

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 2021.072 | December 2021

**Invloed van vetzuren
en driewaardige
ijzerionen op de
microbiële populaties
in drinkwater en
biofilms.**

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Invloed van vetzuren en driewaardige ijzerionen op de microbiële populaties in drinkwater en biofilms.

BTO 2021.072 | December 2021

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

Opdrachtnummer

402045-102

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

Auteur

Kimberly Learbuch

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

hexamonitor, vetzuren

Jaar van publicatie
2021

Meer informatie

Kimberly Learbuch MSc.
T 030-6069599
E kimberly.learbuch@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



December 2021 ©

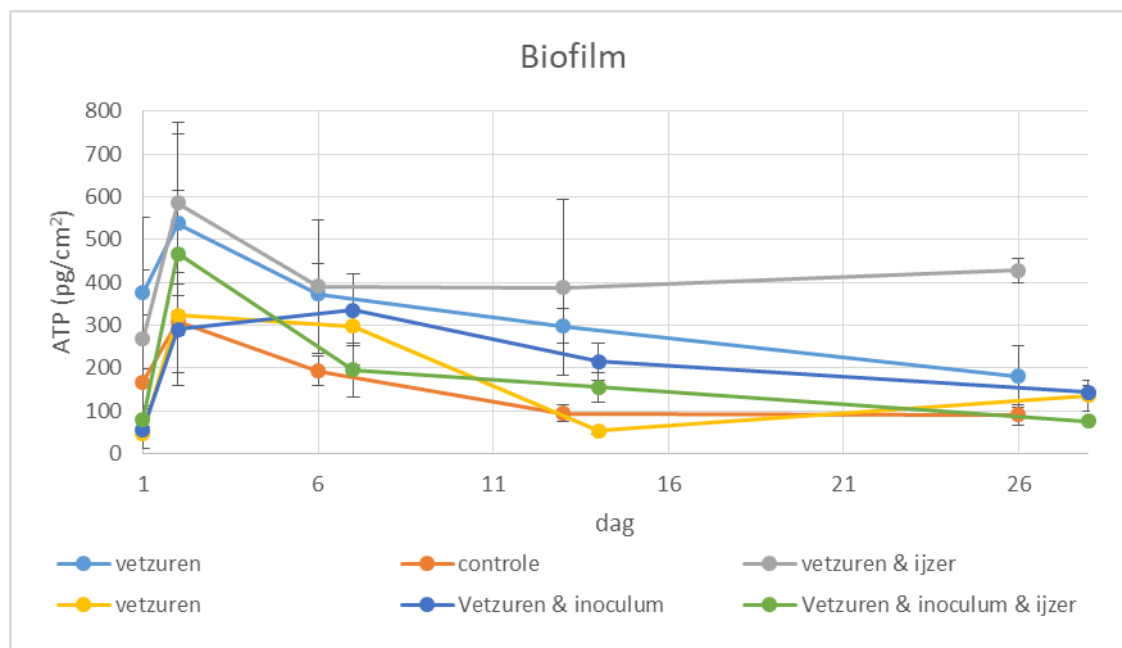
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Vetzuren spelen belangrijke rol bij nagroei van micro-organismen in drinkwater

Auteur Kimberly Learbuch MSc.

Vetzuren doseren aan drinkwater resulteert in verhoogde ATP-concentraties, maar niet in een significante verandering van de samenstelling van de microbiële gemeenschap in water en biofilm. Bacteriën die van nature voorkomen in het drinkwater blijken goed in staat de vetzuren af te breken. Daarnaast werd waargenomen dat het doseren van vetzuren aan drinkwater leidt tot vermeerdering van enkele opportunistische ziekteverwekkers in de biofilm. Tot slot lieten de resultaten zien dat het doseren van driewaardige ijzerionen geen invloed heeft op de biomassa-hoeveelheid of de samenstelling van de bacteriegemeenschap. Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat vetzuren waarschijnlijk een belangrijke bron zijn voor groei van micro-organismen in het drinkwatersysteem en dat beheersmaatregelen gericht zouden moeten worden op het verlagen van deze vetzuren in drinkwater. Daarvoor is een methode nodig die specifiek vetzuren in zeer lage concentraties in drinkwater kan meten.



ATP-concentratie in de biofilm van beide experimenten met de verschillende doseringen. Experiment 1: vetzuren, controle (geen dosering) en vetzuren-ijzer. Experiment 2: vetzuren, vetzuren-inoculum en vetzuren-inoculum-ijzer.

Belang: invloed van verschillende factoren op actieve biomassa

De meeste actieve microbiologische processen in het distributiesysteem spelen zich voornamelijk af in de biofilm. Het is daarom belangrijk te weten hoe verschillende factoren de groei van biofilm

beïnvloeden, zoals de aanwezigheid in drinkwater van vetzuren, ijzer en inoculum.

Aanpak: effecten van verschillende doseringen meten met biofilmonitoren

Uit de literatuur zijn de volgende vetzuren geselecteerd die in drinkwater aanwezig zijn: acetaat, formiaat, butyraat en propionaat. In biofilmmonitoren zijn deze vetzuren gedoseerd (evenredige verdeling en max. 10 µg C/l). Ook ijzer (0,01 mg Fe/l) en inoculum (ent) van verschillende opportunistische ziekteverwekkers (*Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium kansasii* en *Aspergillus fumigatus*) zijn gedoseerd om te achterhalen welke invloed vetzuren en ijzer hebben op biofilmvorming in het algemeen en op groei van specifieke micro-organismen in het bijzonder. Er zijn twee experimenten uitgevoerd, steeds met drie verschillende condities: experiment 1 met een controle zonder dosering, dosering van vetzuren en dosering van vetzuren+ijzer en experiment 2 met doseringen van vetzuren, vetzuren+inoculum, vetzuren+inoculum+ijzer. In de biofilmmonitoren zitten PVC-U ringen om de drinkwaterpraktijk na te bootsen. De water- en biofilmmonsters zijn geanalyseerd op ATP, ijzer, specifieke qPCR en 16S rRNA microbial profiling.

Resultaten: vetzuren van invloed op biomassa concentratie

De hoogste ATP-concentraties in water en biofilm werden gevonden bij de conditie vetzuren+ijzer. De hoogste ATP-concentratie gedurende experiment 2 in water werd gevonden bij vetzuren+inoculum+ijzer en in biofilm bij vetzuren+inoculum. Dit leidt tot de conclusie dat de vetzuren de ATP-concentratie in de biofilmmonitoren verhogen. De dosering van vetzuren resulteerde niet in een significante verandering van de microbiële samenstelling.

De resultaten van de qPCR's laten zien dat *P. aeruginosa* zich alleen kortstondig kan vestigen en handhaven in water wanneer vetzuren worden gedoseerd, en daarna binnen ongeveer twee weken uitspoelt. De aantallen *M. kansasii* en *A. fumigatus* zijn gedurende de hele incubatieperiode verhoogd in

de biofilmmonitoren waar vetzuren aan zijn gedoseerd.

De toevoeging van driewaardige ijzerionen heeft geen invloed op de biomassa of de microbiële samenstelling.

Toepassing: advies om de concentratie vetzuren laag te houden

Vetzuren lijken dus in belangrijke mate verantwoordelijk voor groei van micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem. Bij te hoge concentraties vetzuren zijn opportunistische ziekteverwekkers in staat om zich in het drinkwaterdistributiesysteem te vermeerderen. Om nagroei in het distributiesysteem te verlagen, is het daarom zinvol om in het geproduceerde drinkwater de concentratie vetzuren zo laag mogelijk te houden.

Daarnaast is een methode nodig waarmee de afzonderlijke vetzuren bij lage concentraties kunnen worden bepaald om daarmee gericht de vorming en verwijdering van vetzuren tijdens de zuivering te onderzoeken, en de aanwezigheid en concentraties van vetzuren in het distributiesystemen.

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport Invloed van vetzuren en driewaardige ijzerionen op de microbiële populaties in drinkwater en biofilms (BTO-2021.072).

De studie voorafgaand aan dit rapport is beschreven in:

- Microbiologische compositie en potentiële processen tijdens drinkwaterdistributie (BTO 2020.044).

Inhoud

| | |
|---|-----------|
| Rapport | 2 |
| <i>Managementsamenvatting</i> | 3 |
| Inhoud | 5 |
| 1 Inleiding | 7 |
| 2 Materiaal en methoden | 8 |
| 2.1 Hexamonitor | 8 |
| 2.1.1 Schoonmaken | 9 |
| 2.1.2 Dosering | 9 |
| 2.2 Analyses | 10 |
| 2.2.1 ATP | 10 |
| 2.2.2 IJzer | 10 |
| 2.2.3 DNA-isolatie | 10 |
| 2.2.4 qPCR | 11 |
| 2.2.5 Microbial profiling | 11 |
| 3 Resultaten | 12 |
| 3.1 Experiment 1: invloed van vetzuur-en vetzuur + ijzerdosering | 12 |
| 3.1.1 ATP en ijzer | 12 |
| 3.1.2 Microbial profiling | 14 |
| 3.1.3 Genera van ijzeroxiderende bacteriën | 18 |
| 3.1.4 Opportunistische ziekteverwekkers | 19 |
| 3.2 Experiment 2 invloed van dosering vetzuren, ijzer en opportunistische ziekteverwekkers | 20 |
| 3.2.1 ATP en ijzer | 20 |
| 3.2.2 Microbial profiling | 22 |
| 3.2.3 Genera van ijzeroxiderende bacteriën | 26 |
| 3.2.4 Opportunistische ziekteverwekkers | 27 |
| 4 Discussie | 32 |
| 4.1 Dosering van vetzuren | 32 |
| 4.2 Dosering van ijzer en opportunistische ziekteverwekkers | 33 |
| 4.3 Experiment 1 versus experiment 2 | 33 |
| 4.4 Maatregelen definiëren | 34 |
| 5 Conclusie en aanbevelingen | 36 |
| 5.1 Conclusies | 36 |
| 5.2 Aanbevelingen | 36 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6 | Referenties | 38 |
| I | Bijlage Tekening hexamonitor | 40 |
| II | Bijlage doseeroplossingen | 41 |
| III | Bijlage Resultaten ijzer concentratie | 42 |

1 Inleiding

Hoewel de meeste biomassa in het drinkwaterdistributiesysteem zich bevindt in de biofilm op de buiswand of op het sediment (Liu et al., 2014; 2017; van der Wielen & Lut, 2016), besteden de meeste studies voornamelijk aandacht aan de biomassa die aanwezig is in het drinkwater. Onderzoek heeft echter laten zien dat de bacteriën die dominant aanwezig zijn in het gedistribueerde Nederlandse drinkwater meestal ook al aanwezig zijn in het reinwater van het pompstation (Roeselers et al., 2015; Vavourakis et al., 2020; Learbuch & Timmers, 2020). Het lijkt er daarom op dat actieve microbiologische processen in het distributiesysteem voornamelijk plaatsvinden in de biofilm. Welke metabole processen plaatsvinden in de biofilm in het distributiesysteem is onbekend, evenals de rol van deze biofilm in de biologische stabiliteit van het water, welke stoffen (AOC-P17/NOX, AOC-A3, PHMOC, eiwitten, koolhydraten, vetzuren, etc.) worden afgebroken en daarmee nagroeiproblematiek kunnen veroorzaken en wat de invloed van deeltjeskarakteristieken (weinig organische stof, veel organische stof, ijzer/mangaangehalte etc.) op biofilmgroei is. Hierdoor blijft de dynamiek tussen biofilm op de buiswand, biofilm op het sediment en bacteriën in de waterfase onduidelijk. Het ontbreken van dergelijke kennis is een belangrijke reden waarom het definiëren van effectieve en goed onderbouwde beheersmaatregelen in zuivering en distributie om de biologische stabiliteit van het drinkwatersysteem te verbeteren moeilijk is.

Om te achterhalen welke metabole processen dominant kunnen zijn in biofilms van een drinkwaterdistributiesysteem, zijn in fase 1 van het BTO-project ‘Microbiologie tijdens drinkwaterdistributie’ de functionele genen gekarakteriseerd die aanwezig zijn in het microbioom van biofilm uit drie verschillende voorzieningsgebieden (Learbuch & Timmers, 2020). De belangrijkste conclusie van het eerste projectonderdeel was dat met name functionele genen werden gevonden die betrokken zijn bij de afbraak of vorming van vetzuurketens, de zogeheten bèta-oxidatie. Dit betekent dat de afbraak van vetzuren mogelijk een belangrijke rol speelt in de biofilm op de buiswand en op het sediment van drinkwaterdistributiesystemen.

In fase 2 van het BTO-project is vervolgens onderzocht wat het effect is van vetzuurdosering, aan biofilmmonitoren gevoed met drinkwater, op de microbiologie van de biofilm. Deze rapportage beschrijft de resultaten van het fase 2 onderdeel van het project. Op basis van de literatuur zijn vier vetzuren geselecteerd die in eerdere studies in drinkwater zijn aangetroffen (van der Wielen & Vughs, 2020). Naast de invloed van het doseren van deze vetzuren, is tevens onderzocht wat het effect is van gelijktijdig doseren van ijzer (0,01 mg Fe/l) en/of een inoculum van opportunistische ziekteverwekkers (*Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium kansasii* en *Aspergillus fumigatus*), om de invloed van deze stoffen op biofilmvorming in het algemeen en groei van specifieke micro-organismen in het bijzonder waar te nemen. IJzer is daarbij als stof ook meegenomen omdat het een spoorelement kan zijn in de groei van micro-organismen en omdat het positief geladen ijzer mogelijk hecht aan negatief geladen biofilm, waar vervolgens weer positief geladen NOM aan het al gebonden ijzer bindt. Daardoor komt dan extra substraat langdurig beschikbaar voor groei in de biofilm (van der Kooij en Bereschenko, 2015; pers. com. Paul van der Wielen). Met de resultaten van een dergelijk laboratoriumonderzoek komt dan hopelijk kennis beschikbaar waarmee het mogelijk is om beter onderbouwde beheersmaatregelen te definiëren voor de zuivering en/of distributie die gericht de probleemfactoren met nagroei aanpakken. De effectiviteit van zulke eventuele beheersmaatregelen kunnen vervolgens in vervolgonderzoek worden bepaald.

2 Materiaal en methoden

2.1 Hexamonitor

Het effect van de verschillende doseringen aan drinkwater op de biofilmvorming is onderzocht met behulp van een hexamonitor. De hexamonitor is een systeem waarin zes (hexa) traditionele biofilmmonitoren naast elkaar zijn geplaatst (van der Kooij et al., 2009) (Figuur 1). Voor dit project is een apart doseerpunt voor iedere kolom gemaakt (zie Bijlage I) en is een vat geplaatst voor de hexamonitor waar het toevoerwater wordt opgewarmd tot 22°C. De biofilmmonitoren van de hexamonitor zijn gevoed met het drinkwater van het microbiologisch laboratorium van KWR (afkomstig van productielocatie Tull en 't Waal). Dit drinkwater wordt gerecirculeerd met 120 l/uur en ververst met 1,2 l/uur. Iedere kolom was gevuld met 25 ringen van PVC-U (lengte ca. 1,7 cm en inwendige diameter ca. 1,5 cm; de oppervlakte is ca. 17 cm²). Op dag 1, 2, 7, 14 en 28 werd het water van de kolommen bemonsterd (100 ml), nadat het water door de biofilmmonitor is gegaan, en werden per kolom twee ringen uitgethaald. Het materiaal van de ringen werd met Low Energy Sonification (LES) losgetrild, in totaal 3x 10 ml steriel drinkwater. Voor de qPCR en ijzeranalyse is het volume van de twee uitgenomen ringen per meetmoment gepoold.



Figuur 1 Foto van hexamonitoropstelling.

2.1.1 Schoonmaken

Voorafgaand aan ieder experiment werd de hexamonitor schoongemaakt met 200 mg/l natriumhypochloriet, dat werd gecirculeerd gedurende 2,5 uur. Aangenomen wordt dat met een hoge chloordosering een groot deel van de nog aanwezige micro-organismen wordt gedood. Om de afgestorven biofilm vervolgens te verwijderen is achtereenvolgens 10 g/l SDS en 30 g/l citroenzuur gedurende 30 minuten gedoseerd in de hexamonitor. Tussendoor werd het systeem doorspoeld gedurende 30 minuten met drinkwater, zodat er geen chemische stoffen achterblijven in het systeem (van Bel, 2018). Daarna heeft het systeem gedurende een week gespoeld met drinkwater (zonder ringen), voordat de experimenten zijn gestart.

Tevens worden de ringen ook gespoeld voor iedere experiment, dit protocol is hetzelfde als voor de materialen in de materialentest (KWR-huisvoorschrift LMB-006). In het kort:

- Plaats de ringen in een bekersglas en spoel gedurende 60 ± 5 min (1 tot 3 m/min)
- Laat de ringen vervolgens gedurende 24 ± 1 uur in het water bij kamertemperatuur staan
- Spoel de ringen nogmaals gedurende 60 ± 5 min (1 tot 3 m/min)
- Laat de ringen staan in het water tot gebruik. De ringen zijn binnen 24 uur in de hexamonitor geplaatst.

2.1.2 Dosering

Er zijn twee experimenten uitgevoerd waarbij verschillende condities, met verschillende doseringen, werden getest. In Tabel 1 is een overzicht weergegeven van de verschillende toegepaste doseringen. In experiment 1 is aan de eerste twee biofilmmonitoren van de hexamonitor een vetzuurmengsel gedoseerd en aan de twee laatste biofilmmonitor (biofilmmonitor 5 en 6) is een vetzuurmengsel met ijzer gedoseerd. Aan biofilmmonitor 3 en 4 is geen dosering toegepast (negatieve controle). In experiment 2 is aan de eerste twee biofilmmonitoren wederom alleen een vetzuurmengsel gedoseerd, terwijl aan biofilmmonitor 3 en 4 naast het vetzuurmengsel ook een mix van verschillende opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen werd gedoseerd. Aan de twee laatste biofilmmonitoren van de hexamonitor werd naast het vetzurenmengsel en mix van opportunistische ziekteverwekkers ook nog ijzer gedoseerd.

Tabel 1 Overzicht dosering per experiment

| Biofilmmonitor kolom | Eerste experiment (26-05-2020 tot 23-06-2020) | Tweede experiment (04-08-2020 tot 01-09-2020) |
|----------------------|---|---|
| 1&2 | Vetzuren | Vetzuren |
| 3&4 | Geen dosering | Vetzuren & inoculum |
| 5&6 | Vetzuren & ijzer | Vetzuren & inoculum & ijzer |

Doseermengsel vetzuren

Er is een mix gemaakt van de volgende vetzuren: acetaat, formiaat, butyraat en propionaat, de totale gedoseerde vetzuurconcentratie is $10 \mu\text{g C/l}$ per kolom en de concentratie van de verschillende vetzuren zijn evenredig verdeelt ($2,5 \mu\text{g C/l}$ per vetzuur). Zie bijlage II voor meer informatie. Dit mengsel is gedurende de duur van het hele experiment gedoseerd.

Dosering ijzer

Driewaardig ijzer wordt in oplossing gebracht ($\text{pH} < 2$) door ijzerchloride in water op te lossen. De ijzeroplossing is vervolgens gedoseerd met een concentratie van $0,01 \text{ mg Fe/l}$ per kolom, $\text{pH} < 2$. Zie bijlage II voor meer informatie. Dit mengsel is gedurende de duur van het hele experiment gedoseerd.

Dosering inoculum

De opportunistische ziekteverwekkers *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium kansasii* en *Aspergillus fumigatus* zijn opgekweekt in entflesjes. Vervolgens is er een mengsel met deze vier organismen bereid. De aantallen per organisme in dit mengsel is weergegeven in Tabel 2. Op dag 0, 1 en 2 is dit inoculummengsel gedoseerd aan de hexamonitor. Na iedere dosering heeft het systeem 1 uur stil gestaan. Op dag 0 is na de 1 uur stilstand ook nog 1 uur gerecirculeerd voordat de doorstroming van de biofilmmonitoren met drinkwater weer is aangezet. Op dag 1 en 2 is na de 1 uur stilstand de doorstroming weer direct aangezet. Zie bijlage II voor meer informatie.

Tabel 2 Overzicht gebruikte micro-organismen en inoculum concentraties.

| Micro-organisme | kve/per kolom |
|-------------------------------------|-------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | $2,5 \times 10^6$ |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | $8,1 \times 10^4$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | $2,5 \times 10^6$ |
| <i>Mycobacterium kansasii</i> | $3,1 \times 10^5$ |

2.2 Analyses

2.2.1 ATP

ATP is aanwezig in alle levende organismen en is een maat voor de hoeveelheid actieve biomassa. De ATP-bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (een foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de bepaling bij direct onderzoek van drinkwater bedraagt ca. 1 ng ATP l^{-1} . Op basis van gemiddelde waarden voor het ATP-gehalte per bacterieel cel kan met het ATP-gehalte een ruwe schatting worden gemaakt voor de concentratie aan actieve (levende) bacteriën. De ATP-bepaling wordt gebruikt voor de bepaling van de actieve biomassaconcentratie in leidingwater en van de biofilms. Tijdens deze studie is de ATP-concentratie van het drinkwater en de biofilm bepaald. De ATP-concentratie van de biofilm wordt weergegeven in pg ATP cm^{-2} , terwijl de concentratie in water wordt weergegeven in ng l^{-1} . Om de ATP-concentratie van biofilm en water met elkaar te kunnen vergelijken zijn beide omgerekend naar $\text{ng ATP per meter buislengte met een diameter van 110 mm}$.

De ATP-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-002.

2.2.2 IJzer

Na aanzuren van het monster met salpeterzuur (tot pH 1 á 2) voor het oplossen van de ijzer(hydr)oxiden wordt de concentratie van ijzer gemeten m.b.v. een ICP-MS (X-Series II; Thermo Scientific). De aantoonbaarheidsgrens van deze methode in (drink)water is $10 \text{ } \mu\text{g Fe /l}$ (KWR Huisvoorschrift LAM-074). De ijzerconcentratie is alleen bepaald van de biofilm en deze wordt weergegeven als mg Fe/m^2 .

2.2.3 DNA-isolatie

Elk water- en biofilmmonster (150 en 80 ml respectievelijk) werd gefiltreerd door een $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ filter, waarna de filters met een DNA-suspensie van een interne controle en vervolgens zijn opgeslagen bij -20°C . Later werd DNA uit deze filters geïsoleerd met de DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen). De DNA-isolatie is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-069.

2.2.4 qPCR

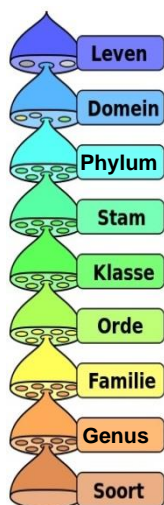
Er zijn vier verschillende qPCR's uitgevoerd op de monsters om de aantallen *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. fumigatus* en *M. kansasii* te bepalen. Zie Tabel 3 voor het doelgen dat voor ieder organisme werd bepaald, het KWR-huisvoorschrift en de literatuurreferentie van de analyse

Tabel 3 Overzicht toegepaste qPCR's.

| | Doelgen | KWR-huisvoorschrift | Bron |
|-----------------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | regA | LMB-065, bijlage 10 | Van der Wielen et al., 2014 |
| <i>S. maltophilia</i> | Chitinase A | LMB-068, bijlage 06 | da Silva Filho et al., 2004 |
| <i>A. fumigatus</i> | 28S rRNA | LMB-065, bijlage 06 | van der Wielen et al., 2011 |
| <i>M. kansasii</i> | 16S rRNA | LMB-065, bijlage 21 | Van der Wielen et al., 2014 |

2.2.5 Microbial profiling

Gebarcodeerde fragmenten van het 16S rRNA gen (~300bp), gericht op de V4 hypervariabele regio, werden geamplificeerd uit de DNA-extracties d.m.v. PCR, gebruik makend van de primers 515F en 806R. Er zijn in totaal 77 monsters geanalyseerd met microbial profiling. Negatieve controles (blanco van DNase/RNase vrij water tijdens filtratie en tijdens PCR) zijn ook meegenomen. De DNA-sequentie is bepaald van de gezuiverde PCR-producten met de Illumina MiSeq sequencer bij KWR. Deze DNA-sequenties zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van het specialistische computerprogramma Qiime2. Qiime2 maakt gebruik van referentiesequentiedatabase Silva v128-V4 om de sequenties taxonomisch in te delen (Figuur 2). De data-analyse is uitgevoerd met programma R (pakket phyloseq en ampvis2) en PRIMER-e v7. De samenstelling van de microbiële populatie van het water en de biofilm van alle condities is geanalyseerd met Principal Coordinates Analysis (PCoA) analyse op de Bray-Curtis afstand tussen monsters en een permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). Een PCoA is een manier om de verschillen in soortensamenstelling van de bacteriegemeenschap van de individuele monsters uit een dataset te visualiseren en met elkaar te vergelijken (in dit geval des te dichter monsters bij elkaar liggen, des te minder de bacteriesamenstelling verschillen). En met de PERMANOVA wordt getest of de verschillen statistisch significant zijn ($p < 0,05$). De PCoA plots zijn gemaakt in R met het pakket phyloseq, terwijl de PERMANOVA-analyses werd uitgevoerd met het computerprogramma ePRIMER.



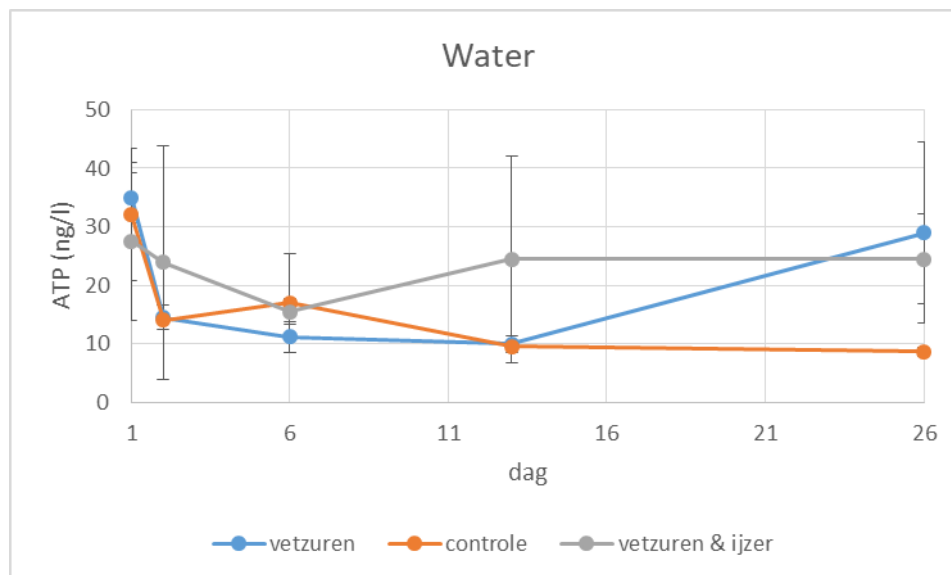
Figuur 2 De hiërarchie van de acht belangrijkste taxonomische rangen, tussenliggende rangen zijn niet afgebeeld.

3 Resultaten

3.1 Experiment 1: invloed van vetzuur-en vetzuur + ijzerdosering

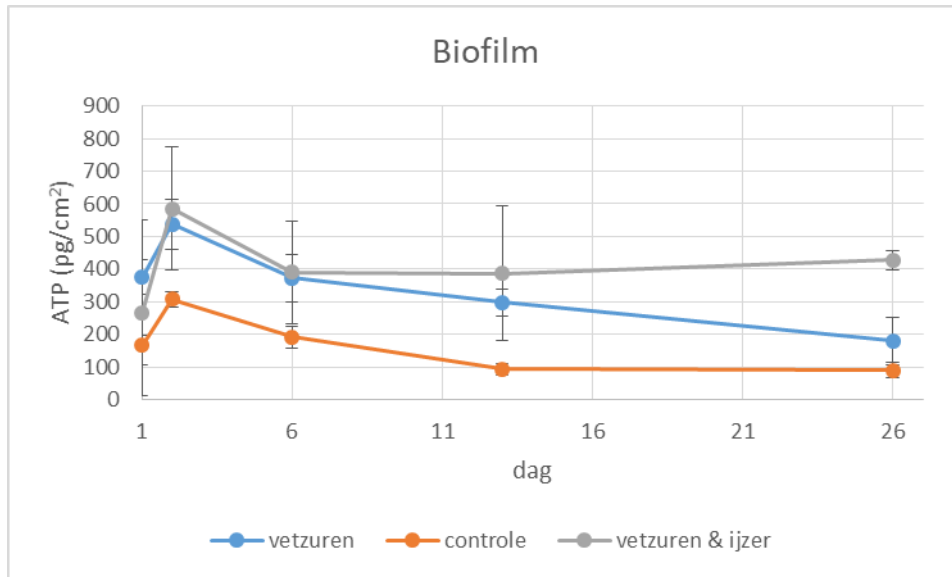
3.1.1 ATP en ijzer

De ATP-resultaten van de watermonsters van experiment 1 zijn weergegeven in Figuur 3. De ATP-concentratie van de watermonsters, bemonsterd nadat het water door de biofilmmonitor is gegaan, was op dag 1 ongeacht de dosering rond de 30 ng/l, om vervolgens te dalen naar rond de 15 ng/l op dag 2. Na dag 2 fluctueerde de ATP-concentratie in water tussen de verschillende doseercondities. Bij de monitoren waar geen dosering werd toegepast fluctueerde de ATP-concentratie tussen 9 en 18 ng/l ATP (dag 6-26), bij de vetzuurdosering was deze variatie tussen de 10 en 29 ng/l ATP en bij de vetzuur- met ijzerdosering tussen de 16 en 24 ng/l ATP.



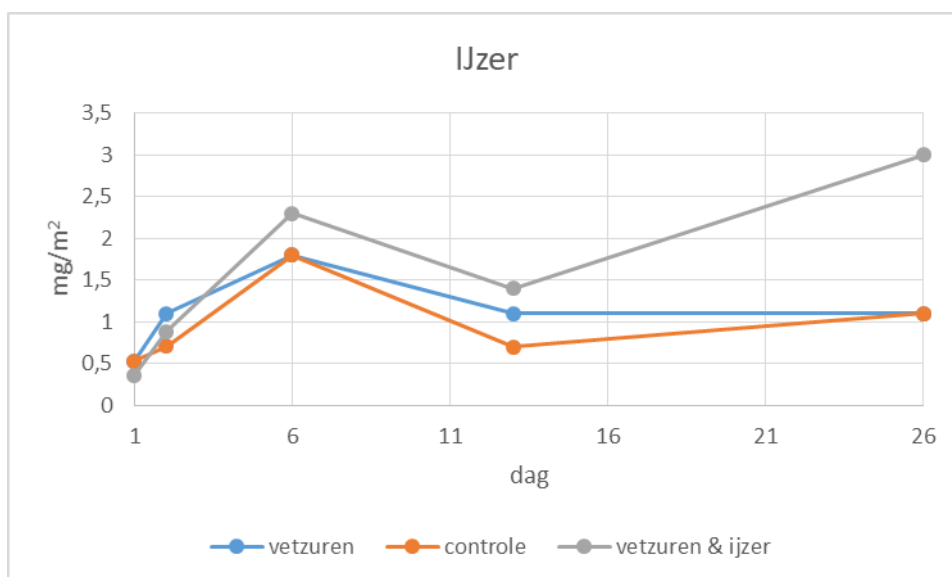
Figuur 3 De ATP-concentratie in het water van experiment 1 waar vetzuren en vetzuren & ijzer werden gedoseerd aan drinkwater, terwijl bij de controle niks werd gedoseerd. De standaarddeviatie is bepaald middels de standaardafwijking.

De ATP-resultaten van de biofilmmonsters van experiment 1 zijn weergegeven in Figuur 4. De ATP-concentraties van de verschillende biofilmmonsters waren op dag 1 het hoogst in de biofilmmonitoren waar alleen vetzuren aan waren gedoseerd (ongeveer 370 pg/cm² ATP), gevolgd door de monitoren waar vetzuren en ijzer aan het drinkwater waren gedoseerd (270 pg/cm² ATP) en de controle zonder doseringen (170 pg/cm² ATP). Op dag 2 piekte de ATP-concentratie in de biofilm van alle monitoren. De ATP-concentratie van de biofilm in de monitoren waar vetzuren of vetzuren met ijzer aan werden gedoseerd, piekte rond de 550 pg/cm². In de controle monitoren piekte de ATP-concentratie tot een beduidend lagere waarde van 310 pg/cm². Van dag 2 tot dag 6 namen de ATP-concentraties van de biofilm weer af tot ongeveer 390 pg/cm² ATP (vetzuur en vetzuur/ijzerdosering) of 190 pg/cm² (controle). De ATP-concentratie in de biofilm bleef rond 390 pg/cm² gedurende de duur van het experiment voor de biofilmmonitoren waar vetzuren en ijzer aan het water werden gedoseerd. Voor de biofilmmonitoren waar alleen vetzuren aan het water werden gedoseerd bleef de ATP-concentratie van de biofilm dalen tot 180 pg/cm² op dag 26. De ATP-concentratie van de biofilm in de controlemonitoren daalde tot dag 13 (90 pg/cm²) en bleef daarna tot dag 26 redelijk stabiel.



Figuur 4 De ATP-concentratie in de biofilm van experiment 1 waar vetzuren en vetzuren & ijzer werden gedoseerd aan drinkwater, terwijl bij de controle niks werd gedoseerd. De standaarddeviatie is bepaald middels de standaardafwijking.

De ijzerconcentratie in de biofilm nam vanaf dag 1 toe van rond de 0,05 mg/m² Fe tot rond 1,8 mg/m² Fe op dag 6 voor de monitoren die werden gevoed met drinkwater waaraan niets of alleen vetzuren werden gedoseerd (Figuur 5). Bij deze monitoren nam de ijzerconcentratie in de biofilm weer af tot dag 13, waarna de concentratie min of meer gelijk bleef op 1,0 mg/m² Fe. De biofilm in de monitoren die werden gevoed met drinkwater waaraan vetzuren en ijzer werden gedoseerd bevatte op dag 6 een duidelijk hogere ijzerconcentratie (~ 2,3 mg/m² Fe), waarna de concentratie eerst daalde, om vervolgens tussen dag 13 en 26 weer te stijgen van 1,4 tot 3,0 mg/m² Fe.



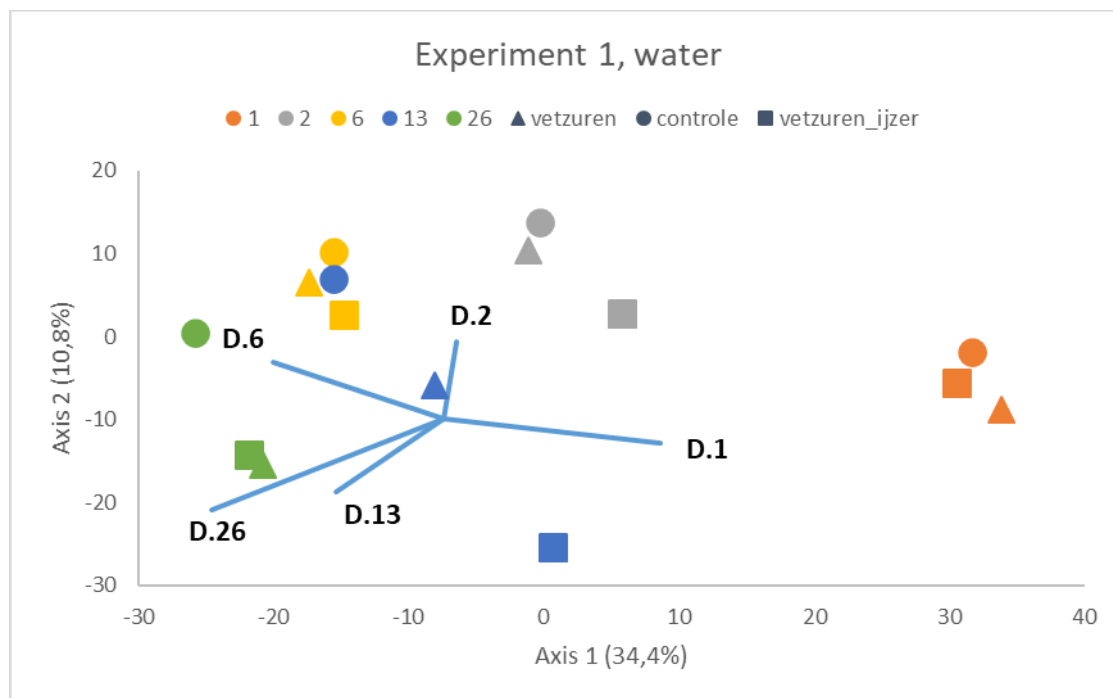
Figuur 5 Ijzerconcentratie in de biofilm van experiment 1 waar vetzuren en vetzuren-ijzer aan drinkwater werden gedoseerd, terwijl bij de controle niks aan het drinkwater werd gedoseerd.

3.1.2 Microbial profiling

Naast bovenstaande parameters werd ook de samenstelling van de bacteriële gemeenschap vergeleken met behulp van microbial profiling. De samenstelling van de bacteriële populatie van het water en de biofilm van alle biofilmmonitoren was geanalyseerd met Principal Coordinates Analysis (PCoA) analyse en een permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). Een PCoA is een manier om de verschillen in soortensamenstelling van de bacteriegemeenschap van de individuele monsters uit een dataset te visualiseren en met elkaar te vergelijken (in dit geval des te dichter monsters bij elkaar liggen, des te minder de bacteriesamenstelling verschillen). En met de PERMANOVA werd getest of de verschillen in de samenstelling van de bacteriegemeenschap statistisch significant zijn.

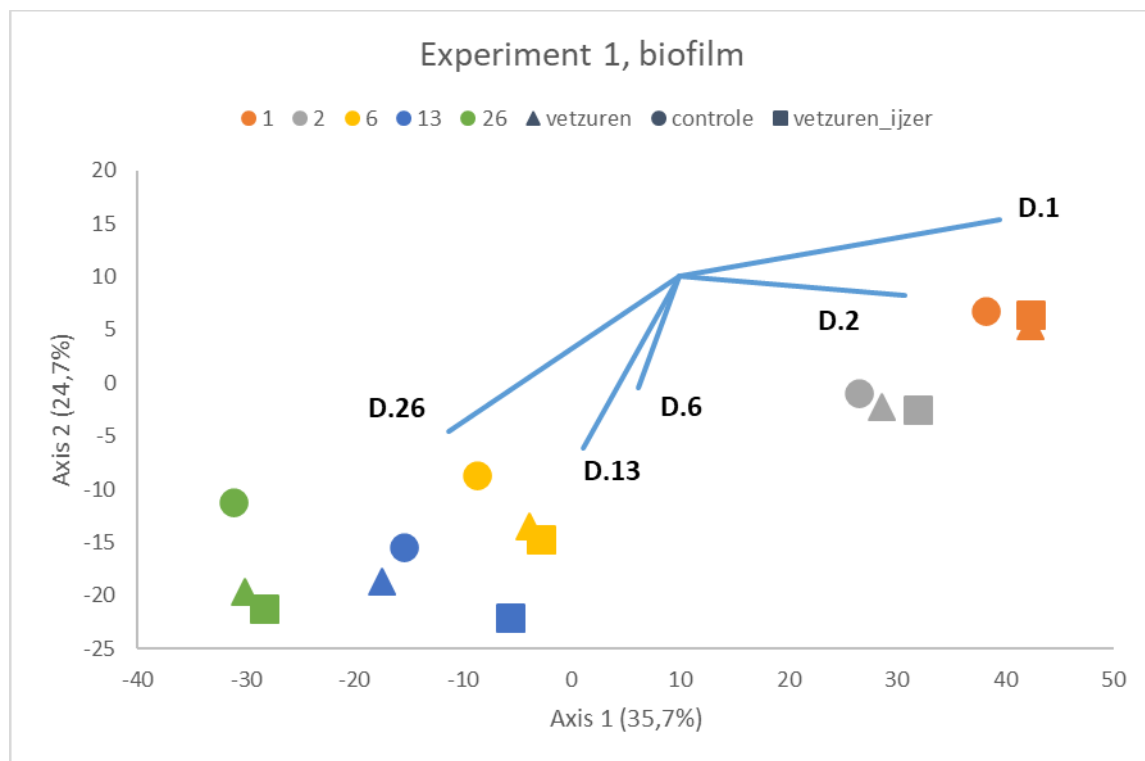
3.1.2.1 Resultaten PCoA-analyses

De PCoA plot van de watermonsters van experiment 1 is weergegeven in Figuur 6, waarbij de verschillende monsterdagen zijn weergegeven door verschillende kleuren en de verschillende dosering door de verschillende symbolen. De PCoA plots hebben twee assen die gebaseerd zijn op ongedefinieerde factoren die de variantie uitleggen. Dus bij experiment 1 bijvoorbeeld, wordt 55,2% (34,4% x-as en 10,8% y-as) van de variantie verklaard met deze twee assen (Figuur 6). Over het algemeen clusteren de watermonsters iedere monsterdag dicht bij elkaar en apart van de andere monsterdagen, behalve voor dag 13 waar de watermonster van de iedere dosering relatief ver van elkaar verwijderd is. Dus de bacteriële populaties op een bepaalde monsterdag, ongeacht de dosering, lijken op, dag 13 na, elkaar. Op dag 1 en 26 clusteren de watermonsters van de monitoren met de drie doseringen meer samen dan op de andere dagen. Zoals eerder vermeld liggen op dag 13 de monsterpunten van de verschillende doseringen het verst uit elkaar. De bacteriële populatiesamenstelling in het water op de verschillende monsterdagen verschoven met name op de x-as (van rechts naar links) en is een indicatie dat deze onbekende factor met name door de runtijd van de monitoren wordt bepaald. De bacteriële populatiesamenstelling in het water verschoven met de dosering op de y-as voor enkele afzonderlijke monsterdagen (dag 2, 13 en 26), maar ook een verschuiving met monsterdag werd voor enkele monsterdagen waargenomen (. De samenstelling van de bacteriële gemeenschap in het water op de verschillende monsterdagen zijn significant verschillend van elkaar volgens de permanova-analyse ($p < 0,05$). De verschillende doseringen verschillen niet van elkaar volgens de permanova-analyse ($p > 0,05$). Dus de dag van monsternamen heeft meer invloed op de samenstelling van de bacteriële populatie in het drinkwater dan de invloed van de verschillende doseringen.



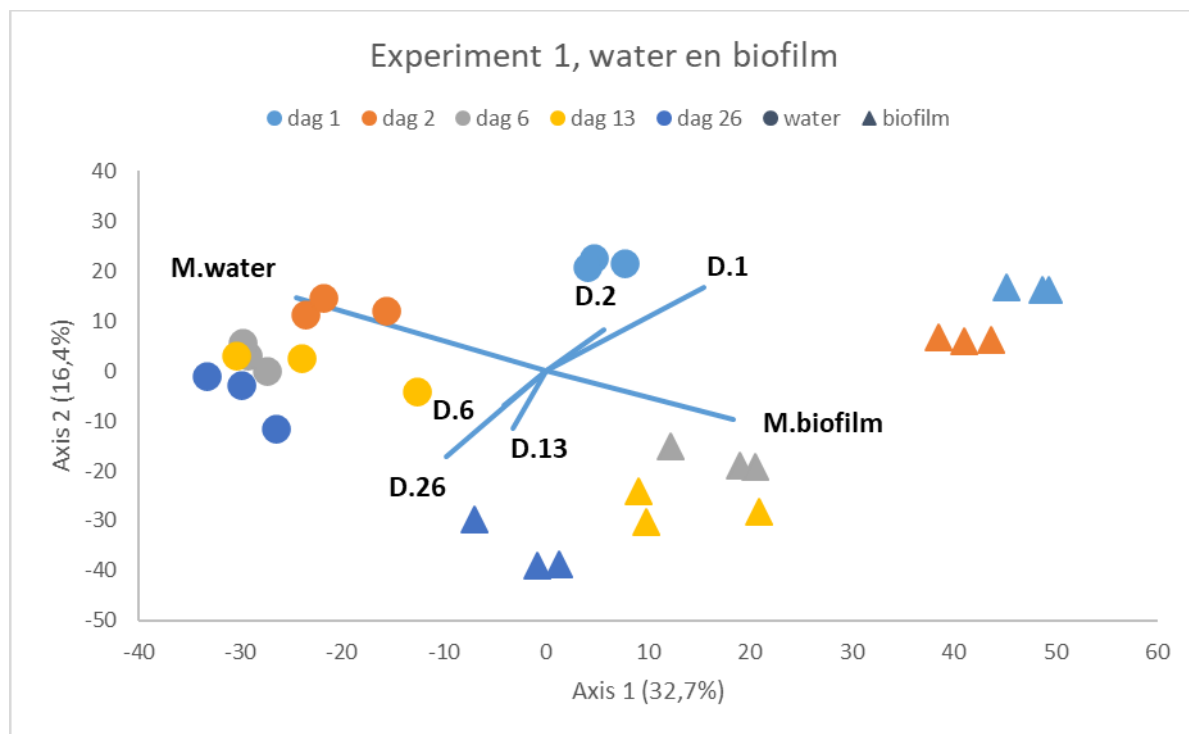
Figuur 6 De resultaten van de PCoA-analyse van de samenstelling van alle OTU's uit de watermonsters met verschillende doseringen (verschillende symbolen) en van verschillende monsterdagen (verschillende kleuren) van experiment 1.

De PCoA plot waarin de bacteriële gemeenschap van de biofilmmonsters van experiment 1 wordt vergeleken, is weergegeven in Figuur 7. Uit deze resultaten blijkt dat ook voor de samenstelling van de bacteriële biofilmpopulaties geldt dat iedere monsterdag apart clustert van de andere monsterdagen. Daarnaast lijkt per monsterdag de samenstelling van de bacteriële populatie in de biofilm van de monitoren, waar aan het water vetzuren of vetzuren en ijzer zijn gedoseerd, meer op elkaar dan die van de monitor waar niets is gedoseerd aan het water. Dit is vooral zichtbaar op dag 1, 2, 6 en 26. Op dag 13 lagen de monsterpunten van de bacteriegemeenschap van de biofilms die zijn ontwikkeld met verschillende doseringen verder uit elkaar dan op de andere monsterdagen. De verschillen in de samenstelling van de bacteriële biofilmpopulatie waren ook significant verschillend van elkaar volgens de permanova-analyse ($p < 0,05$). De verschillende doseringen verschillen niet van elkaar volgens de permanova-analyse ($p > 0,05$). De samenstelling van de bacteriepopulaties in de biofilm op de verschillende monsterdagen verschoven met namen op de x-as (van rechts naar links). De onbekende factor die verantwoordelijk is voor de verschillen op de x-as lijkt dus met name gerelateerd te zijn aan de looptijd van de monitor. Op de y-as schuiven de populaties tussen de verschillende doseringen en tussen enkele monsterdagen (bv monsterdag 1 en 2 versus monsterdag 6, 13 en 26), waardoor de onbekende factor die verantwoordelijk is voor de verschillen op de y-as gerelateerd is aan de stoffen die zijn gedoseerd en aan de looptijd van de monitoren. Dus de monsterdag heeft meer invloed op de samenstelling van de bacteriële populatie in de biofilm dan de verschillende doseringen aan het water.



Figuur 7 De resultaten van de PCoA-analyse van de samenstelling van alle OTU's uit de biofilmmonsters met verschillende doseringen (verschillende symbolen) en van verschillende monsterdagen (verschillende kleuren) van experiment 1.

Naast de invloed van monsterdag en dosering is ook onderzocht of de bacteriesamenstelling van water en biofilm van elkaar verschilden. De resultaten van de PCoA-analyse van de water en biofilmmonsters van experiment 1 is weergegeven in Figuur 8. Uit deze analyse bleek dat de bacteriesamenstelling van water en biofilm significant van elkaar verschilden ($p < 0,05$). Daarnaast verschilden de bacteriesamenstelling van drinkwater en biofilm ook significant tussen de verschillende monsterdagen ($p < 0,05$). De dosering was niet significant verschillend voor water en biofilm ($p > 0,05$).



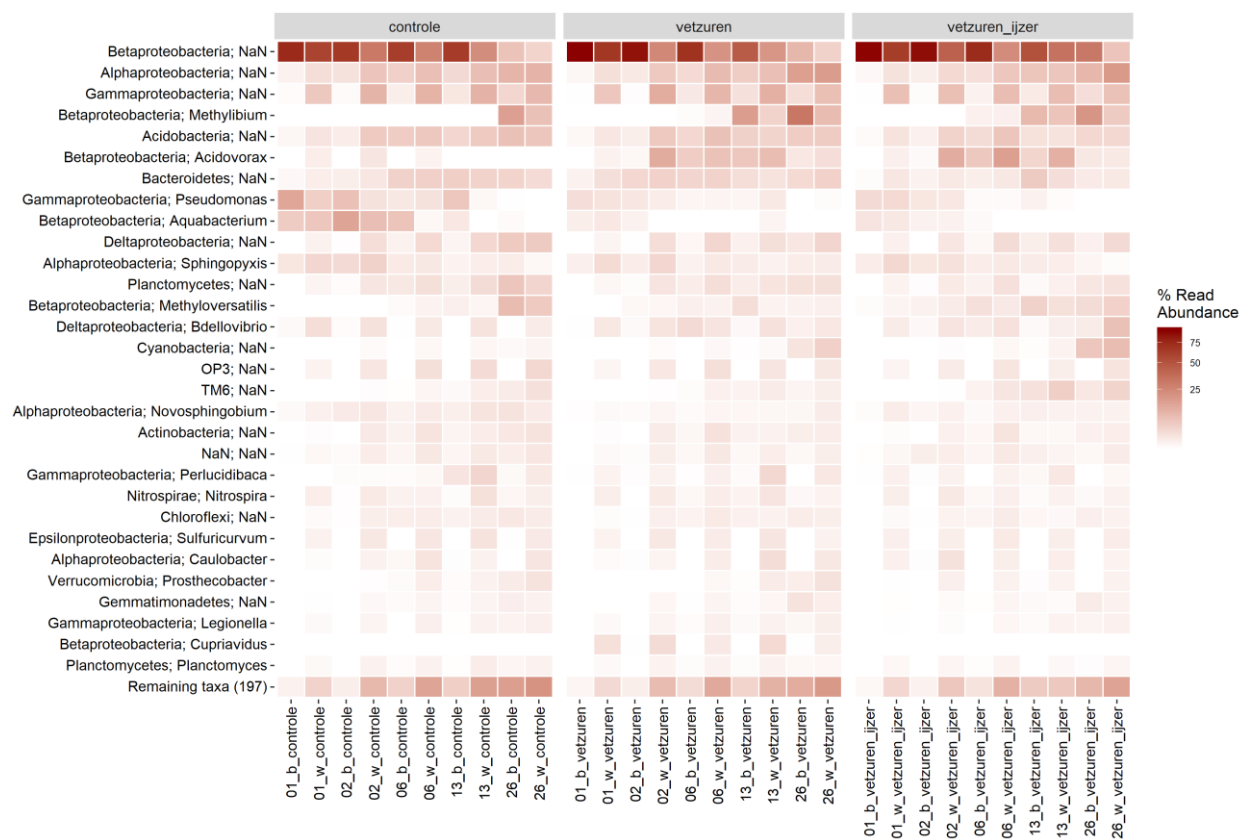
Figuur 8 De resultaten van de PCoA-analyse van de samenstelling van alle OTU's uit de water- en biofilmmonsters met verschillende doseringen (verschillende symbolen) en van verschillende monsterdagen (verschillende kleuren) van experiment 1.

3.1.2.2 Resultaten taxonomie

Figuur 9 laat de verdeling van de verkregen 16S rRNA gensequenties over de taxonomische genera zien, waarbij alleen de genera zijn weergegeven van de top 30 die bijdragen aan de relatieve abundantie van de bacteriële gemeenschap van de water- en biofilmmonsters op de verschillende monsterdagen van experiment 1. Uit de voorgaande analyse bleek dat de dag van monsternaam de grootste invloed had op de samenstelling van de bacteriepopulatie. Uit de resultaten van Figuur 9 volgde dat, ongeacht de dosering, een onbekende genus van *Beta-Proteobacteria* (NaN), *Pseudomonas*, *Aquabacterium* en *Sphingophyxis* relatief veel aanwezig was gedurende de eerste dagen, maar dat deze in de tijd afnamen. Daarnaast werd voor 12 andere genera het tegenovergestelde waargenomen.

Uit deze resultaten volgde tevens dat sommige genera meer aanwezig waren in de monitoren met een bepaalde dosering dan bij de monitoren met andere doseringen. Zo werd waargenomen dat bij de monsters uit de monitoren zonder dosering aan het drinkwater meer *Aquabacterium* aanwezig was dan in de monsters uit de monitoren die werden gevoed met water waar vetzuren of vetzuren en ijzer werden gedoseerd. Voor de monsters genomen uit de monitor waaraan alleen vetzuren zijn gedoseerd werd het genus *Cupriavidus* specifiek waargenomen en dit genus was dus niet dominant in de monitoren waar geen dosering of vetzuren en ijzer werden gedoseerd. Voor de condities vetzuren-ijzer is er niet een specifieke genera in de top 30 aanwezig.

Als er specifiek werd gekeken naar het voorkomen van genera in water of biofilm, dan geldt voor water dat er acht genera zijn die meer aanwezig waren in water dan in biofilm in de top 30. Voor biofilm was dit maar één genera, in de top 30, namelijk *Methylbium*.



Figuur 9 De verdeling van 16S rRNA gensequenties over de taxonomische genera, waarbij alleen de genera zijn weergegeven van de top 30 sequenties die bijdragen aan de relatieve abundantie van de bacteriële gemeenschap in elk monster van experiment 1. NaN betekent dat het niet verder is geëncijferd.

3.1.3 Genera van ijzeroxiderende bacteriën

Naast vetzuren is ook ijzer gedoseerd aan het voedingswater van de biofilmmonitoren tijdens experiment 1. Dit ijzer is als driewaardig ijzer gedoseerd, de geoxideerde vorm van ijzer. Mocht dit ijzer in de biofilm worden gereduceerd tot tweewaardig ijzer, dan is de verwachting dat ijzeroxiderende bacteriën toenemen, omdat deze bacteriën tweewaardig kunnen oxideren tot driewaardig ijzer. Met de verkregen 16S rRNA gensequenties kan worden nagegaan of bij deze doseringen genera die behoren tot ijzeroxiderende kunnen worden aangetroffen. Mogelijke genera met bacteriën die ijzer kunnen oxideren zijn *Gallionella* en *Leptothrix* (BTO 2015.032).

In eerste instantie is achterhaald of bij de monitoren waaraan ijzer was gedoseerd vaker *Gallionella* en *Leptothrix* werd aangetroffen tijdens experiment 1. *Leptothrix* is niet aangetroffen in de monsters van experiment 1, maar *Gallionella* wel. De relatieve abundantie van *Gallionella* ten opzichte van twee dominant aanwezige genera (*Methylibium* en *Acidovorax*) is weergegeven voor experiment 1 (Figuur 10). Uit deze data volgde dat *Gallionella* niet of amper voorkomen in de monsters van experiment 1 en dat ijzeroxidatie geen belangrijk proces lijkt te zijn in de biofilmmonitoren, ook niet voor degene waar driewaardig ijzer aan is gedoseerd.



Figuur 10 De verdeling van de 16S rRNA gensequenties behorende tot twee abundante bacteriegenera (*Methylibium* en *Acidovorax*) en de genera *Gallionella*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* en *Stenotrophomonas* in water en biofilmmonsters van experiment 1.

3.1.4 Opportunistische ziekteverwekkers

Naast *Gallionella* en *Leptothrix* zijn ook de genera van de gedoseerde bacteriële opportunistische ziekteverwekkers (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*) weergegeven in Figuur 10. Hoewel tijdens experiment 1 geen opportunistische ziekteverwekkers werden gedoseerd, werden de genera *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* en *Mycobacterium* wel in een aantal monsters waargenomen. Het is echter aannemelijk dat de aanwezige bacteriën van deze genera niet tot opportunistische ziekteverwekkende soorten binnen het genus behoren, aangezien deze opportunistische ziekteverwekkers niet eerder zijn aangetroffen in het gedistribueerde drinkwater van productielocatie Tull en 't Waal (pers. comm. Paul van der Wielen).

Hoewel in experiment 1 dus geen inoculum van opportunistische ziekteverwekkers aan het drinkwater werd gedoseerd, werd *Aspergillus fumigatus* met qPCR in de biofilm aangetoond (Tabel 4). In de meeste biofilmmonsters was de *A. fumigatus* genkopieconcentratie in de biofilm echter onder de detectielimiet, met uitzondering van een enkel meetpunt. Uitzondering hierop was dat op dag 2 in alle biofilmmonsters, ongeacht de dosering, genkopieën van *A. fumigatus* in lage concentraties werden aangetroffen in de biofilm, maar blijkbaar kan de schimmel zich niet vestigen en/of handhaven want in latere monsters werd op één monster na *A. fumigatus* niet langer aangetroffen boven de detectielimiet. In de watermonsters werd *A. fumigatus* niet aangetroffen. *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium kansasii* en *Stenotrophomonas maltophilia* werden met qPCR niet aangetroffen in zowel het water als in de biofilm. Dat is dus volgens verwachting omdat tijdens experiment 1 deze micro-organismen niet zijn gedoseerd.

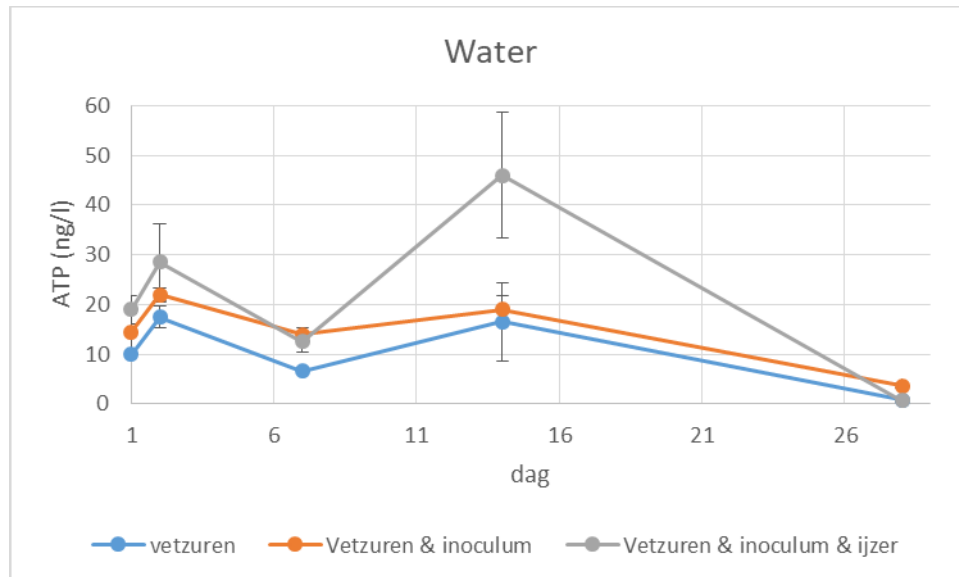
Tabel 4 Resultaten van qPCR *Aspergillus fumigatus* (genkopieën/cm²) in de biofilm van experiment 1.

| Aspergillus fumigatus (genkopieën/cm ²) | | | |
|---|----------|----------|----------------|
| Dag | Vetzuren | Controle | Vetzuren-ijzer |
| 1 | <5,0 | <5,2 | <4,4 |
| 2 | 18 | 32,2 | 10,1 |
| 7 | <5,3 | <4,5 | <6,3 |
| 14 | <4,5 | 9 | <5,2 |

3.2 Experiment 2 invloed van dosering vetzuren, ijzer en opportunistische ziekteverwekkers

3.2.1 ATP en ijzer

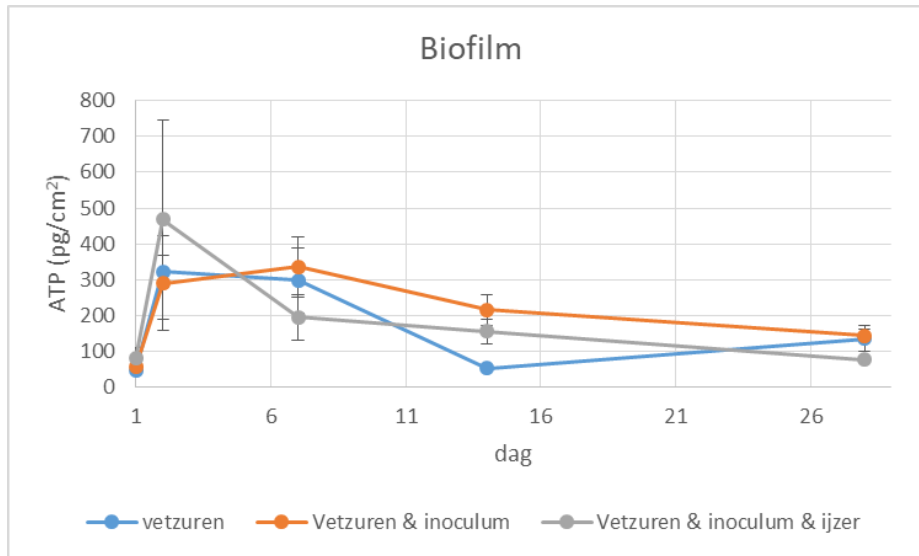
De ATP-resultaten van de watermonsters van experiment 2 zijn weergegeven in Figuur 11. De ATP-concentratie van het water was op een aantal meetmomenten het hoogst voor de biofilmmonitoren waar naast het inoculum van opportunistische ziekteverwekkers ook vetzuren en ijzer aan het water was gedoseerd (0-45 ng/l ATP), wat vergelijkbaar was met de resultaten van experiment 1 (zonder inoculumdosering). De ATP-concentratie in water was het laagst bij de biofilmmonitoren die werden gevoed met water waar alleen vetzuren aan zijn gedoseerd (0 – 18 ng/l ATP). De ATP-concentratie in het water bij de biofilmmonitoren waar vetzuren samen met een inoculum was gedoseerd aan het water lag tussen de beide andere condities in (5 – 20 ng/l ATP). Voor alle doseringen fluctueerde de ATP-concentratie tussen dag 0 en 14, maar nam tussen dag 14 en 28 af, wat tijdens experiment 1 niet is waargenomen.



Figuur 11 De ATP-concentratie in het drinkwater van experiment 2 waar vetzuren, vetzuren-inoculum en vetzuren-inoculum-ijzer aan het water werden gedoseerd voordat het door de hexamonitor stroomde. De standaarddeviatie is bepaald middels de standaardafwijking.

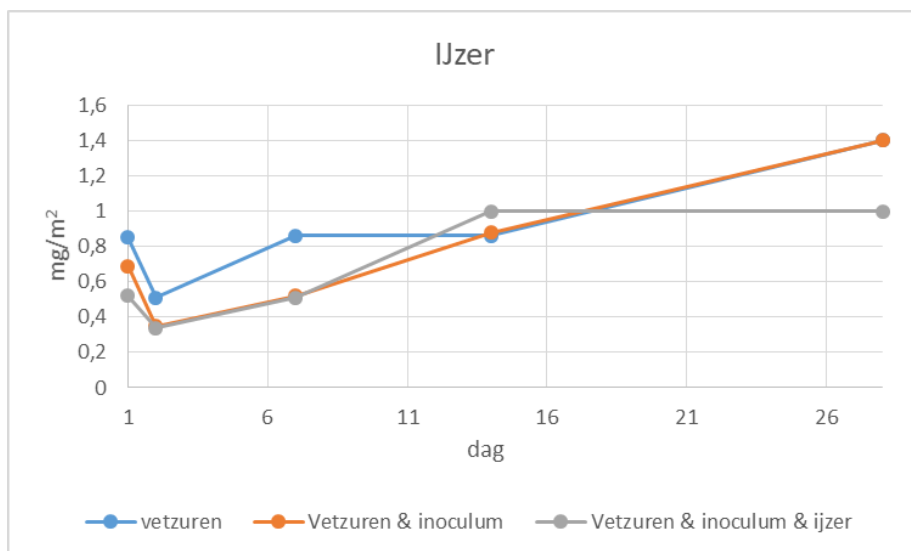
De ATP-concentratie in de biofilm was op dag 1 voor alle doseringen gemiddeld 61 pg/cm² (Figuur 12), wat lager was dan de ATP-concentraties in de biofilm die op dag 1 werden aangetroffen in experiment 1. Van dag 1 naar dag 2 nam de ATP-concentratie toe in de biofilm, ongeacht de toegepaste dosering aan het drinkwater. Op deze dag 2 was de ATP-concentratie van de biofilm in de monitoren die werden gevoed met water waar vetzuren of vetzuren en inoculum aan zijn gedoseerd, gemiddeld rond de 300 pg/cm². De ATP-concentratie van de biofilm in de monitoren gevoed met water waar vetzuren, inoculum en ijzer zijn gedoseerd was met 470 pg/cm² op dag 2

duidelijk hoger. Voor de biofilmmonitoren gevoed met water met vetzuren of vetzuren en inoculum bleef de ATP-concentratie in de biofilm redelijk gelijk tot dag 7, waarna de concentraties daalde tot dag 28 naar ongeveer 140 pg ATP/cm². In de biofilm van de biofilmmonitoren waar vetzuren, inoculum en ijzer werden gedoseerd, daalde de ATP-concentratie van dag 2 tot dag 7 (naar 200 pg/cm²), waarna de ATP-concentratie verder daalde tot dag 28 (67 pg ATP/cm²). In grote lijnen kwamen de ATP-concentraties in de biofilm en het verloop van de ATP-concentraties overeen met de resultaten van experiment 1.



Figuur 12 De ATP-concentratie in de biofilm van experiment 2 waar vetzuren, vetzuren+inoculum of vetzuren+inoculum+ijzer werden gedoseerd aan het voedingswater van de hexamonitor. De standaarddeviatie is bepaald middels de standaardafwijking.

De ijzerconcentratie in de biofilm was op dag 1 voor de drie toegepaste doseringen hoger dan op dag 2 en na dag 2 nam de ijzerconcentratie in de biofilm langzaam toe voor alle drie de doseringen (Figuur 13). De ijzerconcentratie in de biofilm van de biofilmmonitor waar vetzuren of vetzuren en inoculum werd gedoseerd, nam vanaf dag 14 toe van 0,87 mg/m² naar 1,4 mg/m² op dag 28. De ijzerconcentratie van de biofilm voor de monitoren gevoed met drinkwater waar vetzuren, inoculum en ijzer aan werden gedoseerd, is op dag 14 en dag 28 1,0 mg/m². Deze ijzerconcentraties zijn lager dan gevonden in experiment 1, behalve voor dag 1.



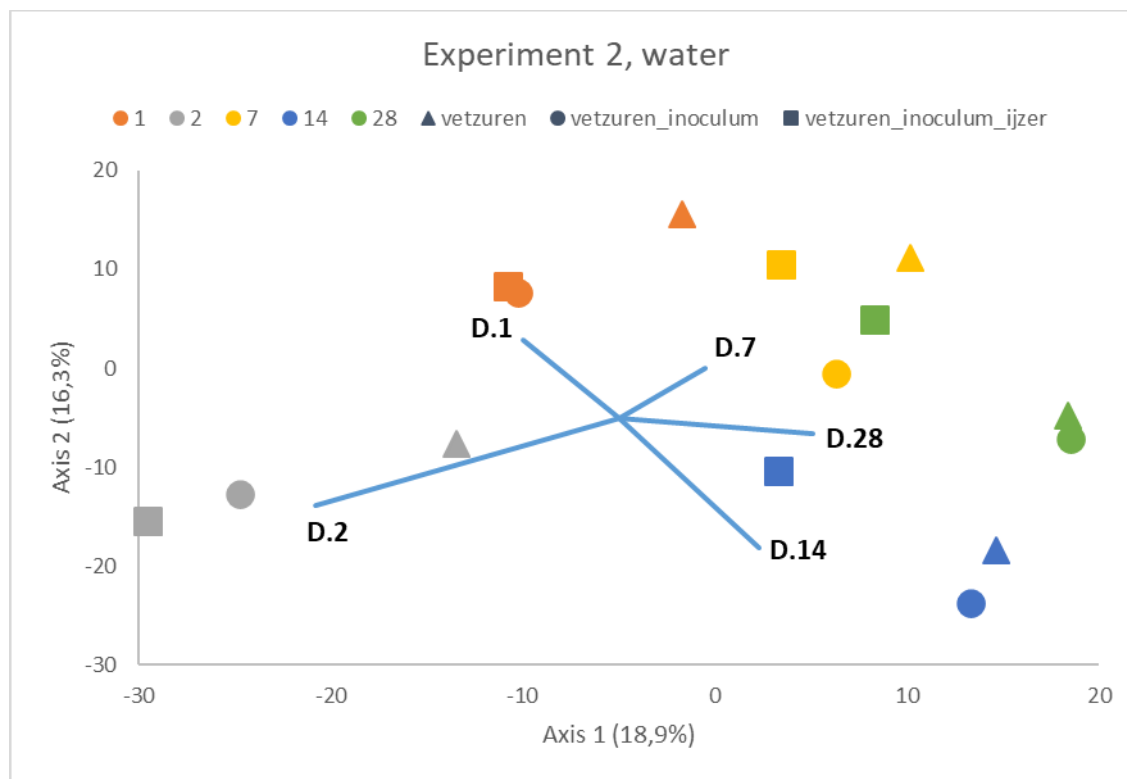
Figuur 13 De ijzerconcentratie in de biofilm van experiment 2 waar vetzuren, vetzuren+inoculum of vetzuren+inoculum+ijzer werden gedoseerd aan het voedingswater van de hexamonitor.

3.2.2 Microbial profiling

Naast bovenstaande parameters werd ook de samenstelling van de bacteriële gemeenschap vergeleken met behulp van microbial profiling. De samenstelling van de bacteriële populatie van het water en de biofilm van alle biofilmmonitoren is geanalyseerd met Principal Coordinates Analysis (PCoA) analyse en een permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). Een PCoA is een manier om de verschillen in soortensamenstelling van de bacteriegemeenschap van de individuele monsters uit een dataset te visualiseren en met elkaar te vergelijken (in dit geval des te dichter monsters bij elkaar liggen, des te minder de bacteriesamenstelling verschillen). En met de PERMANOVA werd getest of de verschillen in de samenstelling van de bacteriegemeenschap statistisch significant zijn.

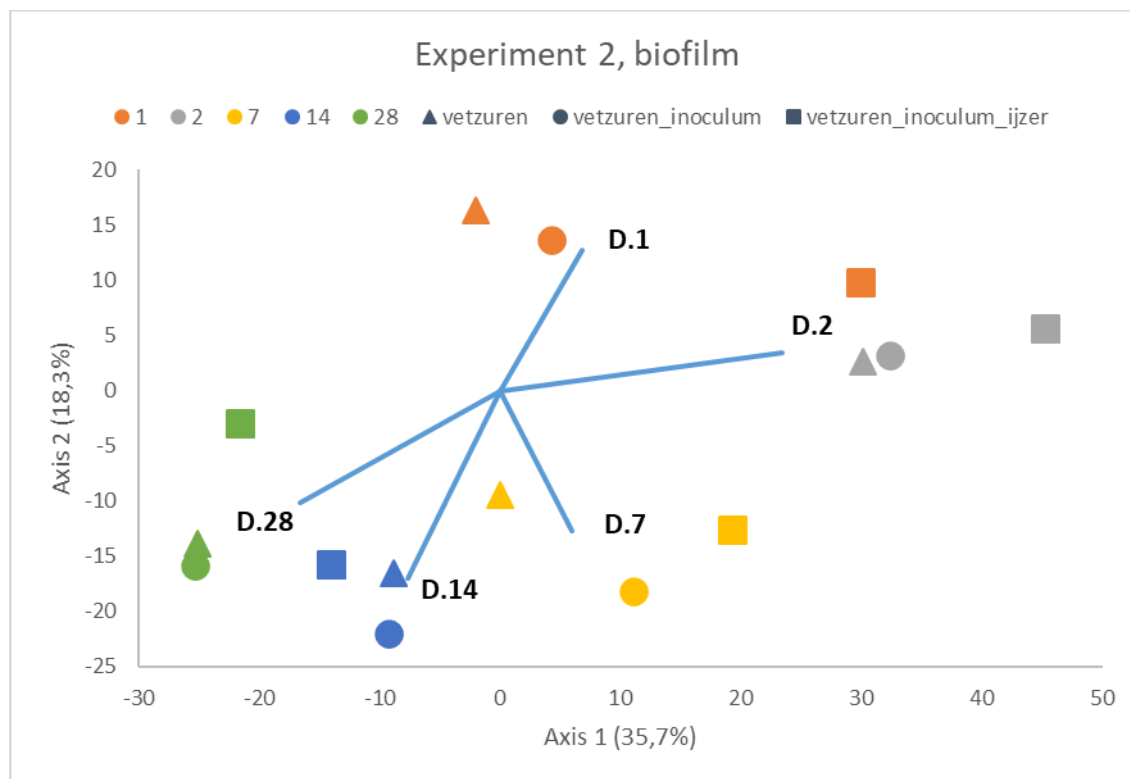
3.2.2.1 Resultaten PCoA-analyses

De resultaten van de PCoA-analyses van de watermonsters van experiment 2 is weergegeven in Figuur 14. Uit de resultaten volgde dat over het algemeen de samenstelling van de bacteriegemeenschap iedere monsterdag apart clusterd van de andere monsterdagen. De watermonsters clusteren op sommige monsterdagen ook op type dosering aan het water. Op dag 1 en 2 clusteren de watermonsters waaraan vetzuren en inoculum of vetzuren, ijzer en inoculum meer samen dan met het watermonster waar alleen vetzuren aan zijn gedoseerd. In contrast hiermee was de waarneming dat op dag 14 en 28 de watermonsters waaraan vetzuren of vetzuren en inoculum meer samenclusteren dan het watermonster waar vetzuren, ijzer en inoculum aan zijn gedoseerd. Op dag 7 lagen de monsterpunten van het water met de verschillende doseringen dicht bij elkaar. De bacteriegemeenschap van het water verschilde significant van elkaar op de monsterdagen volgens de permanova-analyse ($p < 0,05$). De verschillende doseringen hebben geen significant effect op de bacteriesamenstelling volgens de permanova analyse ($p > 0,05$), maar de verschillen zijn niet groot genoeg om te achterhalen welke doseringen van elkaar verschilden. Met name de bacteriële populatie op de verschillende monsterdagen verschoven op de x-as (van midden naar links en dan naar rechts), terwijl op de y-as de populaties tussen de verschillende doseringen en tussen enkele monsterdagen verschoven. Ook voor experiment 2 is dus gevonden dat de invloed van de monsterdag op de bacteriesamenstelling van het water groter is dan de invloed van de dosering.



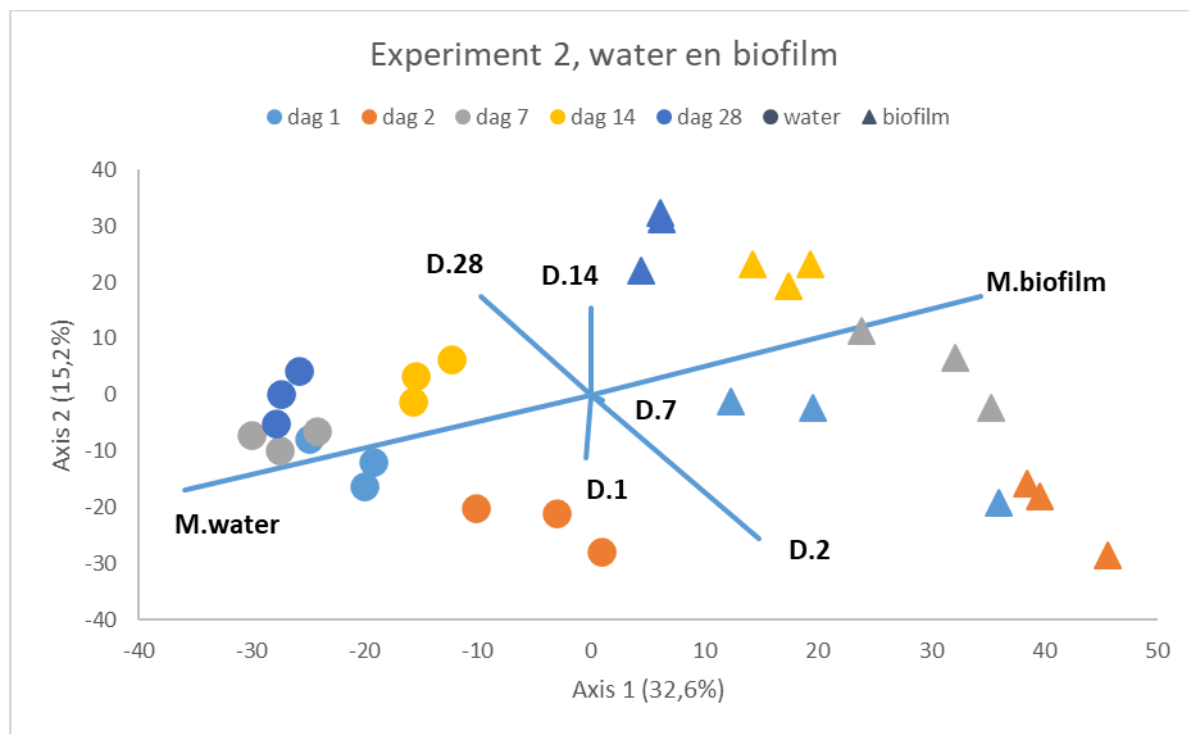
Figuur 14 De resultaten van de PCoA-analyse van de samenstelling van alle OTU's uit de watermonsters met verschillende doseringen (verschillende symbolen) en van verschillende monsterdagen (verschillende kleuren) van experiment 2.

Het resultaat van de PCoA-analyses van de biofilmmonsters van experiment 2 is weergegeven in Figuur 15. De resultaten laten zien dat over het algemeen de bacteriesamenstelling van iedere monsterdag apart clusterde van de andere monsterdagen, behalve voor monsterdag 1 met de vetzuren, ijzer en inoculumdosering die clusterde met de monsters van monsterdag 2. Op dag 1, 2 en 28 clusteren de biofilmmonsters van de monitoren waar vetzuren of vetzuren en inoculum aan het water waren gedoseerd meer samen dan die waar vetzuren, ijzer en inoculum aan het water zijn gedoseerd. Dus ijzer zorgde op die dagen voor een meer unieke bacteriële populatiesamenstelling in vergelijking met de biofilmmonsters waar geen ijzer aan was gedoseerd. Op dag 7 lag de samenstelling van de bacteriegemeenschap voor alle drie de doseringen verder uit elkaar, terwijl op dag 14 die voor alle drie de doseringen dicht bij elkaar lag. De bacteriesamenstelling van de biofilm op de verschillende monsterdagen waren significant verschillend van elkaar volgens de permanova-analyse ($p < 0,05$), behalve dag 1 & 14, 7 & 14 en 14 & 28. De biofilmsamenstelling tussen de verschillende doseringen zijn niet significant van elkaar volgens de permanova-analyse ($p > 0,05$). Met name de bacteriële populatie op de verschillende monsterdagen verschoven zowel op de x-as (van midden naar rechts en dan naar links) en y-as, terwijl de populaties tussen de verschillende doseringen in veel mindere mate verschoven op beide assen. Ook voor experiment 2 is dus gevonden dat de invloed van de monsterdag op de bacteriesamenstelling van het water groter is dan de invloed van de dosering.



Figuur 15 De resultaten van de PCoA-analyse van de samenstelling van alle OTU's van alle biofilmmonsters met verschillende doseringen (verschillende symbolen) en van verschillende monsterdagen (verschillende kleuren) van experiment 2.

De resultaten van de PCoA-analyses om de bacteriegemeenschappen van water en biofilm van experiment 2 te vergelijken, zijn weergegeven in Figuur 16. Uit deze analyse bleek dat de bacteriesamenstelling van water en biofilm significant van elkaar verschillen ($p < 0,05$). De monsterdag zorgde ook voor significante verschillen wanneer de bacteriesamenstelling van water en biofilm gezamenlijk werden geanalyseerd ($p < 0,05$), maar niet de dosering ($p > 0,05$).



Figuur 16 De resultaten van de PCoA-analyse van de samenstelling van alle OTU's uit de water- en biofilmmonsters met verschillende doseringen (verschillende symbolen) en van verschillende monsterdagen (verschillende kleuren) van experiment 2.

3.2.2.2 Resultaten taxonomie

Figuur 17 laat de verdeling van de 16S rRNA gensequenties over de taxonomische genera zien, waarbij alleen de genera zijn weergegeven van de top 30 die bijdragen aan de relatieve abundantie van de bacteriële gemeenschap in elk monster van experiment 2. Uit de resultaten van Figuur 21 volgde dat, ongeacht de dosering, een onbekende genus van *Beta-Proteobacteria* (NaN), *Pseudomonas*, *Aquabacterium*, *Sphingophyxis* en *Pelucibacter* relatief veel aanwezig waren gedurende de eerste dagen, maar dat deze in de tijd afnamen. Daarnaast werd voor 14 andere genera het tegenovergestelde waargenomen.

Voor experiment 2 werd ook waargenomen dat sommige genera meer aanwezig waren in de monitoren met een bepaalde dosering dan bij de monitoren met een andere doseringen. Voor de monsters genomen uit de monitor waaraan alleen vetzuren waren gedoseerd was het genus *Cupriavidus* meer aanwezig dan in de monitoren waar vetzuren en inoculum of vetzuren en ijzer werden gedoseerd. Tevens werd waargenomen dat *Lacibacter* relatief meer aanwezig is in de monitoren waar vetzuren en inoculum of vetzuren, ijzer en inoculum werden gedoseerd dan bij de monitoren waaraan alleen vetzuren werden gedoseerd. *Acidovorax* was relatief meer aanwezig in de monitoren waaraan vetzuren en inoculum werden gedoseerd dan in de andere monitoren. *Elusimicrobia* en *Zoogloea* waren minder aanwezig in de monsters van de monitoren waaraan vetzuren, ijzer en inoculum werden gedoseerd dan in de andere monitoren. *Bradyrhizobium* is juist meer aanwezig, met name op dag 28, in de monitoren waar vetzuren, ijzer en inoculum aan het water werden gedoseerd.

Als er specifiek werd gekeken naar het voorkomen van genera in water of biofilm, dan waren er zes genera die meer aanwezig zijn in water dan in biofilm in de top 30. Voor biofilm was dit maar één genera, in de top 30, namelijk *Methylibium*. Dit is overeenkomstig de waarnemingen van experiment 1.



Figuur 17 De verdeling van 16S rRNA gensequenties over de taxonomische genera, waarbij alleen de genera zijn weergegeven van de top 30 sequenties die bijdragen aan de relatieve abundantie van de bacteriële gemeenschap in elk monster van experiment 2. NaN betekent dat het niet verder is geïdentificeerd.

3.2.3 Genera van ijzeroxiderende bacteriën

Met de verkregen 16S rRNA gensequenties kon worden nagegaan of bij deze doseringen genera die behoren tot ijzeroxiderende bacteriën kunnen worden aangetroffen.

In eerste instantie is achterhaald of bij de monitoren waaraan ijzer is gedoseerd vaker *Gallionella* en *Leptothrix* wordt aangetroffen tijdens experiment 2. Zowel *Leptothrix* en *Gallionella* werden aangetroffen bij experiment 2. De relatieve abundantie van *Gallionella* en *Leptothrix* ten opzichte van twee dominant aanwezige genera (*Methylibium* en *Aquabacterium*) is weergegeven voor experiment 2 (Figuur 18). Uit deze data volgt dat *Gallionella* en *Leptothrix* niet of amper voorkomen in de monsters van experiment 2. Dus ook uit deze experimenten volgt dat de dosering van driewaardig ijzer niet resulteert tot hogere aantallen ijzeroxiderende *Gallionella* of *Leptothrix*. Het lijkt er dus op dat ook hier driewaardig ijzer niet in de biofilm werd gereduceerd tot tweewaardig ijzer, dat door *Gallionella* en/of *Leptothrix* kan worden omgezet.



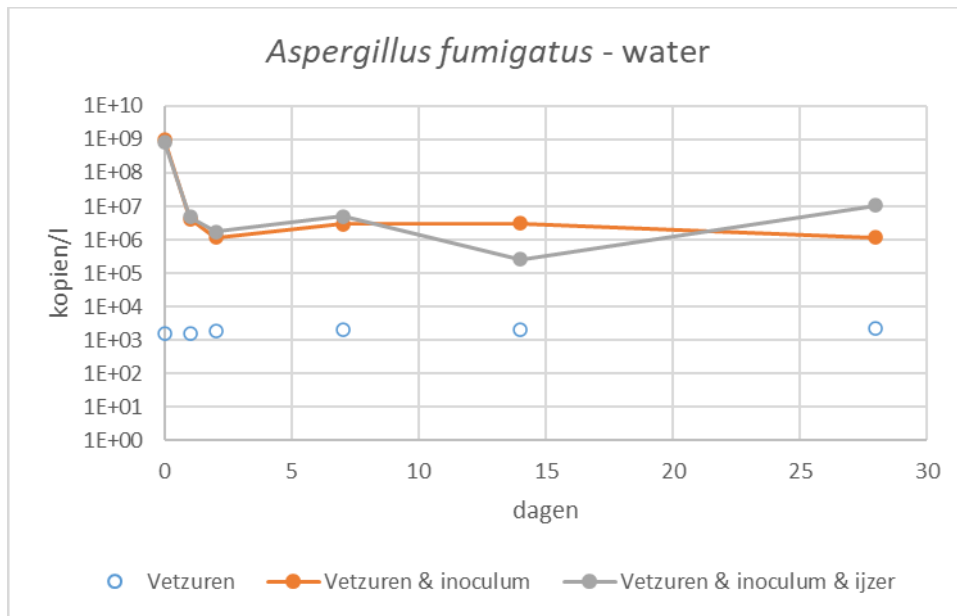
Figuur 18 De verdeling van 16S rRNA gensequenties behorende tot twee abundante bacteriegenera (*Methylibium* en *Aquabacterium*) en de genera *Gallionella*, *Leptothrix*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* en *Stenotrophomonas* in water en biofilmmonsters van experiment 2.

3.2.4 Opportunistische ziekteverwekkers

Naast *Gallionella* en *Leptothrix* zijn ook de genera van de gedoseerde bacteriële opportunistische ziekteverwekkers (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*) weergegeven in Figuur 24. *Pseudomonas* was de eerste dagen in hogere relatieve abundantie aanwezig dan in de monitoren waar geen opportunistische ziekteverwekkers aan het water waren gedoseerd. Dit komt overeen met de qPCR-resultaten van *P. aeruginosa* (zie paragraaf 3.2.4.2), waaruit bleek dat met name de eerste 14 dagen *P. aeruginosa* in verhoogde aantallen werd waargenomen in de monitoren gevoed met water met een inoculum van opportunistische ziekteverwekkers. Over de gehele onderzoeksperiode werd *Mycobacterium* in hogere relatieve abundantie aangetroffen in de monsters van de monitoren gevoed met water waaraan *M. kansasii* was gedoseerd dan in de monsters van de monitoren zonder dosering met een inoculum. Deze waarneming komt overeen met de qPCR-resultaten van *M. kansasii* (paragraaf 3.2.4.3), die lieten zien dat over de gehele onderzoeksperiode de aantallen *M. kansasii* hoger was in de monitoren waaraan *M. kansasii* was gedoseerd dan in de monitoren zonder deze dosering. *Stenotrophomonas* is niet of in zeer lage relatieve abundantie waargenomen in de biofilmmonitoren tijdens experiment 2, overeenkomstig de qPCR-resultaten van *S. maltophilia* (paragraaf 3.2.4.4).

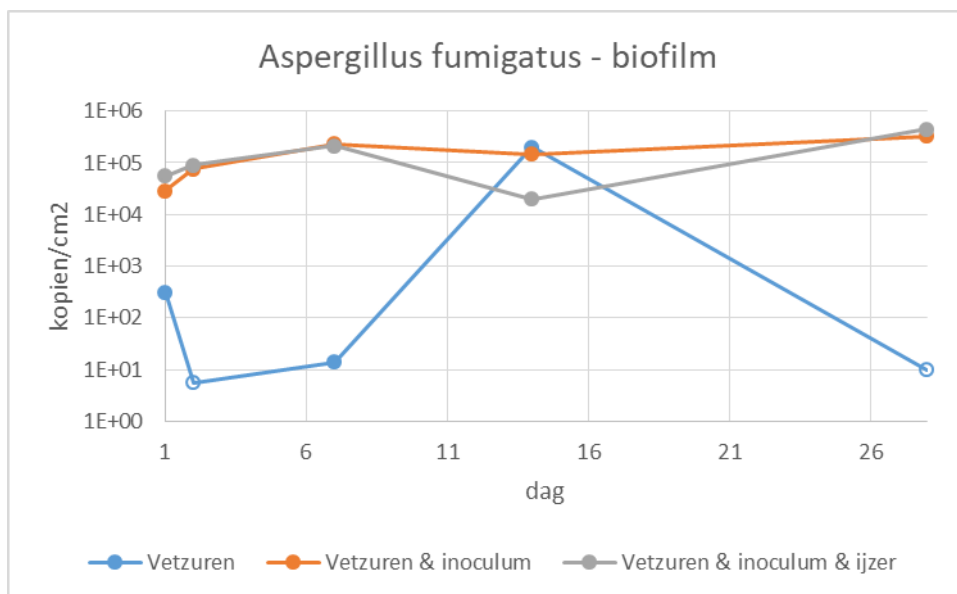
3.2.4.1 *Aspergillus fumigatus*

In Figuur 19 zijn de resultaten weergegeven van de qPCR voor *A. fumigatus* in het water; de genkopieën variëren tussen de $2,6 \times 10^5$ en $1,1 \times 10^7$ per liter voor het water waar vetzuren en inoculum of vetzuren, ijzer en inoculum aan werden gedoseerd. De genkopieën van *A. fumigatus* bleven in deze twee watertypen redelijk constant in de tijd. In het water waar alleen vetzuren aan werden gedoseerd, werden zoals verwacht geen genkopieën van *A. fumigatus* aangetroffen. In Figuur 19 is dit aangegeven als open bolletjes wat de detectielimiet aangeeft.



Figuur 19 Het aantal genkopieën per liter van het 28S rRNA gen van *Aspergillus fumigatus* in het water van experiment 2, open bolletjes geven een detectielimiet weer.

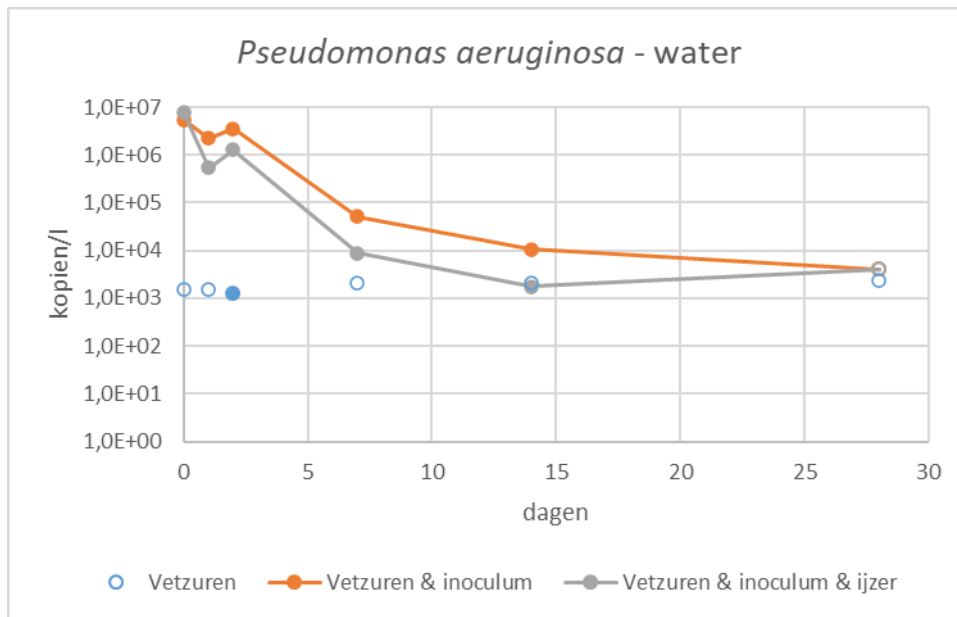
In Figuur 20 zijn de resultaten weergegeven van de qPCR-resultaten voor *A. fumigatus* in de biofilm van experiment 2. Het aantal genkopieën van *A. fumigatus* in de biofilm varieerde tussen de $1,4 \times 10^1$ en $4,5 \times 10^5$ per cm^2 voor de monitoren die werden gevoed met water waaraan vetzuren en inoculum of vetzuren, ijzer en inoculum werden gedoseerd. Er lijkt een lichte toename in het aantal genkopieën van *A. fumigatus* te zijn tussen dag 1 en 7, daarna blijven de aantallen redelijk stabiel. Voor de monitoren waar water met alleen vetzuren werd gebruikt, was het aantal genkopieën van *A. fumigatus* over het algemeen veel lager met op dag 1 $3,1 \times 10^2$ gk per cm^2 , op dag 4 $1,4 \times 10^1$ gk per liter en op dag 14 was de concentratie $2,0 \times 10^5$ gk per cm^2 . Op dag 2 en 28 waren de aantallen *A. fumigatus* echter beneden de detectielimiet. Het is onduidelijk of de hoge concentraties in de biofilm op dag 14 is veroorzaakt door vermeerdering van *A. fumigatus* in het systeem of dat tijdens het inzetten van de monsters, de monsters met hoge aantallen *A. fumigatus* de monsters met lage aantallen hebben gecontamineerd.



Figuur 20 Het aantal genkopieën per cm^2 van het 28S rRNA gen van *Aspergillus fumigatus* in de biofilm van experiment 2, open bolletjes geven een detectielimiet weer.

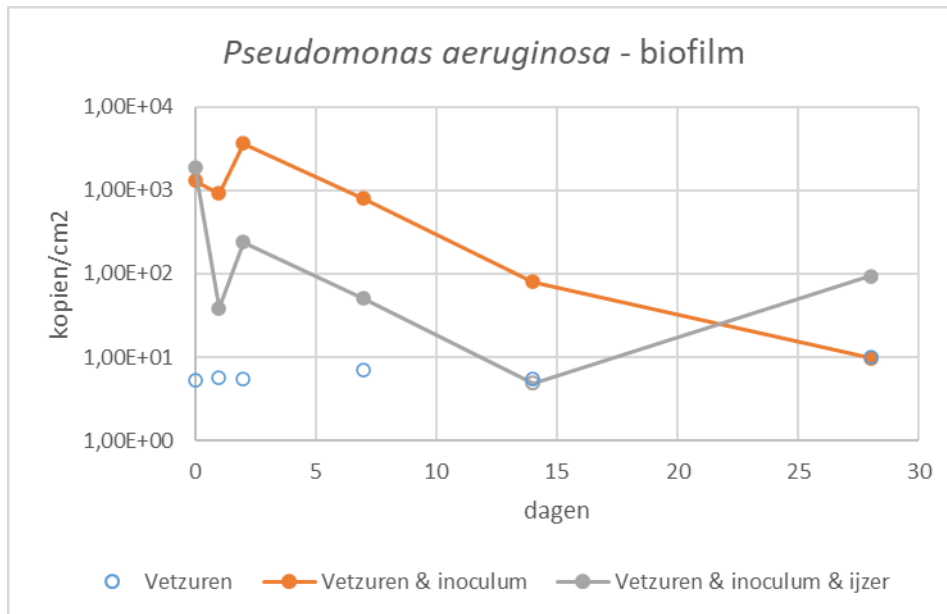
3.2.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

In Figuur 21 zijn de resultaten weergegeven van de qPCR voor *P. aeruginosa* in het water van experiment 2. De genkopieën van *P. aeruginosa* varieerde tussen de $1,3 \times 10^3$ en $7,8 \times 10^6$ per liter voor het water waar vetzuren en inoculum of vetzuren, ijzer en inoculum werden gedoseerd; op dag 28 was voor beide doseringen de concentratie genkopieën beneden de detectielimiet. De genkopieconcentraties van *P. aeruginosa* in het water waren op dag 1 en 2 het hoogst en namen daarna in de tijd af naar onder de detectiegrens ($\sim 1,0 \times 10^4$ gk/l). Voor het water waar alleen vetzuren aan werden gedoseerd, was op dag 2 de concentratie $1,3 \times 10^3$ gk per liter, voor de overige dagen was de concentratie *P. aeruginosa* beneden de detectielimiet.



Figuur 21 Het aantal genkopieën van het *regA* gen van *Pseudomonas aeruginosa* in het water (genkopieën/l) van experiment 2, open bolletjes geven een detectielimiet weer.

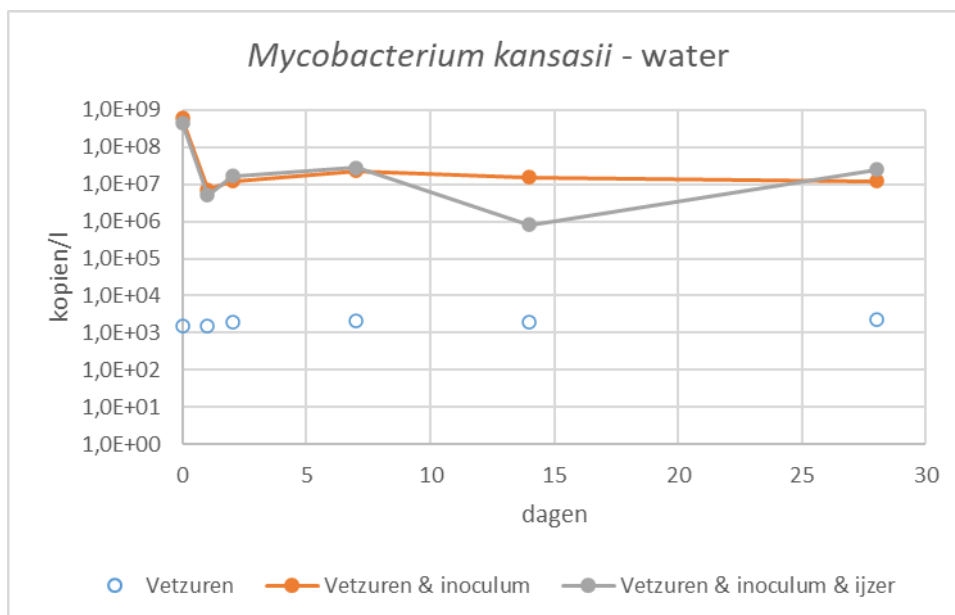
In Figuur 22 zijn de resultaten weergegeven van de qPCR voor *P. aeruginosa* in de biofilm van experiment 2. De genkopieën van *P. aeruginosa* namen van dag 1 tot dag 2 toe voor de monitoren die werden gevoed met drinkwater waar vetzuren en inoculum aan was gedoseerd. Na dag 2 namen de aantallen *P. aeruginosa* af tot rond de detectiegrens op dag 28 ($1,0 \times 10^2$ gk per cm^2). Ook voor de monitoren waar drinkwater met vetzuren, ijzer en inoculum werd gebruikt namen de aantallen genkopieën van *P. aeruginosa* toe van dag 1 tot dag 2. Daarna namen de aantallen af tot beneden de detectielimiet op dag 14, maar van dag 14 tot 28 nam de concentratie weer toe naar $9,5 \times 10^1$ per cm^2 . Op basis van de resultaten van *P. aeruginosa* in water en biofilm lijkt het dus of *P. aeruginosa* zich over het algemeen alleen kortstondig kan vestigen en handhaven onder de condities waarbij vetzuren en inoculum en vetzuren, ijzer en inoculum aan het water werden gedoseerd. *P. aeruginosa* werd niet aangetroffen in de biofilm van de monitoren die werden gevoed met drinkwater waar alleen vetzuren aan zijn gedoseerd.



Figuur 22 Het aantal genkopieën van het *regA* gen van *Pseudomonas aeruginosa* in de biofilm (genkopieën/cm²) van experiment 2, open bolletjes geven een detectielimiet weer.

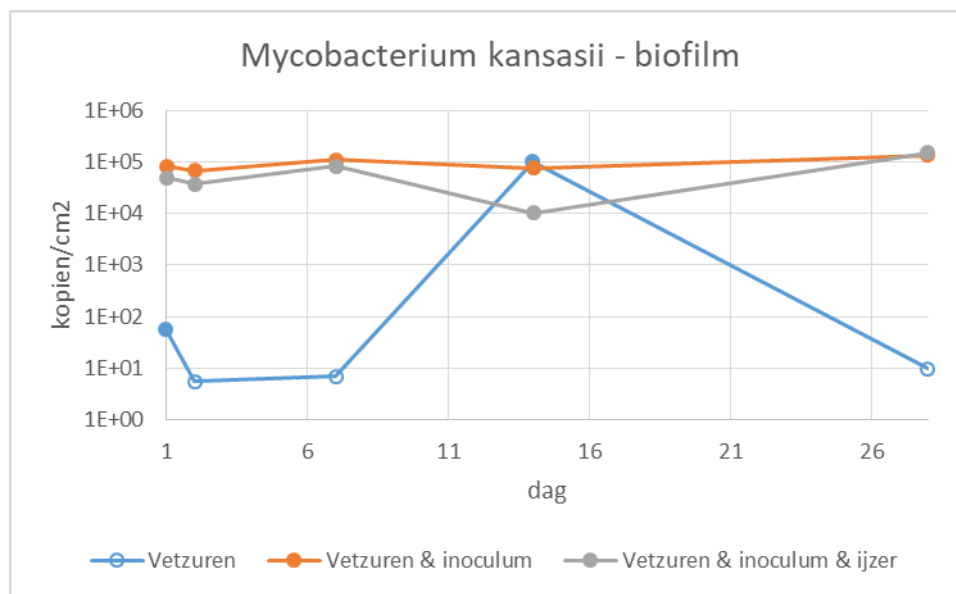
3.2.4.3 *Mycobacterium kansasii*

In Figuur 23 zijn de resultaten weergegeven van de qPCR van *M. kansasii* in het water van experiment 2. De genkopieën van *M. kansasii* variëren tussen de $5,9 \times 10^5$ en $8,2 \times 10^8$ per liter voor het water waaraan vetzuren en inoculum of vetzuren, ijzer en inoculum werden toegevoegd. De genkopieën van *M. kansasii* waren voor beide doseringen redelijk constant in de tijd. In het water waar alleen vetzuren, maar geen inoculum van opportunistische ziekteverwekkers was gedoseerd, werden geen genkopieën van *M. kansasii* aangetroffen en alle concentraties zijn dus beneden de detectielimiet.



Figuur 23 Het aantal 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium kansasii* in het water (genkopieën/l) van experiment 2, open bolletjes geven een detectielimiet weer.

In Figuur 24 zijn de resultaten weergegeven van de qPCR-resultaten van *M. kansasii* in de biofilm van experiment 2. De 16S rRNA genkopieën van *M. kansasii* varieerde tussen de $1,0 \times 10^4$ en $1,5 \times 10^5$ per cm^2 voor de monitoren waar vetzuren en inoculum of vetzuren, ijzer en inoculum aan het voedingswater werden toegevoegd. De genkopieën van *M. kansasii* in de biofilm bleven bij deze twee doseringen ook redelijk constant in de tijd. In de biofilm van de monitoren waar water met alleen vetzuren werd gebruikt, werden alleen op dag 1 en dag 14 genkopieën van *M. kansasii* aangetroffen met concentraties van $5,7 \times 10^1$ en $9,8 \times 10^4$ per cm^2 respectievelijk. Evenals bij *A. fumigatus* werd dus ook voor *M. kansasii* hoge afwijkende concentraties in de biofilm waargenomen op dag 14. Het blijft echter onduidelijk of de hoge concentraties in de biofilm op dag 14 is veroorzaakt door vermeerdering van *A. fumigatus* en *M. kansasii* in het systeem of dat tijdens het inzetten van de monsters, de monsters met hoge aantallen *A. fumigatus* en *M. kansasii* de monsters met lage aantallen hebben gecontamineerd.



Figuur 24 Het aantal 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium kansasii* in de biofilm (genkopieën/ cm^2) van experiment 2, open bolletjes geven een detectielimiet weer.

3.2.4.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

Ondanks dat *S. maltophilia* ook aanwezig was in het inoculum dat binnen experiment 2 aan een aantal monitoren werd gedoseerd, werd *S. maltophilia* niet aangetroffen in zowel alle water- en biofilmmonsters die in experiment 2 zijn geanalyseerd met qPCR. *S. maltophilia* heeft zich dus niet kunnen vestigen en handhaven in de biofilmmonitoren.

4 Discussie

4.1 Dosering van vetzuren

Het doel van het onderzoek was om te achterhalen wat de invloed van vetzuren is op groei van bacteriën in de biofilm en water. Deze vraag volgde uit het onderzoek van fase 1 van het project waarin werd gekeken naar metabole processen die dominant kunnen zijn in biofilm van een drinkwaterdistributiesysteem. Daaruit volgde dat met name functionele genen werden gevonden die betrokken zijn bij de afbraak of vorming van vetzuurketens.

De vetzuurdosering in vergelijking met de controle zonder verzuurdosering laat verschillen zien in de concentratie ATP, in water was de concentratie in het begin gelijk maar op dag 26 is het verschil groot en is de ATP concentratie bij de conditie vetzuren rond de 30 pg/ml en bij de conditie controle rond de 10 ng/l. Ook in biofilm is de ATP concentratie met vetzuren hoger dan bij de controle. Deze toename is volgens verwachting, omdat met de dosering van 10 µg C/l vetzuren aan het water, meer afbreekbare stoffen voor bacteriën beschikbaar zijn dan in de controle. Omzetting van (een deel) van deze extra afbreekbare stoffen leidt dan tot een hogere concentratie actieve biomassa in zowel water als biofilm.

De toevoeging van vetzuren heeft geen significant effect laten zien op de microbiële populatie. Dit laat dus zien dat toevoeging van vetzuren wel leidt tot hogere biomassaconcentraties, maar niet tot een significant andere bacteriesamenstelling. Daaruit kan worden geconcludeerd dat de bacteriën die van nature aanwezig zijn in drinkwater en drinkwatergerelateerde biofilms goed in staat zijn om vetzuren af te breken, zoals is gezien in het rapport waar dit onderzoek op is gebaseerd (Learbuch & Timmers, 2020). Daarmee lijken vetzuren dus waarschijnlijk een belangrijk substraat te zijn in drinkwaterdistributiesystemen.

Ondanks dat de algehele bacteriesamenstelling niet significant veranderde door de vetzuurdosering, werd wel waargenomen dat meer bacteriën behorende tot het genus *Aquabacterium* aanwezig waren in de monsters uit de monitoren zonder vetzuurdosering dan in de monsters uit de monitoren die werden gevoed met water waar vetzuren of vetzuren en ijzer werden gedoseerd. Deze waarneming is echter niet consequent, omdat in experiment 2 *Aquabacterium* ook relatief dominant aanwezig was in de monsters uit de monitoren waaraan vetzuren werden gedoseerd. Een consequente waarneming in beide experimenten is wel dat bacteriën van het genus *Cupriavidus* alleen dominant aanwezig zijn wanneer alleen vetzuren aan de monitoren wordt gedoseerd. Daarbij wordt *Cupriavidus* alleen dominant waargenomen in de waterfase en niet in de biofilmfase. Het is onduidelijk waarom *Cupriavidus* wel dominant aanwezig is in de waterfase wanneer alleen vetzuren worden gedoseerd, maar niet wanneer naast vetzuren ook ijzer of een inoculum van opportunistische ziekteverwekkers werd gedoseerd.

De invloed van de dosering van acetaat op de biofilmconcentratie en -samenstelling is eerder onderzocht (van der Kooij & Veenendaal, 2012, Sack et al., 2014). De resultaten van die studies lieten zien dat de biofilmvorming sneller verliep en tot meer biofilm leidde dan bij drinkwater zonder toegevoegd acetaat. De ATP-concentraties van de biofilm waren wel hoger in deze twee eerdere studies dan in onze studie, terwijl in alle studies 10 µg C/l aan substraat werd gedoseerd. Dat verschil kan veroorzaakt zijn doordat acetaat tot meer ATP-vorming leidt, dan de andere vetzuren die in onze studie, naast 2,5 µg C/l acetaat, werden gedoseerd.

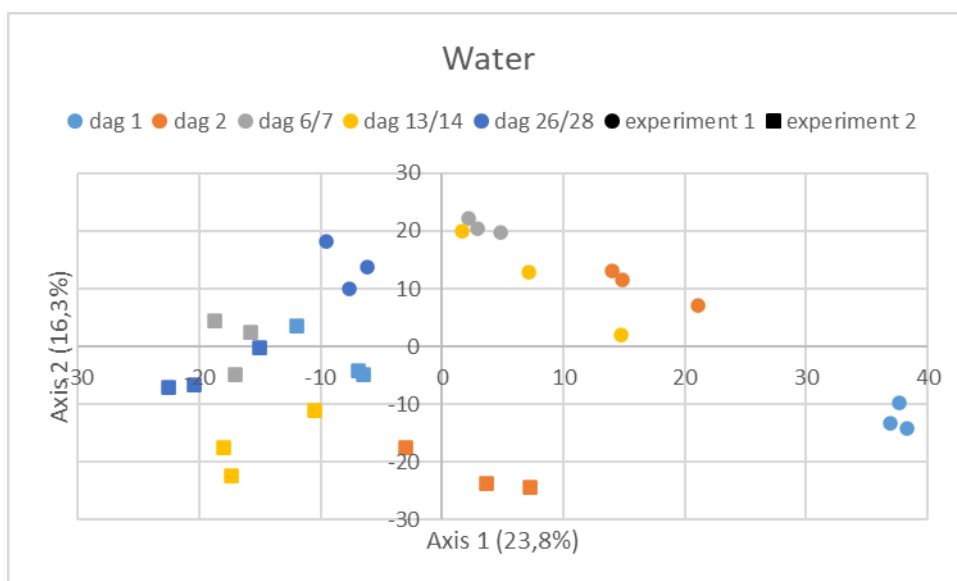
4.2 Dosering van ijzer en opportunistische ziekteverwekkers

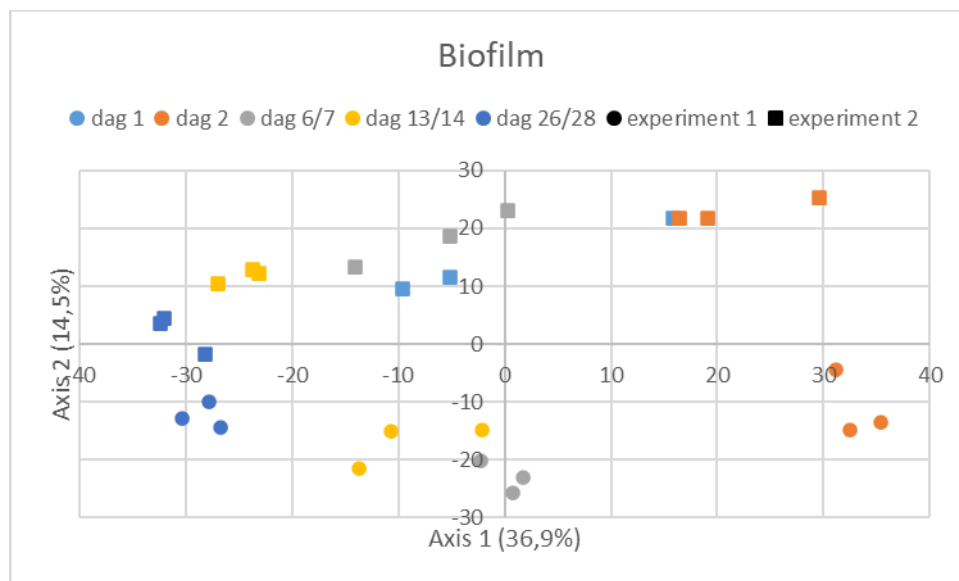
Er is ook gekeken naar de invloed van dosering van driewaardige ijzerionen, samen met vetzuren of vetzuren en inoculum. Voor de ATP concentratie in water en biofilm werden er geen duidelijke verschillen gevonden tussen de condities vetzuren en vetzuren-ijzer uit experiment 1 of vetzuren-inoculum – vetzuren-inoculum-ijzer uit experiment 2. Tijdens experiment 1 wordt alleen op dag 26 in de biofilm een hogere biomassa concentratie gemeten (Figuur 4), omdat op de andere dagen geen hogere biomassa is gemeten geeft dit als indicatie dat ijzer vrijwel geen rol speelt. Daarbij moet wel worden vermeld dat dit voor de eerste 26 dagen geldt, een langere termijn was geen onderdeel van deze studie.

Ook heeft de toevoeging van ijzer geen verschil laten zien op de microbiële populatie en specifiek in het voorkomen van *Gallionella* en *Leptothrix*, mogelijke bacteriën die ijzer kunnen oxideren. Hiermee lijkt de invloed van opgeloste driewaardig ijzerionen op de microbiologie in een drinkwatersysteem beperkt. IJzer kan echter ook voorkomen al tweewaardig ijzer of als ijzer(hydro)oxiden in het drinkwater en/of distributiesysteem. Om een definitieve conclusie over de rol van ijzer te kunnen geven, dienen aanvullende experimenten uitgevoerd te worden met deze andere ijzervormen dan opgeloste driewaardige ijzerionen.

De toevoeging van inoculum is niet los getest, maar altijd in combinatie met vetzuren of vetzuren & ijzer dosering. De toevoeging van inoculum had niet veel invloed op de ATP concentratie in zowel water als biofilm dan wanneer een inoculum niet was toegevoegd aan de vetzuren- of vetzuren & ijzerdosering. De resultaten van de qPCR's laten zien dat *A. fumigatus* en *M. kansasii* zich langdurig kunnen nestelen in de biofilm en het water wanneer ze gezamenlijk met vetzuren in concentratie van 10 µg C/l worden gedoseerd, terwijl *P. aeruginosa* met name in een korte periode zich weet te vestigen in de biofilm. Eerdere experimenten hebben laten zien dat deze opportunistische ziekteverwekkers zich niet konden handhaven in biofilmmonitoren die met het drinkwater van Tull en 'T Waal werden doorstroomd op het laboratorium van KWR (van der Wielen, 2014). Dit laat zien dat bij een bepaalde kritische grens van vetzuren, groei van deze opportunistische ziekteverwekkers mogelijk is en benadrukt dus ook het belang om lage concentraties aan vetzuren in het geproduceerde drinkwater te hebben.

4.3 Experiment 1 versus experiment 2





Figuur 25 De resultaten van de PCoA-analyse van de samenstelling van alle OTU's uit het drinkwater (A) en de biofilm (B) met dosering van alleen vetzuren op de verschillende monsterdagen (verschillende kleuren) tijdens experiment 1 of 2 (verschillende symbolen).

Gedurende zowel experiment 1 als experiment 2 was er een conditie waarbij alleen vetzuren zijn gedoseerd. Experiment werd daarbij uitgevoerd van 26-05-2020 tot en met 23-06-2020, terwijl experiment 2 werd uitgevoerd van 04-08-2020 tot en met 01-09-2020. De verschillen tussen de twee experimenten zijn klein voor de ATP-concentratie in water (Figuur 3 en 11). Voor de ATP-concentratie in de biofilm zijn de verschillen groter, waarbij tijdens experiment 1 een duidelijk hogere ATP-concentratie werd gevonden dan in experiment 2. Dit laat zien dat in de periode met de hoogste watertemperatuur (augustus 2020) de ATP-concentratie van de biofilm hoger was. De samenstelling van de microbiële populatie van water laat clustering zien op basis van experiment, waarbij de clustering van experiment 1 en 2 op de laatste monsterdag dichter bij elkaar liggen dan op de eerdere monsterdagen (Figuur 25). Voor de biofilm verschilt de samenstelling van de microbiële populatie ook tussen experiment 1 en 2 voor de eerste 13/14 monsterdagen, maar na 26/28 dagen is de samenstelling van de populatie in de biofilm voor beide experimenten vergelijkbaar. Dit laat dus zien dat bij start van het experiment er een invloed lijkt te zijn van het seizoen op de samenstelling van de bacteriepopulatie in water en biofilm wanneer vetzuren worden gedoseerd, maar dat de ontwikkeling van de bacteriële gemeenschap naar een vergelijkbare populatiesamenstelling ontwikkelt.

4.4 Maatregelen definiëren

Uit de resultaten van deze studie volgt dat vetzuren in belangrijke mate verantwoordelijk lijken voor groei van micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem en dat bij te hoge concentraties vetzuren opportunistische ziekteverwekkers in staat zijn om zich in het drinkwaterdistributiesysteem te vermeerderen. Om nagroei in het distributiesysteem te verlagen is het daarom zinvol om de concentratie aan vetzuren zo laag mogelijk te houden in het geproduceerde drinkwater. Vetzuren kunnen tot groei in het drinkwaterdistributiesysteem zorgen wanneer ze uit het laatste zuiveringsproces in het reinwater terecht komen of wanneer ze worden gevormd in het drinkwaterdistributiesysteem. Tot nu toe heeft onderzoek naar nagroei in drinkwater zich niet specifiek gericht op de verwijdering en vorming van vetzuren in de zuivering en/of drinkwaterdistributie. Het is daarom lastig om op basis van de resultaten uit deze studie maatregelen te kunnen definiëren die effectief zijn in het verlagen van vetzuren in het drinkwater.

Er wordt daarom voorgesteld om eerst gericht onderzoek te doen naar de vorming en verwijdering van vetzuren tijdens de zuivering. Zo is bekend dat bepaalde desinfectiezuiveringsprocessen (bv ozonisatie, UV, UV en

waterstofperoxide) leiden tot omzetting van organisch materiaal naar kortketenige vetzuren. Het actieve-koolproces dat vaak na deze desinfectie in de zuivering operationeel is, verwijdert een deel van deze vetzuren. De precieze verwijdering kan echter niet worden gemeten, omdat specifieke detectiemethoden voor lage concentraties aan vetzuren ontbreekt en waarnemingen over verwijdering zijn gebaseerd op bulkparameters zoals AOC of de BPP. Aanvullend onderzoek zou zich daarom als eerste moeten richten op toepassing van geschikte detectiemethoden voor lage concentraties van vetzuren, zoals eerder beschreven (van der Wielen & Vughs, 2020). Indien een dergelijke methodiek voor handen komt, dan kan ook gericht in het distributiesysteem worden onderzocht in hoeverre vetzuren worden gevormd of verwijderd tijdens distributie van het drinkwater. Zo heeft eerder onderzoek bij Evides laten zien dat waterpissebedden bijvoorbeeld vetzuren kunnen uitscheiden, die mogelijk weer door *Aeromonas* worden omgezet.

Wanneer resultaten verkregen zijn over de aanwezigheid en concentratie van verschillende vetzuren in het water na verschillende zuiveringsstappen en op verschillende locaties in distributiesystemen waar relatief veel nagroei optreedt, dan wordt duidelijk of eventuele maatregelen kunnen worden ingezet om gericht vetzuren in de zuivering te verwijderen of om (in)direct de vorming van vetzuren tijdens distributie te voorkomen. Indien blijkt dat directe maatregelen op verwijdering van vetzuren in de zuivering nodig zijn, dan kan bijvoorbeeld worden onderzocht wat de invloed is van aangepaste bedrijfsvoering van biologische zuiveringsprocessen op de verwijdering van vetzuren. Indien duidelijk wordt dat bepaalde processen in het distributiesysteem verantwoordelijk zijn voor substantiële vetzuurvorming (bijvoorbeeld als waterpissebedden een belangrijke rol spelen), dan dienen maatregelen te worden genomen om vermeerdering van waterpissebedden te voorkomen, waar ook aanvullend onderzoek voor nodig is.

5 Conclusie en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Op basis van de resultaten wordt het volgende geconcludeerd:

- De dosering van vetzuren aan drinkwater resulteerde niet in een significante verandering van de samenstelling van de bacteriegemeenschap, maar wel in verhoogde biomassaconcentraties. Daaruit wordt geconcludeerd dat de vetzuren (deels) worden afgebroken om biomassa te vormen en dat de van nature aanwezige bacteriesamenstelling in drinkwater en biofilm in staat is om vetzuren om te zetten. Deze bevinding impliceert dat vetzuren een belangrijk substraat kan zijn voor groei van micro-organismen in het drinkwatersysteem.
- De dosering van vetzuren aan drinkwater verhoogt dus de hoeveelheid biomassa in de biofilmmonitoren en kan ook leiden tot vermeerdering van sommige opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwatersysteem. Het is dus belangrijk om de concentratie vetzuren in het geproduceerde drinkwater en tijdens drinkwaterdistributie laag te houden.
- De additionele dosering van driewaardige ijzerionen aan drinkwater laat geen duidelijk effect zien op de biomassa. De toevoeging van ijzer heeft geen verschil laten zien op de microbiële populatie en specifiek in het voorkomen van *Gallionella* en *Leptothrix*, mogelijke bacteriën die ijzer kunnen oxideren. Hiermee lijkt de invloed van opgeloste driewaardig ijzerionen op de microbiologie in een drinkwatersysteem beperkt.
- De dosering van een inoculum van verschillende opportunistische ziekteverwekkers aan drinkwater laat zien dat dat *A. fumigatus* en *M. kansasii* zich langdurig kunnen nestelen in de biofilm en het water wanneer ze gezamenlijk met vetzuren in concentratie van 10 µg C/l worden gedoseerd. Dit laat zien dat bij een bepaalde kritische grens van vetzuren, groei van deze opportunistische ziekteverwekkers mogelijk is en benadrukt dus ook het belang om lage concentraties aan vetzuren in het geproduceerde drinkwater te hebben.

5.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten doen we de volgende aanbevelingen:

- Een methode te ontwikkelen waarmee de afzonderlijke vetzuren bij lage concentraties kunnen worden bepaald.
- Gericht onderzoek doen naar de vorming en verwijdering van vetzuren tijdens de zuivering.
- In het distributiesysteem onderzoeken in hoeverre vetzuren worden gevormd of verwijderd tijdens distributie van het drinkwater.
- Verder onderzoek doen door iedere vetzuur die in deze studie is gedoseerd ook apart te doseren in verschillende concentraties om te zien welke vetzuur de grootste invloed heeft op de biomassa en groei van opportunistische ziekteverwekkers.

- De vetzuren met de grootste impact ook doseren aan het KWR in vitro distributiesysteem (KIVODIS), omdat KIVODIS het distributiesysteem beter nabootst dan de gebruikte biofilmmonitoren. Hierdoor zijn de resultaten verkregen met KIVODIS (nog) beter vertaalbaar naar het distributiesysteem in de praktijk.

6 Referenties

da Silva Filho L.V., Tateno A.F., de Velloso L.F., Levi J. E., Fernandes S., Bento C.N., Rodrigues J.C. & Ramos S.R. (2004). Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatric Pulmonology*, 37, 537–547.

Learbuch, K.L.G. & Timmers, P.H.A. (2020). Microbiologische compositie en potentiële metabole processen tijdens drinkwaterdistributie. (BTO 2020.044) Nieuwegein, KWR.

Liu, G., Bakker, G. L., Li, S., Vreeburg, J.H., Verberk, J.Q., Medema, G. J., Liu, W.T. & van Dijk, J.C. (2014). Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. *Environmental Science Technology*, 48(10), 5467-5476. doi: 10.1021/es5009467

Liu, G., Tao, Y., Zhang, Y., Lut, M., Knibbe, W.-J., van der Wielen, P., Liu, W., Medema, G. & van der Meer, W. (2017). Hotspots for selected metal elements and microbes accumulation and the corresponding water quality deterioration potential in an unchlorinated drinking water distribution system. *Water Research*, 124, 435-445.

Roeselers, G., Coolen, J., van der Wielen, P. W. J. J., Jaspers, M. C., Atsma, A., de Graaf, B., & Schuren, F. (2015). Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environmental Microbiology*.

Sack, E.L.W., van der Wielen, P.W.J.J., & van der Kooij, D. (2014). Polysaccharides and Proteins Added to Flowing Drinking Water at Microgram-per-Liter Levels Promote the Formation of Biofilms Predominated by Bacteroidetes and Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2360-2371.

van der Kooij, D. & Bereschenko, L. (2015). De invloed van ijzer op de biomassa-accumulatie in de continue biofoulingmonitor (CBM) (BTO 2015.216(s)). Nieuwegein, KWR.

van der Kooij, D., A. Brouwer-Hanzens & H.R. Veenendaal. 2009. Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *Legionella anisa* in biofilms. (KWR 09.056). Nieuwegein, KWR.

van der Kooij, D. & Veenendaal, H.R. (2012). Bepaling van de biofilmvormende eigenschappen van drinkwater met de continue biofilmmonitor (CBM) (BTO 2011.050). Nieuwegein, KWR.

van der Wielen, P.W.J.J., Italiaander, R. & Heijnen, L. (2011). Kwantitatieve detectiemethoden voor opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. (BTO 2011.034(s)). Nieuwegein: KWR.

Van der Wielen, P.W.J.J. 2014. Rol van drinkwater, biofilm en temperatuur op groei van opportunistische pathogenen. (BTO 2014.217(s)), Nieuwegein, KWR.

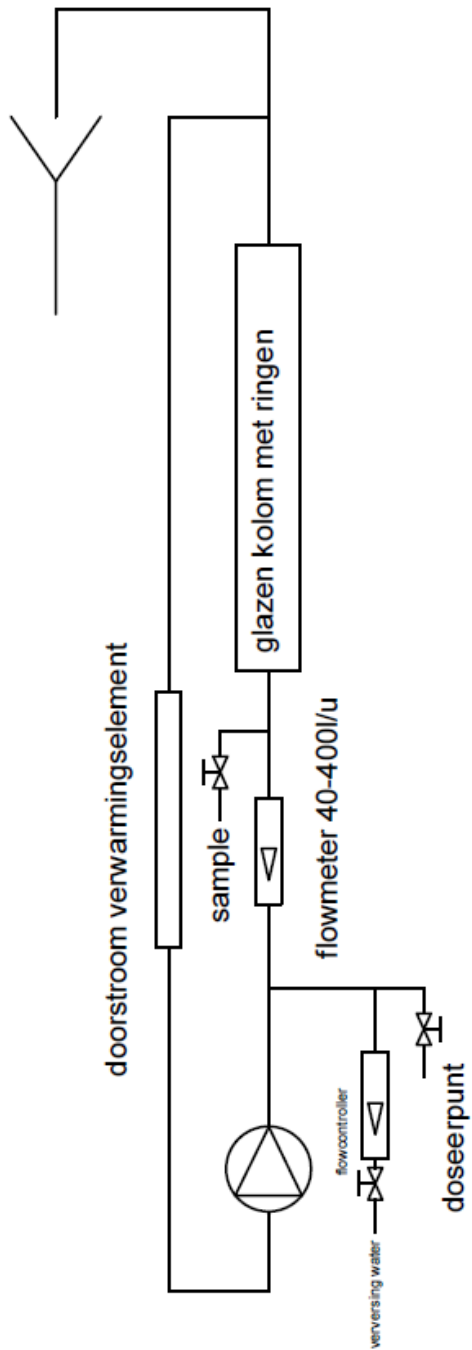
van der Wielen, P.W.J.J., Italiaander, R., Wullings, B.A., Heijnen, L. & van der Kooij, D. (2014), Opportunistic pathogens in drinking water in the Netherlands, in *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs*, edited by D. van der Kooij and P. W. J. J. van der Wielen, pp. 177-205, IWA Publishing, London, UK.

van der Wielen, P.W.J.J. & Lut, M. C. (2016). Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science and Technology: Water Supply*, ws2016023.

van der Wielen, P.W.J.J. & Vughs, D.M. (2020). Karakteriseren van biodegradeerbaar organisch koolstof in drinkwater (pp. 44). (BTO 2020.032). Nieuwegein, KWR.

Vavourakis, C.D., Heijnen, L., Peters, M C., Marang, L., Ketelaars, H.A. & Hijnen, W.A. (2020). Spatial and temporal dynamics in attached and suspended bacterial communities in three drinking water distribution systems with variable biological stability. *Environmental Science & Technology*, 54(22), 14535-14546.

I Bijlage Tekening hexamonitor



II Bijlage doseeroplossingen

Vetzuren

| Stof | Structuurformule | Aantal C-atomen | Totale molmassa stof | Afgewogen: Werkoplossing mg/100 ml MQ |
|------------|--|-----------------|----------------------|---------------------------------------|
| Formiaat | HCOONa | 1 | 68,01 | 353 |
| Acetaat | NaOOCCH ₃ .3H ₂ O | 2 | 136,08 | 348 |
| Propionaat | C ₃ H ₅ NaO ₂ | 3 | 96,06 | 166 |
| Butyraat | C ₄ H ₇ NaO ₂ | 4 | 110,09 | 143 |

Doseren 1 ml per stof in 5 liter Milli-Q

Ijzer

| Stof | Structuurformule | Aantal Fe-atomen | Totale molmassa stof | Afgewogen: Werkoplossing mg/5 l MQ |
|---------------------------------|--------------------------------------|------------------|----------------------|------------------------------------|
| ijzer(III)chloride hexa hydrate | FeCl ₃ .6H ₂ O | 1 | 270,3 | 12108 |

Doseren 0,5 ml per stof in 5 liter Milli-Q

Opportunistische pathogenen (Kolom is 300 ml)

| Micro-organisme | kve/ml | ml per stam enten per kolom | kve/per kolom |
|-------------------------------------|----------|-----------------------------|---------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9,73E+06 | 0,257 | 2,50E+06 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 2,77E+04 | 2,917 | 8,07E+04 |
| <i>Mycobacterium kansasii</i> | 4,70E+05 | 0,667 | 3,13E+05 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 9,00E+05 | 2,778 | 2,50E+06 |

III Bijlage Resultaten ijzer concentratie

Tabel IJzer concentratie (mg/m²) in de biofilm van experiment 1 waar vetzuren en vetzuren & ijzer werden gedoseerd, bij de controle werd niks gedoseerd.

| dag | vetzuren | controle | Vetzuren-ijzer |
|-----|----------|----------|----------------|
| 1 | 0,53 | 0,53 | 0,36 |
| 2 | 1,1 | 0,71 | 0,88 |
| 6 | 1,8 | 1,8 | 2,3 |
| 13 | 1,1 | 0,7 | 1,4 |
| 26 | 1,1 | 1,1 | 3,0 |

Tabel IJzer concentratie (mg/m²) in de biofilm van experiment 2 waar vetzuren, vetzuren & inoculum en vetzuren & inoculum & ijzer werden gedoseerd.

| dag | vetzuren | Vetzuren-inoculum | Vetzuren-inoculum-ijzer |
|-----|----------|-------------------|-------------------------|
| 1 | 0,85 | 0,69 | 0,52 |
| 2 | 0,51 | 0,35 | 0,34 |
| 7 | 0,86 | 0,52 | 0,51 |
| 14 | 0,86 | 0,88 | 1,0 |
| 28 | 1,4 | 1,4 | 1,0 |