

Baktericid effekt av UV-bestrålt drikkevann

Av Egil Gjessing*) Heidi Beate Loennechen**) og Helge Liltved***)

*) Egil Gjessing er gjesteforsker ved Kjemisk Institutt, Blindern Universitetet i Oslo.

**) Heidi Beate Lønnechen er tidligere student ved Høgskolen i Agder, Kristiansand.

***) Helge Liltved er forsker ved Norsk institutt for vannforskning, Sørlandsavdelingen, Grimstad

Sammendrag

UV-behandling er en mye brukt metode til desinfisering av drikkevann. Metoden er enkel, effektiv og man unngår tilsetning av kjemikalier. Ulempen er imidlertid at metoden ikke antas å gi noen "resteffekt". Hovedhensikten med dette prosjektet har vært å undersøke om naturlig organisk materiale (NOM) i drikkevann har noen effekt på den baktericide virkningen av UV-bestråling. Det er tidligere vist at UV-bestrålet vann som inneholder NOM, fremmer dannelsen av stoffer som hemmer veksten av alger (*Selenastrum capricornutum*). I forsøkene som er beskrevet nedenfor, er bakterien *Escherichia coli* (E-coli) benyttet som testorganisme. Forsøkene er basert på løsninger av 10 ulike NOM-isolater med tilnærmet samme konsentrasjon av organisk stoff. To sett av disse vannprøvene ble bestrålt i 3 minutter med

en Hg-lampe (0,15 W/cm²). Lampen har strålingsmaksimum omkring 250 nm. Etter bestråling ble de 2 prøvesettene satt til lagring ved henholdsvis +20°C (romtemperatur) og +4°C (kjøleskap). Den baktericide effekt av denne behandling ble bestemt etter lagringstider på 0, 11, 25 og 31 døgn. Resultatene som er gitt som % hemning/stimulans av bakterienes vekst i forhold til vekst i fysiologisk saltvann viser:

- * De fleste ubestrålte NOM prøvene hadde en stimulerende effekt på E-Coli.
- * Den baktericide effekt av de ulike UV-bestrålte NOM løsningene varierte, særlig i løpet av den første lagringsuken.
- * En UV behandling resulterte i hemning av bakterieveksten. Den baktericide effekten økte til et maksimum (omkring 80%) etter 1 1/2 ukes lagring.

¹ Studiet er del av en prosjektoppgave ved avdeling for Realfag, Høgskolen i Agder, Kristiansand.

- * Samtlige NOM-løsninger viste en fortsatt baktericid effekt 25 lagringsdøgn etter bestråling.
- * Den baktericide effekten var noe lavere ved lagring i kjøleskap.
- * En mulig årsak til denne hemning av bakterieveksten er at UV-bestråling av NOM starter en kjedereaksjon som bevirker dannelsen av reaktive -OH radikaler.

Abstract

UV-radiation is used by many Water Works to disinfect drinking water. This is a simple and effective method, without involving addition of chemicals. However, it is not believed to give any rest effect; pathogens introduced into the water during transport from the treatment plant to the consumers, will probably not be inactivated. In the present investigation we have tested the bactericide effect of UV-radiated water containing NOM (natural organic matter). It has been shown earlier that UV-irradiation of NOM water result in a development in some algaecides. The present experiments are based on 10 different solutions of NOM with approximately the same concentration of organic matter. These water samples were irradiated (3 minutes by a Hg-lamp [0,15 W/cm²]). One set of these irradiated samples was stored for a month at room temperature and another set was stored at + 4°C The bacterial growth (*Escherichia coli* (E-coli)) in these waters was tested before and after irradiation and after 11, 25 and 31 days of storage after radiation. The results, given as % suppression (or % stimulation) of bacterial growth com-

pared to growth in physiological salt water, show:

- Most of NOM solutions (before radiation) had a stimulating effect on the growth of E-Coli
- Immediately after the irradiation, most of the samples showed a suppressing effect on the growth of bacteria
- The bactericide action increased to a maximum of about 80% during the first 1 1/2 week of storage
- All samples show an suppressing bacterial growth even after one month of storage
- The bactericidal effect was generally lower in samples stored at +4°C. The bactericidal effect of the 10 different NOM samples differed considerable; particularly during the first week of storage after the irradiation
- Possible cause of this suppressing of bacterial growth is that UV irradiation of NOM result in a chain reaction involving development of very reactive OH radicals

Innledning

Da Rook i slutten av 1970-årene påviste at klordesinfisering av drikkevann kunne resultere i dannelsen av mutagene organiske klorforbindelser, ble det i hele den vestlige verden gjennomført omfattende vurdering av alternative metoder. I Norge var på det tidspunkt ultrafiolett bestråling en mye brukt desinfiseringsmetode og dette alternativet fikk ny oppmerksomhet. Den største fordelen ved å bruke kortbølget stråling (250-300nm), er at man ikke tilsetter kjemikalier til drikkevannet. Det er

imidlertid, særlig to ulemper med UV behandling som begrenser metodens anvendelighet.

1. Vannet bør ikke ha et høyt innhold av humus [naturlig organisk materiale, (NOM)]. Den gulbrunfargen absorberer UV strålene ganske effektivt og reduserer derved den baktericide virkningen.
2. Selv om UV-bestråling inaktiverer patogene mikroorganismer i vann momentant, er det ikke antatt at det etterlates noen resteffekt som kan inaktivere eventuelle mikroorganismer som tilføres vannet i distribusjonsnett.

Det er tidligere vist at ved å bestråle NOM-farget vann med kortbølget lys, så endrer fargen karakter bl.a. p.g.a. at de organiske makromolekylene splittes opp og at disse "nye" stoffene kan være mer biologisk aktive (Gjessing og Kallqvist 1991). Det er også vist at denne fargereduksjonen og de biocide egenskapene opprettholdes i flere uker etter at vannet er bestrålet.

I prosjektet som er beskrevet nedenfor, er indikatorbakterien *Escherichia coli* (*E. Coli*) brukt som testorganisme for å studere baktericid virkning av UV-bestrål råvann som inneholder NOM. Hensikten var å undersøke (a) om *E-coli* er egnet som testorganisme, (b) om UV-bestråling av vann med NOM resulterer i dannelsen av bakteriecider, (c) om eventuell effekt er avhengig av NOM typen og (d) om eventuelle bakteriecide virkninger vedvarer over lengere tid.

Materiale og Metoder

NOM prøve lokaliteter

De 10 vannprøvene som er benyttet i

disse forsøkene, er RO -isolater fra Vestlandet, Sørlandet og Østlandet.

Prøvene er fra følgende lokaliteter [Gjessing, E.T, Egeberg, P.K. and Håkedal, J. (1999)]:

1.TRE

Trehørningen er den øverste av de fire innsjøene i Trehørningsvassdraget i Bærumsmarka (består av fire innsjøer: Trehørningen, Byvann, Småvann og Aurevann). Teoretisk oppholdstid for vannet i Trehørningen er anslått til 9,4 måneder. Farge: 33 mg Pt/l.

2.HEM

Hellerudmyra ligger også i Trehørningsvassdragets nedbørfelt. Prøven er fra utløpet av et lite myrtjern. Farge:166 mg Pt/l.

3.AUR

Råvannskilde for Bærum kommune - den fjerde av de fire innsjøene i Trehørningsvassdraget Prøven er fra vannverkets råvann. Den totale oppholdstid for vannet i de ulike innsjøene oppstrøms (Aurevann inkludert) er estimert til å være 24 måneder. Farge: 36 mg Pt/l.

4.MAR

Maridalsvannet er drikkevannskilde for Oslo. Prøven er her tatt fra vannverkets råvann (inntak på ca. 30 meters dyp). Oppholdstiden for dette vannet (innsjøene oppstrøms inkludert) er anslått til 21,2 måneder. Farge:13 mg Pt/l.

5.BIR

Birkenes ligger ca. 20 km fra kysten, nær Kristiansand. Dette er blant de områder i landet som er mest utsatt for sur nedbør. Farge: 27 mg Pt/l.

6.HUM

Prøven er fra Skjervatjern , nær Førde på Vestlandet (innsjøen som "Humex-prosjektet" var bassert på). Årlig ned-

bør i dette området er 2000 –3000 mm. Farge: 79 mg Pt/l.

7.GJL

Avrenningsvann fra et kalket nedbørfelt i Gjerstad på Sørlandet ("Kalkingsprosjektet": 300 tonn Dolomitt/km²). Farge: 40 mg Pt/l.

8.GJU

Gjerstad (ukalket). Avrenningsvann fra referansenedbørfeltet i "Kalkingsprosjektet". Farge: 53 mg Pt/l.

9.HEO

Hellerudmyra; samme som prøve nr.2. (HEM). Isoleringen er imidlertid, foretatt i oktober. Farge: 156 mg Pt/l.

10. "Nordic NOM Reference"²⁴

Råvann fra Sør-Odal Vannverk. Vannkilden er Vallsjøen. Isoleringen ble foretatt i oktober 1997. Farge: 87 mg Pt/l

Isolering av NOM

Isoleringen er foretatt ved omvendt osmose (Revers Osmoses: [RO]). Prinsippet for metoden er at vannet presses gjennom en membran (poreåpning: 150 Å), etter at vannet først har passert gjennom en Na-mettet kationebytter. Med denne metoden vil uorganiske salter og andre små molekyler passere gjennom membranen. Etter en ytterligere konsentrering ved lav-trykk-lavtemperatur inndamping, fryse-tørres prøven til et brungult pulver. Vanligvis oppnåes et NOM utbytte på 90-95%.

Løsninger av NOM

De prøvene som ble benyttet i de videre forsøkene er vanndige løsninger av disse isolatene. De ble laget ved å løse beregnede mengder av de ulike isolatene i destillert vann slik at

alle hadde tilnærmet samme konsentrasjon av løst organisk karbon (DOC) [basert på UV-abs (254 nm; 1 cm)].

Bestråling

Det ble benyttet en 900 W Hg-lampe. Antatt strålingseffekt var 0,15W/cm². Alle prøvene ble bestrålt i 3 minutter. Den baticide effekt ble bestemt umiddelbart etter bestråling og deretter etter 4, 11, 25 og 31 døgns lagring i ved romtemperatur og i kjøleskap.

Testorganismer/Bakterie

Escherichia Coli (E-Coli) ble benyttet som testorganisme. E-coli kulturene var fra Næringsmiddeltilsynet i Kristiansand.

Testing av baktericid effekt

Inokulum fra E-coli kulturen ble sterilt overført til soyaløsning og fikk vokse ved romtemperatur i ett døgn. 5 ml av denne E-Coli-suspensjonen ble sentrifugert og sentrifugatet vasket 3 ganger med fysiologisk saltvann (9g NaCl/l). Bakterietettheten ble bestemt ved å måle absorbansen ved 600 nm. Ved hvert forsøk ble det valgt en bakterietetthet tilsvarende en $A_{(600nm)} = 0,6 \text{ cm}^{-1}$. Toksitetstestene ble gjennomført ved å studere hemning/stimulans av vekst i agarskål, etter eksponering for UV-bestrålte NOM løsninger. Effekten ble sammenlignet med veksten etter eksponering for fysiologisk saltvann (kontroll). Eksponering for UV-bestrålte NOM- løsninger og utplantning på skåler med Violet Red Bile agar (RVG-agar) ble gjort etter følgende prosedyre:

² Tilgjengelig fra IHSS (Internasjonal Humic Substances Society) III, USA.

1. 9,9 ml prøve (el. kontroll) [fysiologisk saltvann]) ble tilsatt 0,1 ml bakterieløsning med $A_{600\text{ nm}} = \text{ca. } 0,6/\text{cm}$ og ristet i 15 min. (10^0 -løsning). 0,5 ml av 10^0 -løsningen ble fortynnet med 4,5 ml fysiologisk saltvann (10^1 -løsning). På tilsvarende måte ble det laget en 10^2 og en 10^3 -fortynningsløsning.
2. 0,1 ml av 10^3 -fortynningsløsningene med E. Coli ble strøket ut i agarskåler (4 paralleller). (Med 11 ulike prøver og referanseprøvene, representerte hvert forsøk til sammen 50 enkelbestemmelser).
3. Etter utplanting, ble agarskålene, "Petrisålene", satt i inkubasjonsskap ved 37°C og antall bakteriekolonier tallet etter 2 døgn.

ninger (middel av alle 10 prøver) før og etter lagring ved romtemperatur i inntil en måned er illustrert på Figur 1. Punktet lengst til venstre på figuren, som viser bakterienes respons på ubehandlede NOM løsninger, tyder på at de fleste NOM variantene har en stimulerende effekt på E-Coli. Den relativt store spredningen om dette middepunktet viser at de ulike NOM-løsningene virker svært forskjellig i denne henseende. Umiddelbart etter bestråling er det også betydelig forskjell mellom prøvene, selv om resultatene viser en klar hemmende effekt på bakteriene. Etter 1 1/2 ukes lagring, er den bakteriehemmende effekten økt i betydelig grad og er gjennomsnittelig 90% (69% – 99%). Resultatene antyder at den baktericide effekt av denne behandlingen har er maksimum etter ca. to uker. Dog er det, for de fleste NOM løsnings vedkommende fortsatt effekt selv en måned etter bestråling.

Resultater og diskusjon

Generelt

Den baktericide (bakteriehemmende) effekten av UV bestrålte NOM-løs-

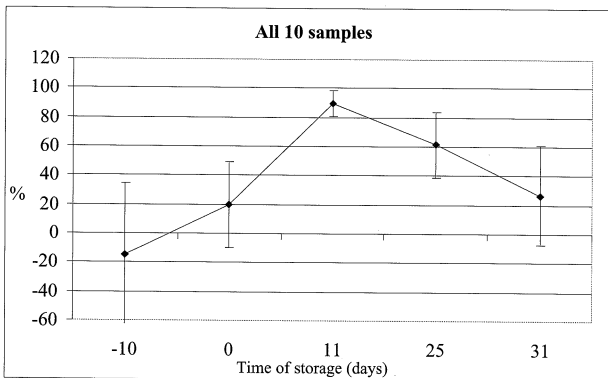


Fig 1. Veksthemmende (+) og vekst stimulerende (-) effekt av UV-bestrålte NOM-løsninger på E-coli. Middell og standardavvik for alle 10 prøvesett før og etter bestråling og etter 11, 25, og 31 døgns lagring ved romtemperatur (-10 betyr før bestråling). Hver punkt i diagrammet representerer middel av 40 enkelt bestemmelser.

[Effect of UV irradiated water containing NOM on growth of E. Coli.

Mean and standard deviation for all 10 sets of samples of irradiated samples at room temperature. (-10 denotes before irradiation). Each point represents the mean of 40 observations]

Forskjeller i virkning mellom prøver fra forskjellige landsdeler (syd-, øst- og vest).

Fig. 2 viser prøver fra Syd-, Vest- og Øst-Norge. Før bestråling er det en betydelig forskjell i den baktericide virkning av NOM variantene fra de forskjellige landsdelene. Prøven fra Vest Norge gir rundt 80% veksthem-

ning, mens prøven fra Syd Norge gir ca. 80% vekst stimulans. Årsaken til disse forskjellene er ikke kjent. Forskjellene i virkningen på bakteriene blir mindre umiddelbart etter bestråling. Etter 1 1/2 uke lagring, er det ingen signifikant forskjell mellom disse prøvene mht å være vekst hemmende for E.Coli.

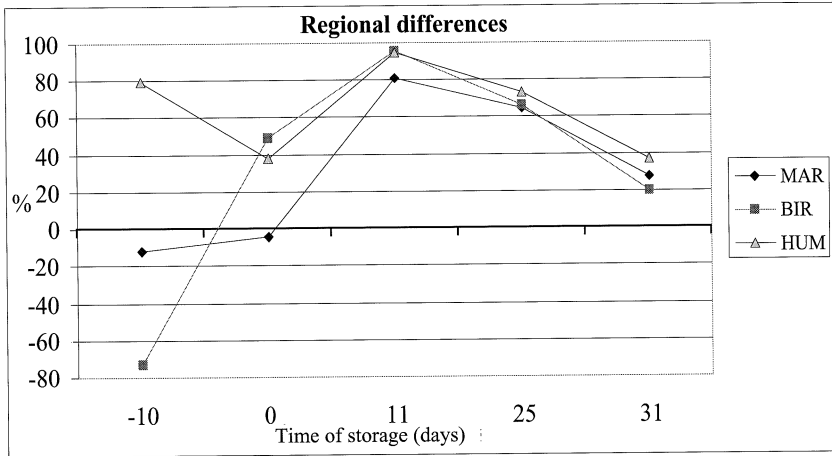


Fig 2. Regionale forskjeller i veksthemmende (+) og stimulerende (-) effekt av UV-bestrålte NOM-løsninger på E-coli. [øst- [MAR], sør- [BIR] og vest- [HUM] Norge] Hvert punkt er middel av 4 enkeltobservasjoner {SD 3-9%}

[Regional differences on effects of UV irradiated water containing NOM on growth of E. Coli. {East Norway [MAR]; South Norway [BIR] and West Norway [HUM]}. Mean values of samples before and after irradiation and after 11, 25 and 31 days of storage of irradiated samples at room temperature (-10 denotes before irradiation). Each point represents the mean of 4 observations {SD 3-9%}].

Forskjeller i virkning mellom prøver fra forskjellige deler av et vassdrag (Fig. 3)

Prøve TRE (Trehørningen) er fra utløpet av den øverste innsjøen i Trehørningsvassdraget; mens prøve AUR er fra Aurevann, som er den nederste innsjøen

i vassdraget (råvann til Bærum vannverk tatt på ca.15 meters dyp) Også her er det en betydelig forskjell før UV bestråling. Etter bestråling og etter lagring av de bestrålte prøvene, er det ingen signifikant forskjell mht baktericid virkning.

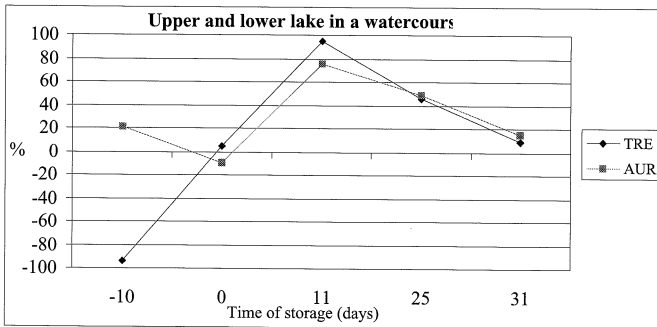


Fig 3. Lokale forskjeller i veksthemmende (+) og stimulerende (-) effekt av UV-bestrålte NOM-løsninger på E.coli.: [TRE] er øverst og [AUR] nederst i Trehørningsvassdraget. Hvert punkt er middel av 4 enkeltobservasjoner (SD: 1-10%)

[Local differences in effects of UV irradiated water containing NOM on growth of E. Coli. (Change in a water course. TRE and AUR are upper and lower lake in the water course of Trehørningen respectively. Mean values of samples before and after irradiation and after 11, 25 and 31 days of storage of irradiated samples at room temperature (-10 denotes before irradiation). Each point represents the mean of 4 observations {SD: 1-10%}]

Forskjeller i virkning mellom prøver fra forskjellige vannverk

Ubestrålte prøver fra tre forskjellige vannverk (Oslo, Bærum og Sør Odal) viser ingen betydelig forskjeller mht. stimulerende- eller vekst hemmende effekt på bakteriene (Fig. 4). Umiddelbart etter bestråling er det bare råvannet fra Sør Odal vannverk

(NOR) som gir en betydelig økning i den baktericide effekt. Alle tre prøvene gir imidlertid 70%- 80% hemning i bakterieveksten etter 1 1/2 ukes lagring. Prøven fra Oslo vannverk (MAR) er den som bibeholder sin veksthemmende virkning lengst (fortsatt 25% etter 1 måneds lagring ved romtemperatur).

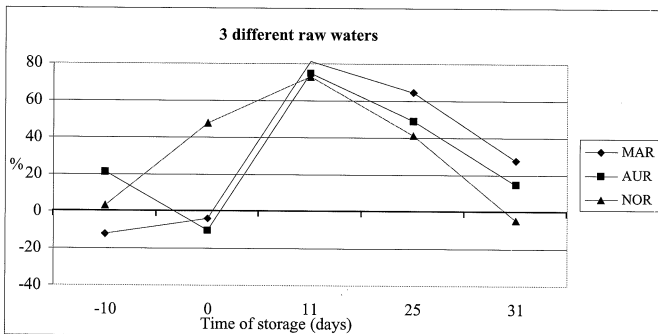


Fig.4. Veksthemmende (+) og stimulerende (-) effekt av UV-bestrålte NOM-løsninger fra tre ulike vannverk på E.coli. [[MAR]: Maridalsvann (Oslo), [AUR]:Aurevann (Bærum) og [NOR]:Vallsjøen (Sør-Odal)]. Hvert punkt er middel av 4 enkeltobservasjoner {SD: 1-9%}.

[Effects of UV irradiated water containing NOM from three different raw waters on growth of E. Coli. (Three different raw waters. MAR, AUR and NOR represent Water Work of Oslo, Water Work of Bærum and Water Work of Sør-Odal respectively. Mean values of samples before and after irradiation and after 11, 25 and 31 days of storage of irradiated samples at room temperature (-10 denotes before radiation). Each point represents the mean of 4 observations {SD: 1-9%}].

Forskjeller i virkning mellom prøver fra forskjellige årstider (Fig 5)

Den baktericide virkning av ubehandlet vår -NOM og høst -NOM er noe forskjellig. Prøven tatt i mai [HEM] synes å virke stimulerende på veksten

av E.coli, mens oktoberprøven [HEO] virker veksthemmende. Resultatene, illustrert på Fig. 5, tyder imidlertid på at det ikke er store sesong forskjeller i baktericid virkning av UV-bestrålt NOM etter 1 1/2 ukes lagring.

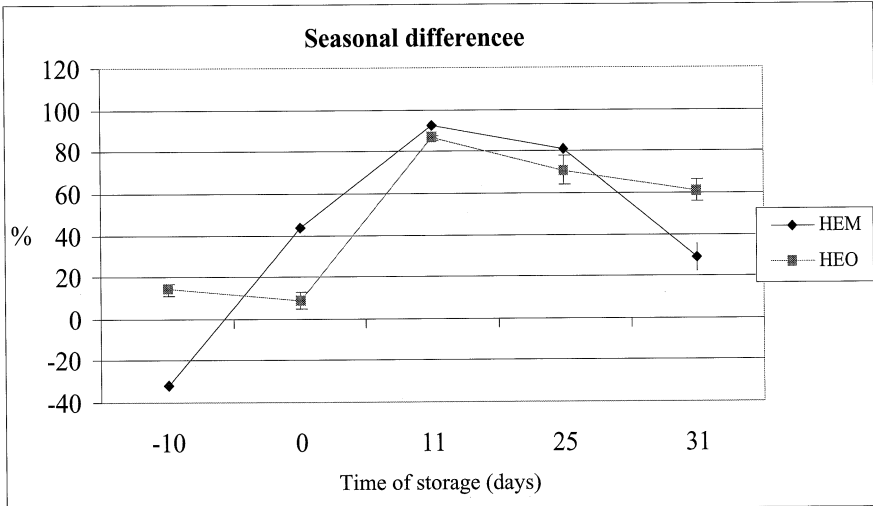


Fig.5. Årstids forskjeller (middelverdi og SD) i Veksthemmende (+) og stimulerende (-) effekt av UV-bestrålte NOM-løsninger på E.coli.. Hellerudmyra (Bærum) i mai (HEM) og i oktober (HEO). Middeltall og standard avvik. Hvert punkt er middel av 4 enkeltobservasjoner. [Seasonal differences {mean values and standard deviation} in effects of UV irradiated water containing NOM on growth of E. Coli. [Hellerudmyra (Bærum, Norway), Samples isolated in May [HEM] and in October [HEO]]. Mean values of samples before and after irradiation and after 11, 25 and 31 days of storage of irradiated samples at room temperature (-10 denotes before radiation). Each point represents the mean of 4 observations].

Forskjeller i virkning mellom prøver fra kalket og ikke-kalket område

Kalking av nedbørsfelt påvirker NOM og de baktericide egenskapene i betydelig grad. Dette gjelder både før og

etter UV bestråling (Fig. 6). Resultatene indikerer at NOM i avrenningsvann fra kalket nedbørsfelt gir betydelig mindre veksthemming like etter UV-bestråling mens effekten vedvarer lengre.

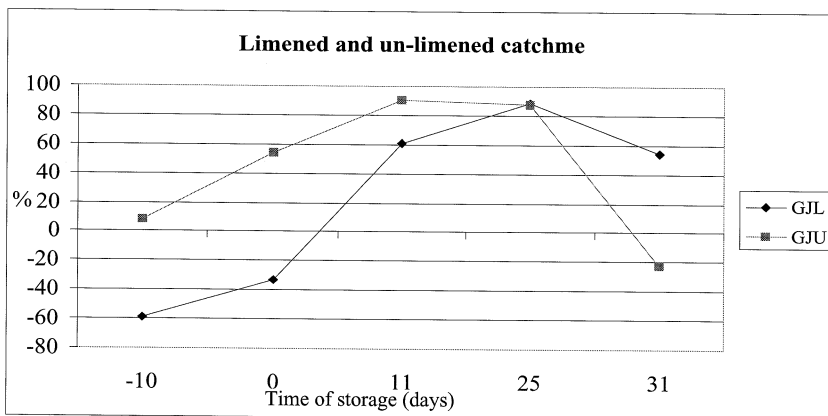


Fig.6. Forskjeller i veksthemmende (+) og stimulerende (-) effekt av UV-bestrålte NOM-løsninger fra kalket og ikke-kalket skogsmark på E.coli. Hvert punkt er middel av 4 enkeltobservasjoner {SD: 0-5%} [Effects of UV irradiated water samples containing NOM from limed (GJL) and un-limed (GJU) catchments on growth of E. Coli. GJL and GJU represent isolates of water from limed and un-limed catchment respectively. Mean values of samples before and after irradiation and after 11, 25 and 31 days of storage of irradiated samples at room temperature (-10 denotes before radiation). Each point represents the mean of 4 observations {SD: 0-5}].

Forskjeller i virkning ved effekter av forskjellig lagringstemperatur.

Lagringstemperaturen har tilsynnel-

tende liten betydning for de baktericide egenskapene til UV-bestrålt NOM (Fig. 7).

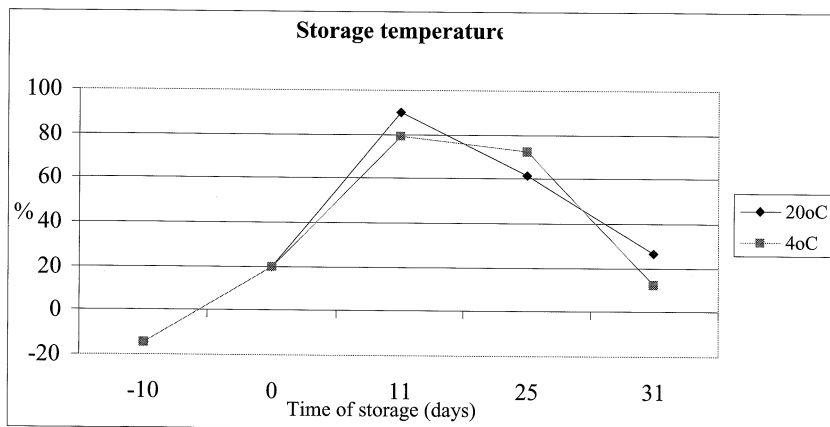


Fig 7. Betydningen av lagringstemperatur etter bestråling på veksthemmende (+) og stimulerende (-) effekt av UV-bestrålte NOM-løsninger på E.coli. Hvert punkt er middel av 40 enkeltobservasjoner.

[The effect of storage temperature after irradiation on growth of E. Coli. Mean values of samples before and after irradiation and 11, 25 and 31 days of storage at room temperature or +40°C of irradiated sample (-10 denotes before radiation). Each point represents the mean of 40 observations]

Konklusjoner

NOM-løsningene har generelt en stimulerende effekt på E.-Coli, men de 10 ulike NOM variantene påvirker svært forskjellig, fra 94% stimulans til 79% hemning sett i forhold til fysiologisk saltvann UV-bestråling av vann med NOM resulterer, med noen få unntak, i en umiddelbar baktericid effekt. De ulike NOM løsningene virker imidlertid meget forskjellig. Den baktericide effekten av de bestrålte prøvene økte betydelig ved lagring og når et maksimum etter knapt 2 ukers lagring. Dette gjelder for samtlige prøver og det er bare små forskjeller mellom prøvene. Med to unntak vedvarer den baktericide effekten i mer enn en måned. En mulig mekanisme for disse effekter er at bestråling av NOM med kortbølget lys bevirker dannelsen av særdeles reaktive OH –radikaler. Det antas at bestrålingen starter en kjedereaksjon og at dannelsen av disse OH radika-

lene øker i løpet av de første par ukene.

TAKK

Takk til Rajeev Kumar Sehipal ved Næringsmiddeltilsynet i Kristiansand for hjelp og rettleiding i forbindelse med de E-coli kulturene som ble benyttet i forsøkene.

Referanser

Gjessing, E.T. and Källqvist, T., 1991. Algicidal and chemical effect of u.v.-radiation of water containing humic substances. *Wat.Res.* Vol. 25 (4), pp. 491-494.

Gjessing, E.T., Egeberg,P.K. and Håkedal, J. (1999):Natural organic matter in drinking water - "The NOM-Typing Project", Background and basic characteristics of original samples and NOM isolates. *Environ. Int.* 25 (2/3) 145-159.