de nagroei in het water en filtermateriaal van snelfilters, wat in dit project in ps. Bergen is onderzocht. Hiervoor is aan filtermateriaal en aan influent van de snelfilters van ps. Bergen een mix van vijf soorten bacteriën van de coligroep gedoseerd. Groei en overleving hiervan is gemonitord bij 9°C en 18°C; de minimale en maximale temperatuur van onttrokken duininfilttraat.

Resultaten: effecten temperatuur en watersamenstelling aangetoond

Uit bemonstering in de winter (dit rapport) en de zomer (BTO 2018.043) blijkt dat in filtermateriaal en in influent van de snelfilters van ps. Bergen bij respectievelijk 9°C en 18°C bacteriën van de coligroep kunnen groeien en overleven.

Bacteriegroei treedt alleen op in het filtermateriaal en niet of nauwelijks in het water. Het proces van groei, overleving en afsterving lijkt redelijk robuust dat zowel wordt beïnvloed door de temperatuur als door eventuele veranderingen in de waterkwaliteit van het onttrokken duininfilttraat.

Toepassing: integer winsysteem, intensiveren terugspoelregime, nieuw filtermateriaal snelfilters

De volgende mogelijk opties bestaan om groei van bacteriën van de coligroep in de snelfilters van ps. Bergen te remmen of de bacteriën te verwijderen:

- Verlagen van de hoeveelheid nutriënten of de temperatuur; deze zijn echter niet realistisch en haalbaar.

- Optimaliseren en intensiveren van terugspoelregime waardoor meer biomassa wordt uitgespoeld, inclusief de beoogde bacteriën. Het effect hiervan kan worden bepaald door de mate van uitspoeling in het terugspoelwater te meten. Het is echter onduidelijk of er mogelijkheden zijn voor het intensiveren van het terugspoelregime omdat dit vaak al op diverse parameters is geoptimaliseerd.
- Vervangen van filtermateriaal door schoon filtermateriaal zonder bacteriën van de coligroep. Omdat dit een rigoureuze, intensieve en kostbare operatie is, wordt aanbevolen om dit eerst te testen met bijvoorbeeld 2 of 3 snelfilters. Bij voorkeur wordt dit gecombineerd met intensivering van het terugspoelregime, zodat op langere termijn geen vergelijkbare problemen optreden.
- Zorgdragen voor een integer winsysteem en een stabiele bedrijfsvoering. Dit kan waarschijnlijk bijdragen aan het beheersen van de nagroei in de snelfilters, maar zal nagroei niet voorkomen

Bij het intensiveren van het terugspoelregime en vervangen van het filterbed moet worden voorkomen dat (enkele) bacteriën van de coligroep vanuit het onttrokken duininfilttraat de snelfilters opnieuw koloniseren en hierin gaan groeien.

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in de snelfilters van ps. Bergen in voorjaar 2020* (BTO-2020.037).

Voorgaand onderzoek is beschreven in het rapport *Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal uit ps. Bergen* (BTO 2018.043)

Inhoud

Rapport	2	
<i>Managementsamenvatting</i>	3	
Inhoud6		
1	Introductie	8
1.1	Aanleiding	8
1.2	Implicaties aantreffen bacteriën van de coligroep in snelfilters	8
1.3	Voorgaand onderzoek	8
1.4	Doel	9
2	Materiaal en methoden	10
2.1	Productielocatie Bergen	10
2.2	Filtermateriaal en water van snelfilters ps. Bergen	10
2.3	Bacteriën van de coligroep voor groei-experiment	11
2.4	Bepaling bacteriën van de coligroep	13
2.5	MALDI-TOF typering bacteriën van de coligroep	14
2.6	Bepalen samenstelling microbiële populatie	14
3	Resultaten	15
3.1	Groei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal	15
3.2	MALDI-TOF typering van bacteriën van de coligroep	20
3.3	Waterkwaliteit	20
4	Discussie	23
4.1	Dynamiek van aantallen bacteriën van de coligroep in groei-experiment	23
4.2	Invloed van bedrijfstechnische condities, waterkwaliteit en watersamenstelling op groei van bacteriën van de coligroep in snelfilters	23
4.3	Invloed van temperatuur op groei van bacteriën van de coligroep in snelfilters	24
4.4	Mogelijke aanpassingen in bedrijfsvoering	24
4.5	Samenstelling microbiële populatie	25
5	Conclusies en aanbevelingen	26
5.1	Conclusies	26
5.2	Aanbevelingen	26
6	Referenties	28

1 Introductie

1.1 Aanleiding

Sinds 2011 meet PWN op de pompstations Bergen en Mensink in het filtraat van de snelfilters in de periode mei-november bacteriën van de coligroep in grootvolume (100 L) monsters. Tot 2014 waren de aantallen in de snelfilters terug te leiden naar de aantallen die in het onttrokken duininfiltraat aanwezig waren. Na het treffen van een aantal maatregelen worden sinds 2015 nagenoeg geen bacteriën van de coligroep meer aangetroffen in het onttrokken duininfiltraat, maar treft men in het filtraat van de snelfilters in deze periode nog wel bacteriën van de coligroep aan. Het jaargemiddelde van de aantallen in het filtraat neemt zelfs toe (BTO 2018.043). De bacteriën worden vanaf mei-juni aangetroffen, de aantallen stijgen dan tot ongeveer 100 kve/100 liter in augustus-september, waarna de aantallen dalen totdat er in november-december geen bacteriën van de coligroep meer worden aangetroffen. Onderzoek van HWL heeft laten zien dat de bacteriën van de coligroep die worden gevonden in het filtraat van de snelfilters behoren tot diverse bacteriesoorten.

1.2 Implicaties aantreffen bacteriën van de coligroep in snelfilters

De bacteriën van de coligroep is een groep bacteriesoorten die aanwezig zijn in humane darmen/feces, maar zijn ook aanwezig in andere bronnen zoals plant- en of bodemmateriaal, en kunnen net als *E. coli* en enterococci nagroeien in het milieu (BTO 2016.107). Hierdoor is de rol van de bacteriën van de coligroep als fecale indicator minder eenduidig geworden en wordt deze in de Drinkwaterrichtlijn niet langer gebruikt als fecale indicator. Alleen *E. coli* en enterococci worden geïnterpreteerd als fecale indicatoren. De bacteriën van de coligroep worden tegenwoordig gebruikt als bedrijfstechnische parameter, indien deze bacteriën worden aangetroffen moet afgewogen worden of een gezondheidsrisico bestaat.

Het aantreffen van bacteriën van de coligroep in het filtraat van de snelfilters van PWN is daarom een bedrijfstechnisch probleem. Wanneer bacteriën van de coligroep in de snelfilters kunnen overleven en groeien, dan maskeren deze bacteriën een mogelijke besmetting van buitenaf. Het gebruik van bacteriën van de coligroep als indicator voor microbiologische veiligheid is in het water van dit deel van de zuivering dan niet meer goed bruikbaar. Daarom is het belangrijk om het mechanisme van de aanwezigheid van de bacteriën van de coligroep in de filtraat en van de snelfilters te begrijpen om van daaruit maatregelen te kunnen nemen om de bacteriën uit de snelfilters te verwijderen (door effectieve reinigingsmethoden) en/of te voorkomen dat ze langere tijd in de snelfilters kunnen verblijven of groeien.

1.3 Voorgaand onderzoek

In een eerder uitgevoerd groei-experiment (BTO 2018.043) is gebleken dat in filtermateriaal van de snelfilters van Bergen, bemonsterd in de nazomer van 2017, bacteriën van de coligroep minstens 27 dagen kunnen overleven en beperkt groeien. Verder bleek dat groei hoger is bij een watertemperatuur van 18°C dan bij 9°C. Naast de watertemperatuur kunnen verschillen in de watersamenstelling tussen de winter en zomer mogelijk ook de groei beïnvloeden van bacteriën van de coligroep in het water en filtermateriaal van de snelfilters.

Uit het voorgaande onderzoek bleek uit de MALDI-TOF analyses dat van de vijf gedoseerde bacteriesoorten voornamelijk *Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter freundii* groeiden in het experiment en daarmee vermoedelijk het gebruik van 'bacteriën van de coligroep' als bedrijfsparameter in de praktijk verstoren.

1.4 Doel

Doel van dit project is om na te gaan of verschillen in (de watersamenstelling van) het onttrokken duininfilttraat tussen de winter en zomer effect heeft op de nagroei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal van de snelfilters van ps. Bergen. Op basis hiervan wordt geadviseerd hoe de bacteriën te verwijderen zijn uit de filters of vóórkomen kan worden dat de bacteriën zich vestigen in de filters.

2 Materiaal en methoden

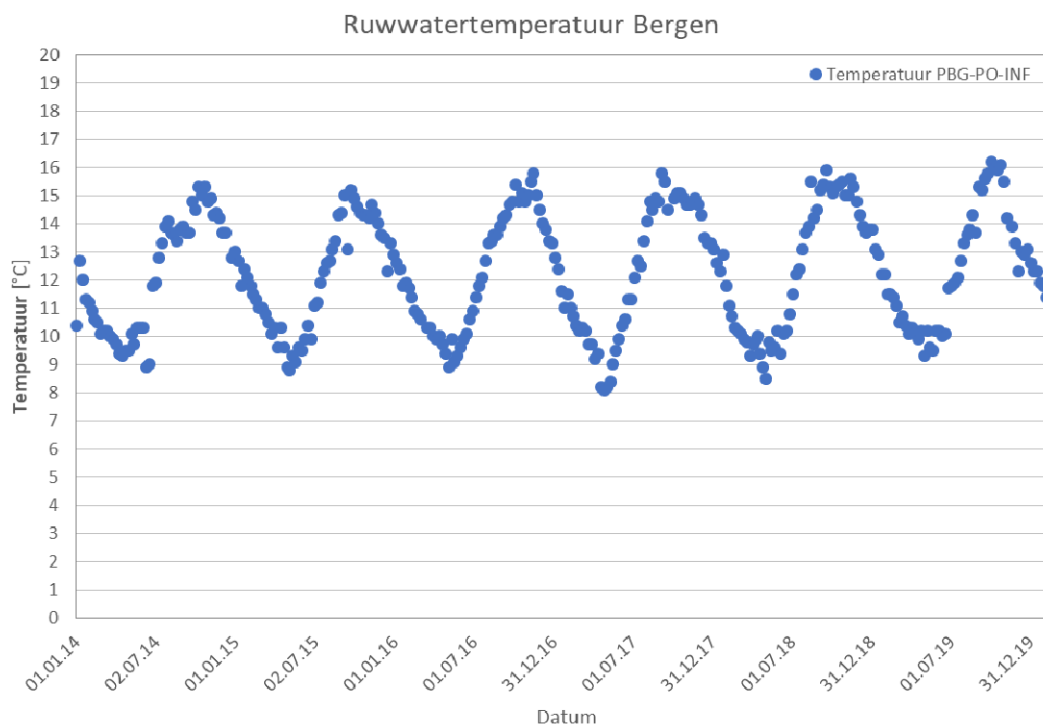
Het groei-experiment met bacteriën van de coligroep uit het eerdere onderzoek (BTO 2018.043) is herhaald onder dezelfde condities. Uitzondering is dat de bemonstering van filtermateriaal en influent van de snelfilters is uitgevoerd bij de laagste watertemperatuur van het onttrokken duininfilttraat in eind april 2020 (Figuur 1). De beschrijving hieronder komt nagenoeg overeen met het hoofdstuk 'materiaal en methoden' uit BTO 2018.043, maar is voor de duidelijkheid hier nogmaals beschreven.

2.1 Productielocatie Bergen

Voor de productie van drinkwater bij drinkwaterproductiebedrijf Bergen wordt water uit het IJsselmeer, bij Andijk, en uit het Lekkanaal, bij Nieuwegein gebruikt. Na een voorzuivering wordt het water getransporteerd naar productiebedrijf Heemskerk. Op productiebedrijf Heemskerk vindt nazuivering plaats met twee parallel uitgevoerde zuiveringen: ultrafiltratie/hyperfiltratie en UV/peroxide. Het met UV/peroxide behandelde water wordt geïnfiltreerd in de duinen. Het teruggewonnen infilttraat wordt op drinkwaterproductiebedrijf Bergen belucht (cascade), deeltjes worden verwijderd met snelfilters en er vindt UV-nadesinfectie plaats. Na opmenging met het met ultrafiltratie en hyperfiltratie behandelde water wordt het drinkwater gedistribueerd.

2.2 Filtermateriaal en water van snelfilters ps. Bergen

Het influent en filtermateriaal van de snelfilters van de productielocatie Bergen is bemonsterd door HWL en PWN op 28 april 2020, de periode met de laagste watertemperatuur van het onttrokken duininfilttraat (Figuur 1). De monsters zijn bewaard bij 4°C tot de start van de groei-experiment (één dag later). Het snelfilter is op 27 april 2020 om 8.00 uur voor het laatst op weerstand gespoeld. Voor deze datum heeft er een kleine hoeveelheid natuurlijk duinwater bijgestaan vanwege extra watervraag. Na de spoeling heeft er geen natuurlijk duinwater meer bijgestaan. Voor de bemonstering van het filtermateriaal is eerst het filter drooggezet en binnen 20 minuten zijn steekmonsters genomen. Het bemonsterde filtermateriaal bestaat uit ongeveer 90% zand en 10% bims, vergelijkbaar met de samenstelling van de snelfilters. Dit is een andere samenstelling vergeleken met het eerste experiment in oktober 2017 waarbij de verhouding ongeveer 65% - 35% was. Het lagere bims-gehalte is ontstaan door slijtage en uitspoeling van het materiaal, het bims is in deze periode niet bijgevuld. Bims is een puimsteenmateriaal en heeft een vergelijkbare functie als antraciet. Grovere deeltjes, b.v. ijzervlokjes die ontstaan tijdens cascadebeluchting, worden afgevangen in de bovenste laag van het snelfilter. Hierdoor verstopt de fijnere zandfractie in het snelfilter minder snel en wordt de looptijd van het filter verlengd.



Figuur 1. Ruwwatertemperatuur van de snelfilters in Bergen (PBG-PO-INF) in de periode 2014-2019.

In de periode voor de monsternamen was er sprake van een uitzonderlijke situatie in de bedrijfsvoering bij PWN. Als gevolg van de maatregelen rondom het coronavirus (SARS-CoV2) was het waterverbruik hoger dan in andere jaren. Tegelijkertijd was er een grote renovatie bij productielocatie Andijk. Hierdoor was de watervraag bij ps. Bergen in het voorjaar van 2020 hoger dan normaal en is in deze periode veel duinwater ingezet, in plaats van (alleen) het teruggewonnen infiltratiewater. Door deze veranderingen in de bedrijfsvoering op ps. Bergen was de samenstelling van het water zeer vermoedelijk anders dan normaal (o.a. nutriënten, NOM). Dit is ruim voor de monsternamen van filtermateriaal en influentwater, maar het is mogelijk dat de condities in de snelfilters, of de microbiologie in de snelfilters, hier nog niet helemaal van zijn hersteld. Het was echter niet mogelijk om de monsternamen verder richting de zomer te verplaatsen aangezien door de hogere watervraag in de zomer de kans groter is dat er (constant) extra duinwater moet worden ingezet.

Tegelijkertijd met de monsternamen is door HWL een grootvolumemonster van het influent water genomen en geanalyseerd op het aantal aanwezige bacteriën van de coligroep.

2.3 Bacteriën van de coligroep voor groei-experiment

In de zomer van 2017, in een periode met hoge aantallen bacteriën in het filtraat, heeft HWL vijf bacteriestammen van de coligroep geïsoleerd uit het filtraat van de snelfilters van ps. Bergen. Na typering met de MALDI-TOF zijn deze stammen op agarplaten verstuurd naar KWR en opgeslagen in de vriezer. De volgende bacteriestammen, op soortnaam gebracht met de MALDI-TOF, zijn gebruikt voor de groei-experimenten in het huidige en vorige onderzoek (BTO 2018.043):

- *Buttiauxella agrestis*
- *Raoultella terrigena*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Kosakonia radicincitans*
- *Citrobacter freundii*

Hierbij dient opgemerkt te worden dat de stammen *Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter freundii* een MALDI-TOF score > 2 hadden, wat een betrouwbaar testresultaat is. De andere drie stammen hadden echter een MALDI-TOF score lager dan 2, waardoor de betrouwbaarheid van de typering op soortsniveau voor deze drie stammen laag is.

Elke stam is in een eigen entfles opgekweekt zoals beschreven in KLMB-016, glucose en kaliumnitraat zijn gedoseerd als C- en N-bron. Vanuit de entflessen zijn de bacteriestammen vervolgens toegevoegd aan de groei-experimenten.

Van de bovenstaande bacteriesoorten worden *C. freundii*, *R. terrigena* en *K. oxytoca* beschouwd als een zeldzaam humaan of een opportunistisch pathogeen. Deze bacteriesoorten kunnen voorkomen in humane feces, maar ook in feces van dieren. Soms worden de bacteriën aangetroffen in klinische monsters (diarree, wond, sepsis of longaandoeningen), maar er is geen verband bekend met drinkwater als infectieroute. *B. agrestis* komt voornamelijk voor in oppervlaktewater en bodemonsters, maar niet of nauwelijks in humane feces en wordt als niet-pathogeen beschouwd. Over *K. radicincitans* is weinig informatie beschikbaar. Opzet groei-experiment

Het water en filtermateriaal van de snelfilters van ps. Bergen is geënt met de hierboven beschreven bacteriën van de coligroep stammen.

Alle condities zijn in tweevoud (A en B) uitgevoerd volgens het schema in Tabel 1.

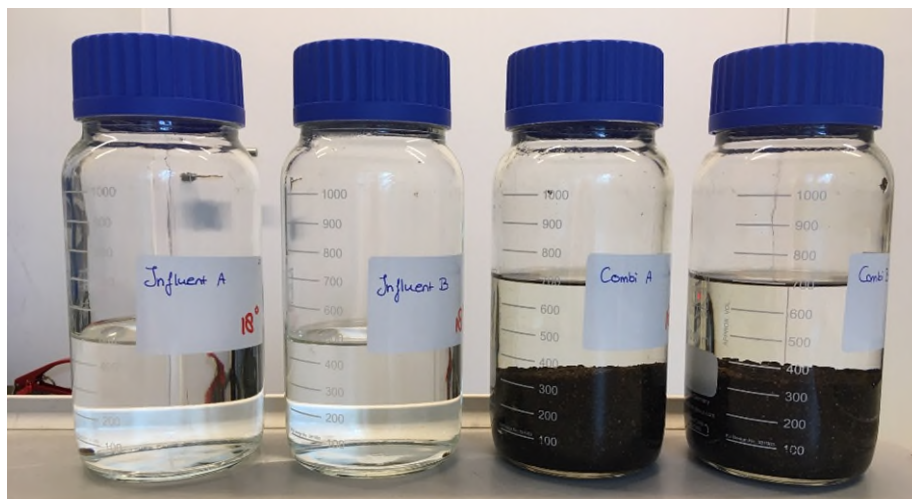
Tabel 1. *Conditie voor de groei-experimenten met bacteriën van de coligroep.*

	Water influent snelfilters	Filtermateriaal	Temperatuur
1	500 ml	-	9°C
2	500 ml	-	18°C
3	500 ml	500 gram	9°C
4	500 ml	500 gram	18°C

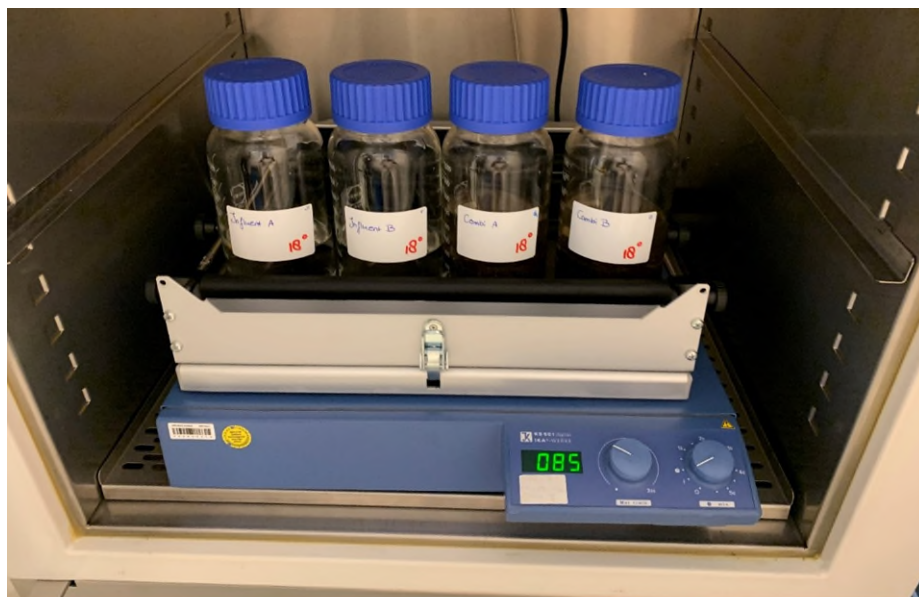
De vijf bacteriestammen zijn in gelijke verhoudingen gedoseerd aan het water (eindconcentratie: 1×10^3 kve/ml) en filtermateriaal. Het filtermateriaal van ps. Bergen is verdeeld in kleine porties van 80 gram en aangeënt met 5 ml bacteriesuspensie tot een eindconcentratie van 1×10^3 kve/gram materiaal. Dit mengsel is gehomogeniseerd door het gedurende 30 minuten te schudden op een schudplateau. Hierna zijn de porties samengevoegd, gemengd en verdeeld over de 1-liter flessen. Per fles is 500 gram filtermateriaal en 500 ml water gedoseerd (Tabel 1).

De flessen zijn gedurende 26 dagen geïncubeerd bij 9°C en 18°C en continu geschud bij 85 rpm op een schudplateau (Figuur 3). In het experiment worden twee processen nagebootst: in de eerste paar dagen zijn voldoende voedingsstoffen in de flessen aanwezig waarop de bacteriën, inclusief de bacteriën van de coligroep, kunnen groeien. Omdat er geen continue aanvoer van vers influent water is, zoals wel het geval is bij full-scale snelfilters, is de verwachting dat na enkele dagen de voedingsstoffen opgebruikt zijn. De daaropvolgende periode wordt dus vooral gekeken of en hoe lang de bacteriën van de coligroep in het water en filtermateriaal kunnen overleven.

Op dag 0, 1, 2, 7, 12 en 27 is het water en filtermateriaal bemonsterd. Voor bemonstering van het filtermateriaal is een theescheepje in de vorm van een cilinder gebruikt waarmee gemakkelijk het zand kan worden bemonsterd. Na elk monster is het theescheepje gespoeld in drinkwater en gesteriliseerd in een gasvlam. Na monsternamen is het filtermateriaal (10 gram) gemengd met 60 ml geautoclaveerd leidingwater en gedurende 2 minuten geschud om de bacteriën vrij te laten komen in het water.



Figuur 2. 1-liter flessen gevuld met water en filtermateriaal. Eén van de materialen, vermoedelijk bims, zakt langzaam uit en blijft langer in het water drijven.



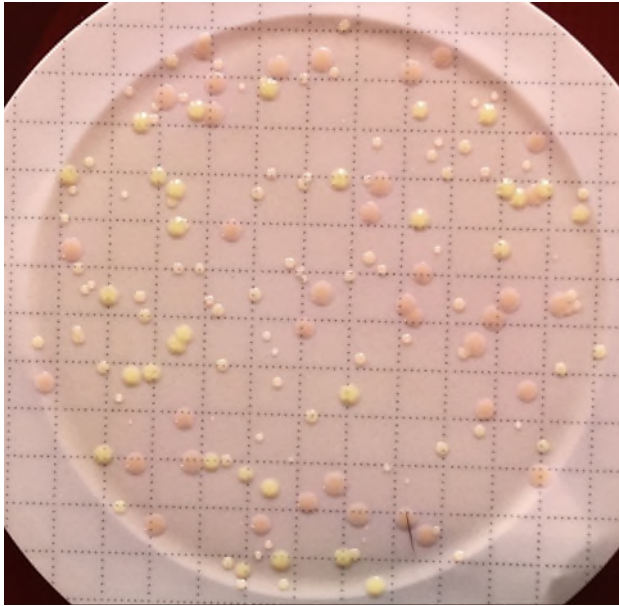
Figuur 3. 1-liter flessen met influentwater en filtermateriaal voor de groei-experimenten op een schudplateau in de broedstuf.

2.4 Bepaling bacteriën van de coligroep

Van het bovenstaande water in de 1-literflessen en het behandelde filtermateriaal is het aantal bacteriën van de coligroep bepaald met de kweekmethode volgens LMB-042, conform NEN-EN-ISO 9308-1. Hiervoor is het watermonster gespateld op LSA-platen en bij lage aantallen is het water gefiltreerd en is het filter op LSA-platen gelegd. Alle platen zijn geïncubeerd bij 36°C. In de norm staat vermeld dat alleen lactose-positieve kolonies, te zien aan de gele kleur van een kolonie, moeten worden rein gestreken om deze vervolgens te bevestigen met een oxidase bepaling. Bacteriën van de coligroep zijn oxidase-negatief in de bepaling. Kolonies die lactose-negatief zijn, of lactose- en oxidase-positief, worden volgens de NEN/ISO methode niet tot bacteriën van de coligroep gerekend.

De vijf bacteriestammen die aan het groei-experiment zijn gedoseerd, vormden echter niet allemaal lactose-positieve kolonies op LSA-platen (de niet-gele kolonies in Figuur 4). Deze kolonies waren echter wel allen oxidase-negatief in de bevestiging.

Vanwege de hoge aantallen bacteriën van de coligroep die zijn gedoseerd aan het groei-experiment, en een groot deel geen typische koloniemorfologie vertoont, is aangenomen dat alle kolonies die op de LSA-platen bacteriën van de coligroep zijn. Daarom zijn alle oxidase-negatieve kolonies, ongeacht of deze lactose-positief of negatief zijn, geteld.



Figuur 4. Typische en atypische koloniemorfologiën van de kolonies aangetroffen op LSA-platen direct na enting van de groei-experimenten met de stammen van de bacteriën van de coligroep.

2.5 MALDI-TOF typering bacteriën van de coligroep

Op dag 12 heeft HWL met MALDI-TOF een aantal kolonies op de LSA-platen getypeerd. Alle kolonies hadden een MALDI-TOF score boven de 2,0, een indicatie voor een betrouwbaar resultaat.

2.6 Bepalen samenstelling microbiële populatie

In het vorige project (BTO 2018.043) en huidige onderzoek zijn water- en filtermateriaalmonsters van de groei-experimenten opgeslagen om later de microbiële populatie te kunnen bepalen. Deze NGS analyse is in dit onderzoek nog niet uitgevoerd en kan in een eventueel vervolgproject alsnog worden uitgevoerd. De mogelijke meerwaarde hiervan wordt beschreven in de discussie.

3 Resultaten

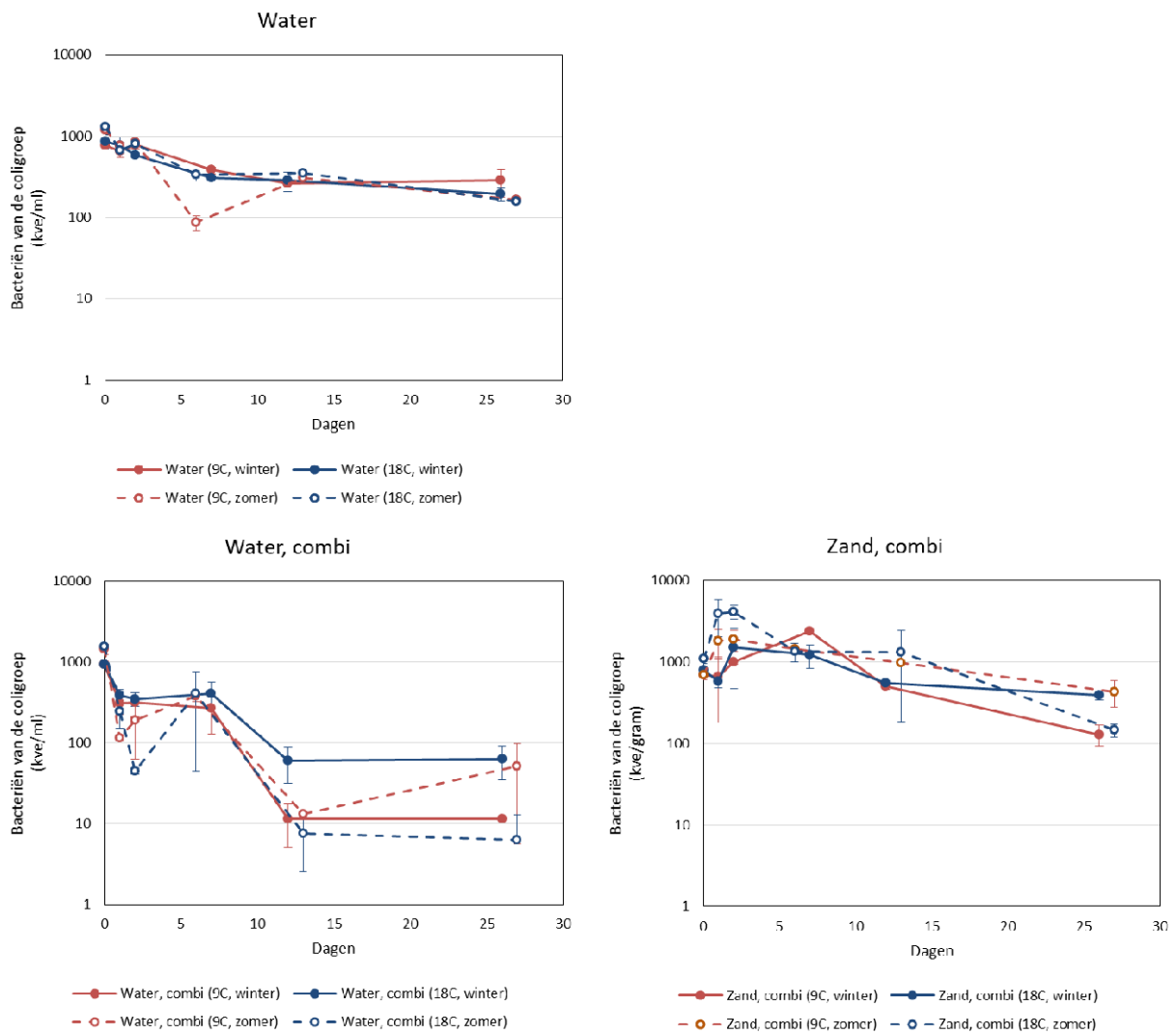
3.1 Groei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal

De groei-experimenten zijn uitgevoerd bij 9°C en 18°C in alleen water (Water, Figuur 5) en een mengsel van filtermateriaal en water ('combi'). In de combi zijn in het water en filtermateriaal afzonderlijk de aantallen van de bacteriën van de coligroep gemeten. Dit is vergelijkbaar met het voorgaande onderzoek (BTO 2018.043). In deze experimenten worden twee processen getest: groei van bacteriën van de coligroep bij aanwezigheid van voldoende voedingsstoffen en afsterving en overleving van deze bacteriën als gevolg van een te lage hoeveelheid nutriënten.

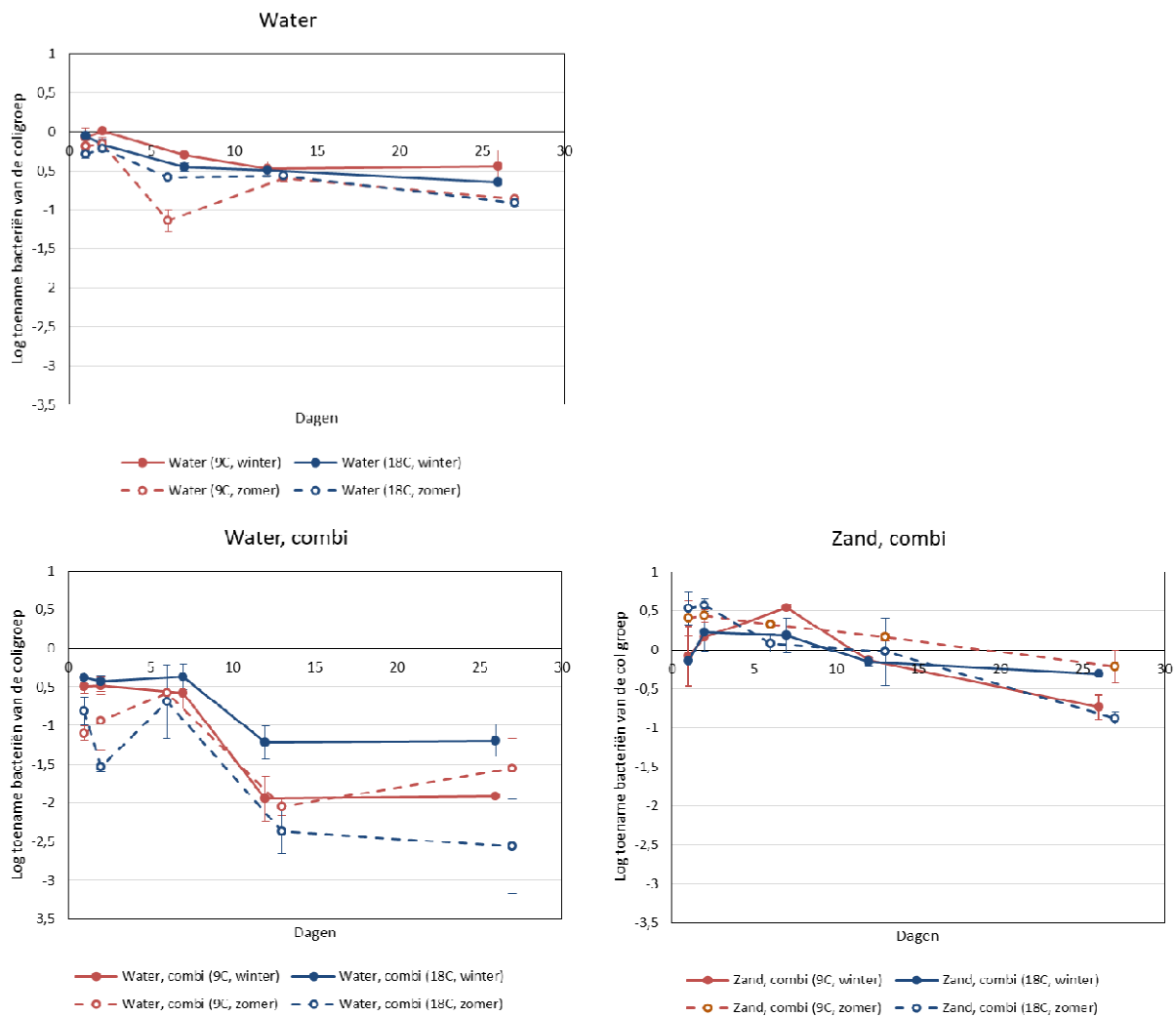
In de controlefles met alleen water ('water' in figuren en tabellen), bemonsterd in de winter, vindt bij 9°C en 18°C geen groei van bacteriën van de coligroep plaats, maar sterven de bacteriën langzaam af (Tabel 2, Figuur 5, Tabel 3). Het is mogelijk dat er wel beperkte groei plaats vindt, maar dat de afsterving sneller is waardoor er een netto afsterving is. Na 26 dagen zijn er nog vrij veel bacteriën van de coligroep aanwezig (gemiddeld 195 – 285 kve/ml; Tabel 2). Deze afsterving is zichtbaar bij beide temperaturen en is vergelijkbaar met de eerdere studie uitgevoerd in de zomer (BTO 2018.043). Vergelijking van de resultaten uit het eerdere 'zomer'-experiment en het huidige 'winter'-experiment, laat zien dat de watersamenstelling de groei, of afsterving, van bacteriën van de coligroep in water in meer of mindere mate beïnvloedt. Bij beide temperaturen sterven de bacteriën sneller af in het 'zomer'-experiment dan in het 'winter'-experiment (Figuur 6). De temperatuur beïnvloedt de groei vooral in het winterexperiment, bij 9°C is er wel beperkte groei zichtbaar maar niet bij 18°C. In het zomerexperiment lijkt de temperatuur geen invloed te hebben, al is de snelle afsterving op dag 6 opmerkelijk.

In de flessen met water en filtermateriaal ('combi' in figuren en tabellen) sterven de bacteriën van de coligroep in de waterfase ook af (Tabel 2, Figuur 5, Tabel 3). De afname is sterker dan in de hierboven beschreven controleflessen waarin alleen water aanwezig is. De laagste bacterieaantallen zijn gemeten op dag 26 (gemiddeld 12 kve/ml bij 9°C en gemiddeld 63 kve/ml bij 18°C; Tabel 2) en zijn lager dan de controleflessen waarin alleen water aanwezig is. Het verschil in mate van afsterving tussen de twee waterfasen komt overeen met de resultaten uit de eerdere 'zomer'-studie. Mogelijk gaat het hier niet alleen om afsterving maar zijn de bacteriën gehecht aan kleine deeltjes die gedurende het experiment (gedeeltelijk) bezinken en daarom niet in het water worden gemeten. De opzet van het huidige onderzoek kan hier echter geen uitsluitsel over geven. Vergelijking van de resultaten uit het 'zomer'- en 'winter'-experiment laat een duidelijk effect van watersamenstelling zien waarbij er meer groei optreedt in het 'zomer'-experiment tussen dag 2 en 6, al kan dit mogelijk veroorzaakt worden door (mogelijk te) lage aantallen op dag 2 (Figuur 5). De afsterving in het 'zomer'-experiment is bij 9°C vergelijkbaar met het 'winter'-experiment, maar bij 18°C is afsterving in het 'zomer'-experiment juist hoger.

In het filtermateriaal in de combi-flessen daalt de concentratie eerst tussen dag 0 en dag 1 waarna er beperkte groei optreedt tot dag 2 (18°C) of dag 7 (9°C). Hierbij wordt een maximum bereikt van gemiddeld 2400 (18°C) en 1507 (9°C) kve/gram (Tabel 2), waarna de bacteriën afsterven. De sterkste afsterving vindt vooral plaats direct in de periode na het maximum (Tabel 2, Figuur 5, Tabel 3). Aan het eind van het experiment zijn de aantallen lager dan bij de start (9°C: gemiddeld 130 kve/ml en 18°C: gemiddeld 389 kve/ml). In het zand is het grootste effect van verschillen in de temperatuur en watersamenstelling zichtbaar. In het 'zomer'-experiment is de groei vergelijkbaar tussen dag 0 en 1 voor beide temperaturen, maar is de afsterving sneller bij 18°C. In het 'winter'-experiment zijn zowel de groei als afsterving bij 9°C sterker dan bij 18°C. Daarnaast is er bij 18°C meer groei in de zomer dan in de winter en wordt bij 9°C in het 'winter'-experiment het maximum later bereikt dan in de zomer.



Figuur 5. Groei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal (zand) van de snelfilters van pompstation Bergen. Gegeven is het gemiddelde (N=2), met standaarddeviatie, van de resultaten van het onderzoek uitgevoerd in de zomer (rapport BTO 2018.043) en uitgevoerd in de winter (dit rapport).



Figuur 6. Log toename van bacteriën van de coligroep (t.o.v. dag 0) in water en filtermateriaal (zand) van de snelfilters van pompstation Bergen. Gegeven zijn de resultaten van het onderzoek uitgevoerd in de zomer (rapport BTO 2018.043) en uitgevoerd in de winter (dit rapport).

Tabel 2. Aantallen bacteriën van de coligroep in de groei-experimenten (kve/ml of kve/gram). De resultaten van het 'zomer'-experiment zijn afkomstig uit BTO 2018.043.

Dag	Water 9°C, winter		Water, combi 9°C, winter		Zand, combi 9°C, winter	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0	765	78	945	78	690	52
1	655	106	310	85	661	480
2	790	85	315	106	1002	68
7	385	35	270	141	2400	0
12	260	28	12	6	507	46
26	285	106	12	1	130	37

Dag	Water 18°C, winter		Water, combi 18°C, winter		Zand, combi 18°C, winter	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0	870	170	935	7	796	156
1	770	198	390	71	573	87
2	585	7	350	71	1507	1037
7	305	21	410	156	1228	385
12	285	78	60	28	551	42
26	195	35	63	28	389	49

Dag	Water 9°C, zomer		Water, combi 9°C, zomer		Zand, combi 9°C, zomer	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0	1200	141	1450	212	690	85
1	780	28	115	7	1800	707
2	845	49	190	127	1900	566
6	88	18	380	57	1450	71
13	305	7	13	1	984	23
27	165	7	52	46	433	157

Dag	Water 18°C, zomer		Water, combi 18°C, zomer		Zand, combi 18°C, zomer	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0	1300	141	1550	71	1100	0
1	670	14	245	92	3950	1909
2	805	177	45	4	4150	778
6	340	57	405	361	1350	354
13	350	14	8	5	1307	1121
27	160	0	6	7	147	26

Tabel 3. Log verandering in aantallen bacteriën van de coligroep bij ten opzichte van dag 0. De resultaten van het 'zomer'-experiment zijn afkomstig uit BTO 2018.043.

Dag	Water 9°C, winter		Water, combi 9°C, winter		Zand, combi 9°C, winter	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0						
1	-0,1	0,1	-0,5	0,1	-0,1	0,4
2	0,0	0,0	-0,5	0,1	0,2	0,0
7	-0,3	0,0	-0,6	0,2	0,5	0,0
12	-0,5	0,1	-2,0	0,3	-0,1	0,0
26	-0,4	0,2	-1,9	0,0	-0,7	0,2

Dag	Water 18°C, winter		Water, combi 18°C, winter		Zand, combi 18°C, winter	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0						
1	-0,1	0,0	-0,4	0,1	-0,1	0,0
2	-0,2	0,1	-0,4	0,1	0,2	0,2
7	-0,5	0,1	-0,4	0,2	0,2	0,2
12	-0,5	0,0	-1,2	0,2	-0,2	0,1
26	-0,6	0,0	-1,2	0,2	-0,3	0,0

Dag	Water 9°C, zomer		Water, combi 9°C, zomer		Zand, combi 9°C, zomer	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0						
1	-0,2	0,1	-1,1	0,1	0,4	0,2
2	-0,2	0,1	-0,9	0,4	0,4	0,1
6	-1,1	0,1	-0,6	0,0	0,3	0,0
13	-0,6	0,0	-2,0	0,1	0,2	0,0
27	-0,9	0,0	-1,6	0,4	-0,2	0,2

Dag	Water 18°C, zomer		Water, combi 18°C, zomer		Zand, combi 18°C, zomer	
	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD	gemiddeld	SD
0						
1	-0,3	0,1	-0,8	0,2	0,5	0,2
2	-0,2	0,0	-1,5	0,1	0,6	0,1
6	-0,6	0,0	-0,7	0,5	0,1	0,1
13	-0,6	0,0	-2,4	0,3	0,0	0,4
27	-0,9	0,0	-2,6	0,6	-0,9	0,1

3.2 MALDI-TOF typering van bacteriën van de coligroep

Op dag 12 zijn van het filtermateriaal uit de ‘combi’-flessen een aantal bacteriekolonies getypeerd met MALDI-TOF door HWL (Tabel 4). Een aantal bacteriën van de coligroep die zijn gedoseerd worden ook aangetroffen (*Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter freundii*), maar andere gedoseerde soorten zijn niet aangetroffen (*Raoultella terrigena*, *Klebsiella oxytoca*, *Kosakonia radicincitans*). Daarnaast zijn een aantal niet-gedoseerde bacteriesoorten wel vaker aangetroffen, met name *Aeromonas spp.* Aangezien *Aeromonas* geen onderdeel is van het monitoringsprogramma van het influent en filtraat van de snelfilters, is niet met zekerheid te zeggen of deze bacteriën aanwezig zijn in het influent en/of filtraat. Deze resultaten laten zien dat meerdere bacteriën kunnen groeien of overleven in het bovenstaande water en/of filtermateriaal.

In eerder onderzoek zijn *Raoultella terrigena*, *Klebsiella oxytoca* en *Kosakonia radicincitans* op één of meerdere dagen in de meeste flessen aangetroffen, maar de aantallen waren beperkt (BTO 2018.043). *Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter freundii* kwamen veel vaker en ook op nagenoeg alle dagen voor. Ondanks dat in de huidige studie slechts een kleine steekproef is uitgevoerd, waardoor niet alle aanwezige bacteriesoorten zijn gedetecteerd, komen de resultaten goed overeen met deze eerdere studie.

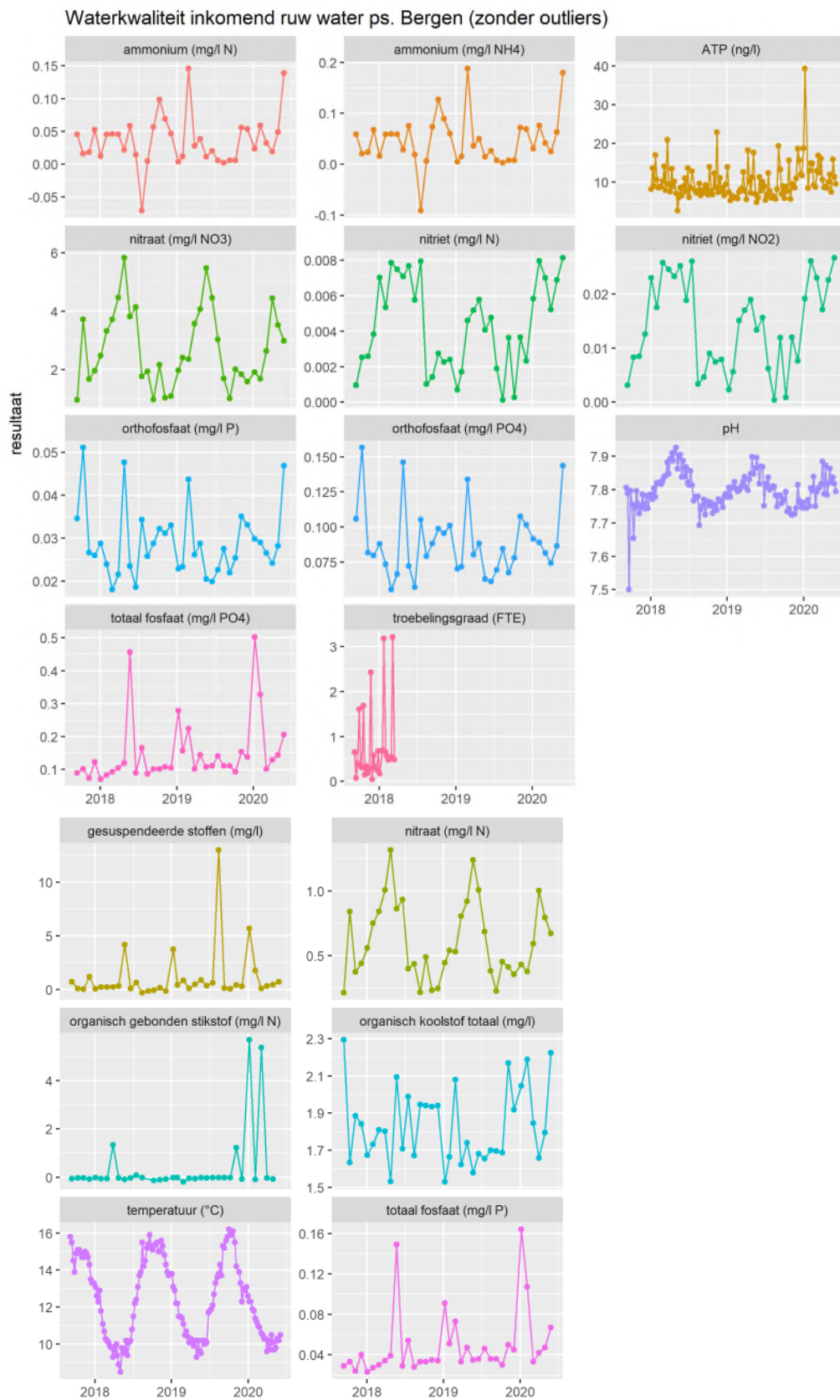
Tabel 4. MALDI-TOF typering van bacteriën van de coligroep in filtermateriaal van de combiflessen op dag 12. Aangegeven is of de aangetroffen bacteriesoorten gedoseerd zijn bij de start van het groei-experiment.

	Gedoseerd	Combi A, 9°C	Combi A, 18°C	Combi B, 9°C	Combi B, 18°C
<i>Aeromonas spp</i>	Nee	2	3	1	3
<i>Buttiauxella agrestis</i>	Ja	4	3	3	3
<i>Buttiauxella izardii</i>	Nee		1		
<i>Citrobacter freundii</i>	Ja	4	2	2	4
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Nee			2	
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	Nee		1		
<i>Pluralibacter pyrinus</i>	Nee			1	
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Nee			1	

3.3 Waterkwaliteit

HWL meet regelmatig verschillende waterkwaliteitsparameters van het ruwe inkomende water van ps. Bergen (monsterpunt: PBG-PO-INF). Na een beluchting over een cascade wordt het water over de snelfilters geleid. De metingen zijn dus niet direct uitgevoerd op het influent van de snelfilters, er is aangenomen dat de hier besproken parameters niet beïnvloed worden door beluchting. Aangezien op het influentwater van de snelfilters slechts zeer beperkt analyses worden uitgevoerd, zijn de gegevens van het inkomend ruw water gebruikt. De beluchting kan echter bijvoorbeeld de pH en organisch stof gehalte beïnvloeden door uitwisseling van CO₂ of CH₄ (methaan) in het ruw water (dat mogelijk aanwezig is) met de lucht.

Een aantal parameters zijn relatief stabiel gedurende de drie jaren en lijken geen seizoenafhankelijke invloed te vertonen (ATP, ammonium, organisch gebonden stikstof, gesuspendeerde stoffen en totaal fosfaat, Figuur 7). Voor de waterkwaliteitsparameters nitraat, nitriet, pH, orthofosfaat en temperatuur is een duidelijke variatie over het jaar zichtbaar. Het organisch koolstofgehalte varieert onregelmatig tussen 1,5 en 2,3 mg/l.



Figuur 7. Waterkwaliteitsparameters van het inkomend ruw water van pompstation Bergen (PBG-PO-INF) in de periode september 2017 – mei 2020.

De meeste metingen zijn maandelijks uitgevoerd, met uitzondering van temperatuur, pH, troebelingsgraad en ATP. In Tabel 4 is de gemiddelde waarde berekend van alle waterkwaliteitsparameters van een periode van twee maanden rondom het moment van monsternamen. Hieruit blijkt dat voor de meeste parameters de verschillen beperkt zijn tussen de twee perioden. Uitzondering zijn nitraat, nitriet, ammonium en fosfaat, deze zijn allen hoger in het voorjaar van 2020 vergeleken met najaar 2017 wat wordt veroorzaakt door seizoensinvloeden op het ruw water (IJsselmeerwater). De hoeveelheid nutriënten in de vorm van organisch koolstof is echter vergelijkbaar. Deze resultaten laten zien dat de waterkwaliteit beperkt varieert gedurende het jaar en dat de kwaliteit van het onttrokken infiltraat in oktober 2017 min of meer vergelijkbaar was met april 2020.

Tabel 5. Waterkwaliteit van ruw inkomend water van ps. Bergen (PBG-PO-INF). Gegeven is het gemiddelde van $n = 2 - 8$ van de genoemde periode. gg: geen gegevens beschikbaar. ND: niet gedetecteerd (onder detectielimiet)

	sep-okt 2017	apr-mei 2020
ammonium (mg/l N)	0,03	0,09
ammonium (mg/l NH ₄)	0,04	0,12
ATP (ng/l)	gg	10,33
gesuspendeerde stoffen (mg/l)	0,42	0,60
nitraat (mg/l N)	0,53	0,74
nitraat (mg/l NO ₃)	2,34	3,25
nitriet (mg/l N)	0,002	0,008
nitriet (mg/l NO ₂)	0,006	0,025
organisch gebonden stikstof (mg/l N)	ND	ND
organisch koolstof totaal (mg/l)	1,96	2,01
orthofosfaat (mg/l P)	0,04	0,038
orthofosfaat (mg/l PO ₄)	0,13	0,12
pH	7,73	7,83
temperatuur (°C)	14,9	10,1
totaal fosfaat (mg/l P)	0,03	0,06
totaal fosfaat (mg/l PO ₄)	0,095	0,18
troebelingsgraad (FTE)	0,62	gg

4 Discussie

4.1 Dynamiek van aantallen bacteriën van de coligroep in groei-experiment

Na de eerste twee tot zeven dagen neemt het aantal bacteriën van de coligroep niet verder toe in het filtermateriaal. De groei is beperkt tot ongeveer 0,5 log waarna waarschijnlijk alle beschikbare nutriënten zijn verbruikt en er niet voldoende nutriënten aanwezig zijn om verdere groei te ondersteunen (Figuur 5, Figuur 6). De gemeten toename is beperkt omdat een relatief hoge concentratie bacteriën van de coligroep is gedoseerd bij de start van het experiment zodat zowel groei als afsterving gemeten konden worden. Hierdoor was er echter minder ruimte beschikbaar om de maximaal mogelijke groei te bepalen aangezien dit niet het hoofddoel van dit onderzoek was.

De bacterieaantallen bacteriën van de coligroep en mate van afsterving verschillen tussen de waterfase in de 'water'-flessen en de waterfase in de 'combi'-flessen. Hiervoor zijn een aantal mogelijke verklaringen: i) de bacteriën van de coligroep migreren van het water naar het filtermateriaal, ii) in de combiflessen zijn meer deeltjes aanwezig waaraan de bacteriën van de coligroep in het water mogelijk kunnen binden. Door precipitatie of bezinking lijkt het alsof de bacteriën van de coligroep in het water in de 'combi'-flessen sneller afsterven, iii) het filtermateriaal, en/of de microbiële populatie in het filtermateriaal, beïnvloedt de condities (b.v. zuurstof, nutriënten) in de bovenstaande waterfase zodanig dat deze ongunstig worden voor overleving van bacteriën van de coligroep, of iv) door de aanwezigheid van het filtermateriaal zijn er meer micro-organismen, ongewervelde dieren en b.v. amoeben aanwezig die met de bacteriën van de coligroep concurren voor de aanwezige nutriënten of juist deze bacteriën opeet via predatie. Eventuele migratie van bacteriën tussen de waterfase en het filtermateriaal was niet zichtbaar, al is het mogelijk dat de migratie te beperkt is om te kunnen meten. In beide gevallen is de mogelijke migratie vanuit het water naar het filtermateriaal een zeer beperkte factor. Het meest waarschijnlijke is daarom dat de condities ongunstig zijn geworden voor overleving en groei in de waterfase van de combi-flessen. Welk mechanisme hier precies achter zit, kan met de huidige resultaten niet worden achterhaald.

4.2 Invloed van bedrijfstechnische condities, waterkwaliteit en watersamenstelling op groei van bacteriën van de coligroep in snelfilters

Het filtermateriaal dat in dit onderzoek is bemonsterd heeft een iets andere samenstelling dan het filtermateriaal uit het vorige onderzoek in 2017. Het percentage bims is gedaald van ongeveer 35% (2017) naar ongeveer 10% (2020). Daarnaast was door verschillende omstandigheden de bedrijfsvoering anders dan normaal en werd meer natuurlijk duinwater als influent water gebruikt. Het aandeel onttrokken duinfiltraat was echter nog steeds (veel) groter dan het aandeel natuurlijk duinwater. Uit de metingen van HWL blijkt dat dit geen duidelijk effect heeft gehad op de waterkwaliteit van het ruwe water.

De waterkwaliteit varieert beperkt en er lijkt geen verschil te zijn in de hoeveelheid van de meeste nutriënten, met name organisch koolstof, tussen de twee experimenten. De gebruikte parameters, b.v. totaal organisch koolstof, zijn echter grove parameters die een totaal overzicht geven van de waterkwaliteit. Aangezien de bron van het onttrokken duinfiltraat oppervlaktewater is (IJsselmeer) is het waarschijnlijk dat de samenstelling van organisch koolstof (humuszuren, biopolymeren, etc) varieert gedurende het jaar en seizoenafhankelijk is.

De temperatuur en verschillen in de samenstelling van het filtermateriaal (ratio bims : zand) en mogelijke, onbekende, variatie in de samenstelling van het organisch koolstof in het influentwater, beïnvloeden de groei, overleving en afsterving van bacteriën van de coligroep in meer of mindere mate. Op hoofdlijnen komen de resultaten van de huidige groeiproef overeen met de vorige groeiproef: bacteriën van de coligroep kunnen groeien in het filtermateriaal en lang overleven in het filtermateriaal en bovenstaande water. De bacteriën van de coligroep groeien alleen in het filtermateriaal en niet of nauwelijks in het water. Eventuele veranderingen in waterkwaliteit tussen de winter en zomer beïnvloedt de groei van de bacteriën van de coligroep. Er is vooral meer groei in het filtermateriaal bij 18°C, vergeleken met 9°C. Het effect van temperatuur op groei in (bovenstaand) water is echter niet eenduidig. Ondanks de variatie in het effect van temperatuur en watersamenstelling op groei, lijkt de nagroei van deze bacteriën in de snelfilters een robuust proces te zijn dat zowel beïnvloedt wordt door de temperatuur en door eventuele veranderingen in de waterkwaliteit zoals deze voorkomen in onttrokken duininfilttraat.

4.3 Invloed van temperatuur op groei van bacteriën van de coligroep in snelfilters

Uit het hier, en eerder beschreven onderzoek (BTO 2018.043), is gebleken dat de watertemperatuur van het influent van de snelfilters, of een onbekende en niet-gemeten factor die met het seizoen covarieert, de aantallen bacteriën van de coligroep in het filtraat van de snelfilters beïnvloedt. Het proces van nagroei van bacteriën van de coligroep lijkt door zowel de watertemperatuur als watersamenstelling beïnvloedt te worden. In de literatuur is het volgende bekend over de minimale en optimale groeitemperaturen van de verschillende bacteriesoorten behorend tot de bacteriën van de coligroep.

B. agrestis en *R. terrigena* kunnen in voedingsmedium, zonder competitie met andere bacteriesoorten, groeien bij lage temperaturen (respectievelijk 10°C en 4°C) (Park *et al.*, 2006 en Tantasuttikul *et al.*, 2019). De optimum temperatuur voor groei is echter hoger (20 – 37°C en 15 – 37°C). De minimum groeitemperatuur van deze bacteriesoorten als er ook andere bacteriën aanwezig zijn, en dus competieren voor de beschikbare nutriënten, is zeer waarschijnlijk hoger. Van de andere drie gedoseerde bacteriesoorten (*K. oxytoca*, *K. radicincitans* en *C. freundii*) is geen informatie beschikbaar over de minimale en optimale groeitemperatuur.

Dit laat zien dat onder optimale omstandigheden, in de aanwezigheid van voldoende nutriënten en zonder concurrerende micro-organismen, groei mogelijk is bij lage temperaturen maar dat bij hogere temperaturen meer groei optreedt. In de praktijk zal de groei van bacteriën van de coligroep in snelfilters bij lage temperaturen vermoedelijk minder goed zijn door de aanwezigheid van andere micro-organismen die beter aangepast zijn aan deze lage temperaturen en daardoor beter de beschikbare nutriënten kunnen gebruiken. Hierdoor is in de winter geen groei van bacteriën van de coligroep zichtbaar in de snelfilters. In het water en filtermateriaal zijn echter wel voldoende nutriënten aanwezig voor groei, wat blijkt uit de experimenten die zijn uitgevoerd bij 18°C waarbij groei optreedt.

4.4 Mogelijke aanpassingen in bedrijfsvoering

Er zijn weinig mogelijkheden om de groei van de bacteriën van de coligroep in de snelfilters van ps. Bergen te remmen of de bacteriën zelf te verwijderen. Theoretisch zijn er drie manieren: verlagen van de hoeveelheid nutriënten in het influent van de snelfilters, verlagen van de watertemperatuur of het optimaliseren van het terugspoelregime. De eerste twee opties (verlagen van de hoeveelheid nutriënten of de temperatuur) zijn niet realistisch en haalbaar. Door het terugspoelregime te optimaliseren en te intensiveren kan meer biomassa worden uitgespoeld inclusief de bacteriën van de coligroep.

Uit de metingen van HWL blijkt dat het aantal bacteriën van de coligroep in het filtraat van de snelfilters, in ieder geval t/m 2016, langzaam toenam gedurende meerdere jaren (BTO 2018.043). Door dit evenwicht te verstoren kan

deze toename worden omgezet in een langzame afname waardoor uiteindelijk de bacteriën van de coligroep niet meer aanwezig zijn in het snelfilter en filtraat. Het effect van vaker of rigoureuzer terugspoelen op het uitspoelen van bacteriën van de coligroep zou tijdelijk getest kunnen worden door bijvoorbeeld gedurende langere tijd het aantal van deze bacteriën in het filtraat en terugspoelwater te bepalen. De verwachting is dat het enkele maanden kan duren voordat de bacteriën van de coligroep geheel afwezig zijn. Als een optimalisatie van het spoelregime inderdaad effectief is, zal het nieuwe spoelregime echter wel de nieuwe standaard moeten worden. Indien weer wordt overgeschakeld naar het oude, minder intensieve, spoelregime is de verwachting dat langzaam maar zeker de bacteriën van de coligroep zich na vestiging in het snelfilter weer kunnen gaan vermenigvuldigen en uitspoelen in het filtraat. Door het intensiveren van het spoelregime wordt er meer terugspoelwater geproduceerd wat een probleem kan zijn voor de omgeving. Daarnaast zijn terugspoelregimes vaak al op meerdere parameters geoptimaliseerd, waardoor het mogelijk is dat verdere optimalisatie lastig en eventueel niet mogelijk is.

Een rigoureuzere optie is om het filtermateriaal van de snelfilters te vervangen met schoon filtermateriaal waarin geen bacteriën van de coligroep aanwezig zijn. Echter, deze filters moeten ingelopen worden voordat de juiste biomassa en microbiële populatie aanwezig is en de snelfilters geschikt zijn voor de drinkwaterproductie. Omdat dit een intensieve en kostbare operatie is, wordt aanbevolen om dit eerst voor bijvoorbeeld 2 of 3 snelfilters te testen en na te gaan of de snelfilters niet opnieuw gekoloniseerd worden door bacteriën van de coligroep. Het is hierbij belangrijk dat in het onttrokken duininfiltraat geen bacteriën van de coligroep meer aanwezig zijn om herkolonisatie van de snelfilters te voorkomen. Voor zover bekend zijn de bacteriën van de coligroep sinds enkele jaren afwezig in het onttrokken duininfiltraat. Een enkel event waarbij deze bacteriën toch in het water aanwezig zijn, kan echter genoeg zijn om de filters opnieuw te besmetten. In dit geval zou ook de hierboven beschreven intensivering van het terugspoelregime moeten worden overwogen.

Naast bovenstaande mogelijkheden is het belangrijk om een integer winsysteem te hebben en in stand te houden en om ervoor te zorgen dat de bedrijfsvoering stabiel is en blijft. Dit kan waarschijnlijk bijdragen aan het beheersen van de nagroei in de snelfilters, maar zal nagroei niet voorkomen.

4.5 Samenstelling microbiële populatie

Met NGS (Next Generation Sequencing) kan de samenstelling van de gehele microbiële populatie van het water en filtermateriaal van de groei-experimenten in kaart gebracht worden. Hiermee kan een uitspraak worden gedaan over welke bacteriestammen (zowel bacteriën van de coligroep als andere bacteriesoorten) meer voorkomen dan anderen en of deze mogelijk te herleiden zijn naar een eventuele bron. Dit kan mogelijk handvatten bieden om de bron aan te pakken of de condities in de snelfilters zo aan te passen dat groei en/of vestiging van bacteriën van de coligroep in de filters lastiger wordt. In de voorgaande studie is met MALDI-TOF informatie verkregen over een aantal soorten bacteriën van de coligroep die kunnen groeien in filtermateriaal. Met NGS zou dit uitgebreid kunnen worden naar andere bacteriesoorten.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Bacteriën van de coligroep kunnen groeien en overleven in filtermateriaal van de snelfilters van ps. Bergen. Afsterving verloopt langzaam en na 26 dagen zijn er nog grote aantallen bacteriën van de coligroep aanwezig in het filtermateriaal en bovenstaande water van de uitgevoerde experimenten.

Er zijn beperkte verschillen in de groei van bacteriën van de coligroep in filtermateriaal en influent water dat in de zomer (2017) of winter (2020) is bemonsterd. De temperatuur, maar ook de mogelijke variatie in samenstelling of kwaliteit van het influent water of filtermateriaal, beïnvloedt de nagroei van bacteriën van de coligroep in de snelfilters van ps. Bergen.

In de winter zijn er zeer vermoedelijk wel voldoende nutriënten aanwezig in het influent en/of filtermateriaal, maar door de lage temperatuur of andere factoren vindt er in de full-scale snelfilters van ps. Bergen geen nagroei plaats vindt.

Typering van bacteriekolonies bevestigt de resultaten uit de eerdere studie dat voornamelijk twee van de vijf gedoseerde bacteriestammen (*Buttiauxella agrestis*, *Citrobacter freundii*) kunnen groeien en overleven in de groeiproeven. De andere drie stammen (*Raoultella terrigena*, *Klebsiella oxytoca* en *Kosakonia radicincitans*) kunnen niet of nauwelijks groeien en overleven in het filtermateriaal en influentwater.

5.2 Aanbevelingen

Optimalisatie van de bedrijfsvoering door intensivering van het terugspoelregime lijkt de meest realistische maatregel die genomen kan worden om de populatie bacteriën van de coligroep die op het filtermateriaal is gevestigd kwijt te raken. Door het intensiveren van het terugspoelregime wordt meer biomassa, inclusief de bacteriën van de coligroep, verwijderd. Het effect hiervan op de aanwezigheid van de bacteriën van de coligroep in een full-scale kan worden bepaald door het uitspoelen van deze bacteriën in het terugspoelwater te meten. Het is echter onduidelijk of er mogelijkheden zijn voor het intensiveren van het terugspoelregime omdat dit vaak al op diverse parameters is geoptimaliseerd. En daarnaast wordt door het intensiveren van het spoelregime meer terugspoelwater geproduceerd wat een probleem kan zijn voor de omgeving.

Een rigoureuzere optie is om het filtermateriaal van de snelfilters te vervangen met schoon filtermateriaal waarin geen bacteriën van de coligroep aanwezig zijn. Omdat dit een intensieve en kostbare operatie is, wordt aanbevolen om dit eerst voor bijvoorbeeld 2 of 3 snelfilters te testen en na te gaan of de snelfilters niet opnieuw gekoloniseerd worden door bacteriën van de coligroep. Hierbij moet voorkomen worden dat bacteriën van de coligroep vanuit het onttrokken duininfilttraat worden aangevoerd en zich opnieuw in de snelfilters vestigen. Een enkel event waarbij deze bacteriën toch in het water aanwezig zijn, kan echter genoeg zijn om de filters opnieuw te besmetten. In dit geval zou ook de hierboven beschreven intensivering van het terugspoelregime moeten worden overwogen. Om kolonisatie door ongewenste bacteriesoorten te voorkomen zou bioaugmentatie toegepast kunnen worden, al is er nog niet genoeg informatie beschikbaar om dit direct in de praktijk toe te passen (BTO 2019.047).

Naast bovenstaande mogelijkheden is het belangrijk om een integer winsysteem te hebben en in stand te houden en om ervoor te zorgen dat de bedrijfsvoering stabiel is en blijft. Dit kan waarschijnlijk bijdragen aan het beheersen van de nagroei in de snelfilters, maar zal nagroei niet voorkomen.

Materiaal van de groeiproeven is bewaard om de samenstelling van de bacteriepopulatie in kaart te kunnen brengen. Hiermee wordt duidelijk welke bacteriesoorten wel of niet groeien in het water en filtermateriaal en kan mogelijk achterhaald worden of deze bacteriesoorten te herleiden zijn naar een specifieke bron. Dit biedt mogelijk aangrijpingspunten om de condities in de snelfilters zo aan te passen dat de bacteriën van de coligroep zich niet of minder goed kunnen vestigen en/of groeien in de snelfilters.

6 Referenties

BTO 2016.107. Groei en afsterving van *E. coli* bacteriën in duinzand en entzand.

BTO 2018.043. Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal uit ps. Bergen.

BTO 2019.047. Het belang van resilience in de drinkwatermicrobiologie.

Park J-W, Oh Y-S, Lim J-Y, Roh D-H. 2006. Isolation and characterization of cold-adapted strains producing B-Galactosidase. *The Journal of Microbiology*, volume 44, number 4, pp 396-402.

Tantasuttikul,A & Mahakarnchanakul W. 2019. Growth parameters and sanitizer resistance of *Raoultella ornithinolytica* and *Raoultella terrigena* isolated from seafood processing plant. *Cogent Food & Agriculture*, volume 5, issue 1.