

Måling av potensialet for biologisk vekst i drikkevannsledninger

Av Lars J. Hem

Lars J. Hem er dr.ing. og ansatt i Aquateam

Sammendrag

Måling av potensialet for dannelse av biofilm (BFP) og biologisk nedbrytbar organisk materiale (BOM) kan bli utført på ulike måter. BOM måler i hvilken grad en kan få vekst når øvrige forhold som temperatur, fosforinnhold etc. er tilfredsstillende, mens BFP er et direkte mål på veksten under de faktiske forhold.

Målemetodene er enten mikrobiologiske eller kjemiske, og de mikrobiologiske metodene dominerer. De ulike målemetodene er ofte representative for ulike deler av det organiske materialet, blant annet er det ulikheter mht. i hvilken grad annet enn lett nedbrytbar organisk materiale er inkludert i målingene. Målemetodene varierer i meget stor grad med hensyn på ressursbruk og nøyaktighet, og det er viktig å være bevisst hva en ønsker svar på før en velger målemetode.

Abstract

There are several different methods for measurement of biofilm formation potential (BFP) and biodegradable organic matter (BOM). While BFP is a direct measurement for the actual microbiological growth under the present conditions, BOM is a measure for the potential growth assuming that all conditions like temperature and available phosphorous are optimal.

The methods are either microbiological or chemical, and the former is dominating. The different methods often show different parts of the organic matter, as whether some of the not easy biodegradable organic matter is included. The costs and resources needed to perform the analysis vary considerably, and so does the accuracy of the measurement, and the selection of method should be based on a thorough evaluation of what type of information that is wanted.

Innledning

Interessen for metoder som er egnet til å måle potensialet for biologisk vekst i drikkevannsledninger er i hovedsak knyttet til at biofilmen som dannes på rørveggen ofte bidrar til å øke mulighetene for overlevelse av patogene mikroorganismer. Erfaring fra USA viser at biofilmen i ledningene øker mulighetene for at sporer og cyster kan overleve selv ved relativt høye klordoser (LeChevallier et al., 1987).

Utvikling av målemetoder for å måle potensialet for dannelse av biofilm (biofilm formation potential - BFP) og biologisk nedbrytbar organisk materiale (biodegradable organic matter - BOM) har pågått i drøyt 20 år. Fokus har i stor grad vært på mikrobiologiske metoder for å måle BOM.

Etterhvert er det også utviklet standardiserte metoder for å måle BFP. Fysisk/kjemiske målemetoder har imidlertid også et potensial, ikke minst med hensyn på driftsovervåkning av rensprosesser for å fjerne BOM.

Naturlig organisk materiale som årsak til begroing i ledningsnett har vært lite påaktet i Norge, med unntak av for Bærum vannverk. I Bærum valgte man å bygge et rensanlegg som skulle redusere fargen ved å bleke vannet med bruk av ozon, og anlegget ble satt i drift i 1963. Der erfarte de det samme den gangen som resten av verden senere har dokumentert gjennom mange studier, nemlig at ozonering av NOM øker BOM dramatisk.

I Norge har interessen for å måle BOM bakgrunn i muligheten for gjenvekst av patogene mikroorganismer i ledningsnettet, samt driftsmessige og bruksmessige problemer pga. slamdannelse i ledningsnettet.

Mikrobiologiske metoder for å måle biologisk nedbrytbart organisk materiale

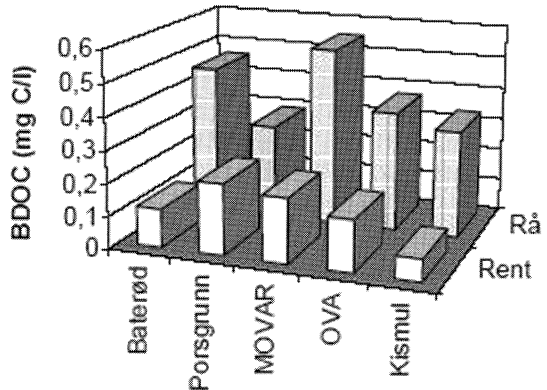
De mikrobiologiske metodene som anvendes for å måle BOM består av ulike typer bioassays, dvs. målemetoder der en benytter mikroorganismer som måleparameter eller for nedbrytning av organisk materiale. Bioassays metodene kan deles inn i to hovedtyper:

- Assimilerbart organisk karbon (AOC) analyse
- Bionedbrytbart organisk karbon (BDOC) analyse

AOC og BDOC analysene. Begge analysene forutsetter at det skjer en nedbrytning av organisk materiale ved hjelp av mikroorganismer, ikke ulik en biokjemisk oksygenforbruk (BOD) analyse. Valg av mikroorganismer som tilsettes som inokulum (de organismene som tilsettes for å bryte ned det organiske materialet), og selve analyseparametrene, er imidlertid forskjellige. Dette er nødvendig for å få målbare resultater i en vannkvalitet som har ekstremt lav BOD.

BDOC-analysen måler hvor stor del av løst organisk karbon (DOC) som fjernes i løpet av 28 dager. Vannprøven tilsettes inokulum fra ledningsnettet, eller fra en naturlig overflatevannkilde. DOC måles ved start og etter 28 dager, og forskjellen angis som mg C/l. En typisk verdi for BDOC i norsk overflatevann er 0,3 mg C/mg TOC.

Eksempler på effekten av vannbehandling er vist i figur 1, der det ble målt BDOC i råvann og rentvann fra 5 ulike norske vannverk.



Figur 1. Biologisk nedbrytbart løst organisk karbon (BDOC) i råvann og rentvann ved norske vannverk

Koagulering og direktefiltrering etterfulgt av klorering (Baterød, MOVAR, OVA (Skullerud vannrenseanlegg), Kismul) reduserte BDOC med 55-80 %. (MOVAR og Baterød hadde også GAC-filtrering, uten at dette ga noen større reduksjon i BDOC ved disse anleggene enn ved de som ikke hadde GAC-filter). Klorering som eneste behandlingsprosess (Porsgrunn) hadde liten effekt på %-vis fjerning av BDOC.

BDOC-analysen er avhengig av hvilket slam som velges som inokulum. Det ideelle er slam fra ledningsnett, dersom dette er representativt for hele nettet. Slike prøver er vanskelige å finne, og da velges gjerne enten en tilfeldig slamprøve fra nettet eller en prøve fra en vannkilde som er representativ for vanntypen.

BDOC-analysene er ikke nødvendigvis reproducerbare i absolutt størrelse, dvs. at to parallelle BDOC-analyser av samme vannprøve, men med ulike inokulum, kan gi ulike måleverdier. F.eks. er det målt verdier på ca. 0,15 og ca. 0,8 mg BDOC/l i samme ledningsnett på to tidspunkt, uten at det er noen årsak til denne forskjellen ut fra vannkvalitet forøvrig. I BDOC-analysen avleses DOC på to tidspunkt, og det er ikke gitt at DOC er lavest etter akkurat 28 dager. Effekter som lag-fase (den tiden det tar før bakteriene er akklimatisert og starter nedbrytningen), adsorpsjon, hydrolyse og desorpsjon av DOC fra biomassen, kan variere fra et tidspunkt til et annet, og dette er effekter som i stor grad vil avhenge av bakteriene som brukes som inokulum. Ut fra dette er det knyttet stor usikkerhet

til å sammenligne resultater fra målinger tatt ved ulike tidspunkt.

AOC-analysen måler vekst av bakterier, i form av antall celler. Disse måles enten direkte ved telling, eller ved måling av ATP-konsentrasjonen. I AOC-analysen benyttes spesifikke indikatororganismer, og *Pseudomonas fluorescens* P17 er vanligst, ofte supplert med *Spirillum* NOX. P17 er valgt fordi denne kan vokse på svært mange substrat, og ved lave konsentrasjoner av BOM. P17 kan imidlertid ikke vokse på en del organiske molekyler som dannes ved oksidasjon, som f.eks. oxalsyre. NOX kan imidlertid vokse på et slikt substrat.

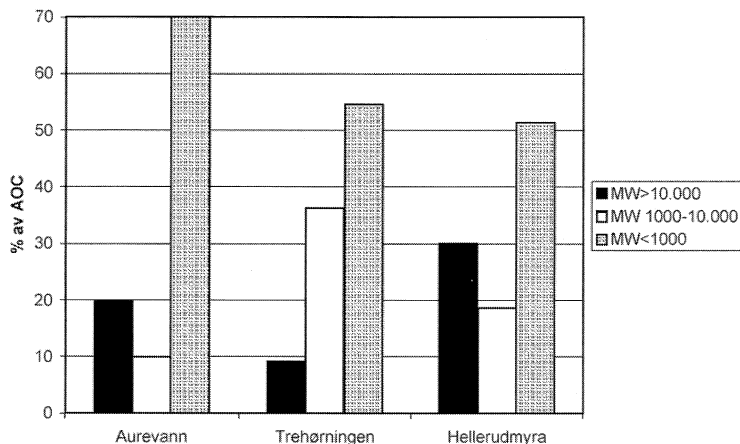
Vekst av bakterier måles etter f.eks. 3, 7 og 9 dager, og sammenlignes med veksten i en acetatstandard. AOC angis derfor som µg Ac-C/l, og en typisk verdi for norsk overflatevann er 30 µg Ac-C/l.

Lokale stammer er benyttet som inokulum av bl.a. Water Research Senter, UK (WRc). Miettinen et al. (1999) sammenlignet vekst med *Pseudomonas fluorescens* P17 og *Pseudomonas fluorescens* MMV90. Med P17 fikk de en svak økning i AOC som følge av en vannbehandling bestående av koagulering, pH-justering og klorering av overflatevann, og en noe sterkere økning ved sandfiltrering av grunnvann. Med MMV90, som er en lokal bakterie fra et vannverk med grunnvannsforsyning, målte de en klar nedgang i AOC ved begge typer vannverk. Dette viser at valg av indikatororganisme har stor betydning for resultatet, og at indikatororganismene som benyttes ved analysen derfor alltid må angis. Når utgangs-

punktet er frysetørkede standardiserte bakteriekulturer, bør imidlertid resultatene være reproducerbare i større grad enn når lokale stammer benyttes slik tilfellet er ved BDOC-analysen.

Som et eksempel på anvendelse av AOC-analysen, er det under vist

resultatet fra måling av AOC i ulike molekylvektsfraksjoner av naturlig organisk materiale (NOM) i tre råvann. AOC var i hovedsak knyttet til molekylvekt med MW < 1000 (Hem and Efraimsson, 2001).



Figur 2. Fordeling av assimilerbart organisk karbon (AOC) på tre ulike molekylvektsfraksjoner av naturlig organisk materiale (NOM) i tre ulike råvann

AOC "light" er en forenklet metode for måling av assimilerbart organisk karbon utviklet av CheckLight (Ulitzur, 2002). Metoden benytter *Vibrio fischeri*, en marin bakterie som avgir lys med bølgelengde 490 nm under nedbrytning av organisk materiale, som indikatororganisme. Dette er den samme bakterien som benyttes til toksisitetstester med Microtox (Beckman, 1985). Bakterien kjøpes og lagres frysetørret, og oppløses i saltholdig vann umiddelbart før testen.

Prøvene steriliseres ved 70 °C i 30 min for å stanse nedbrytning av organisk karbon. Deretter tilsettes en saltholdig buffer slik at saliniteten og pH i prøven tilsvarer sjøvann. Det til-

settes også 0,5 mg natriumthiosulfat/l for å fjerne klorrest. Etter 60 min blir prøvene tilsatt *Vibrio fischeri*. Prøvene plasseres i inkubator ved 26 ± 2 °C i 150 min. Lysintensiteten måles etter 90, 120 og 150 min i Lumac Biocounter (Lumac BV, Nederland). Den avleste lysintensiteten på prøven, eventuelt på for-tynnet prøve, blir sammenlignet med lysintensiteten i en standard av glukose og gjærekstrakt som er behandlet på samme måte som prøven. Metoden har en nedre grense for kvantifisering på ca. 25 µg AOC/l.

Turbiditet som mål på vekst av bakterier er brukt i Tyskland. Det benyttes et svært følsomt turbidimeter for å kunne registrere endringer i

bakteriekonsentrasjonen. Dette gir en enklere analyse enn AOC og BDOC, men den er ikke raskere enn AOC. Måling av vekst ved turbiditet gir mulighet for å sammenligne paralleller, men hvor nøyaktig testen er, og i hvilken grad den gir reproducerbare resultater, er ukjent. I likhet med AOC og BDOC analysene er også denne metoden avhengig av oppvekst av bakterier.

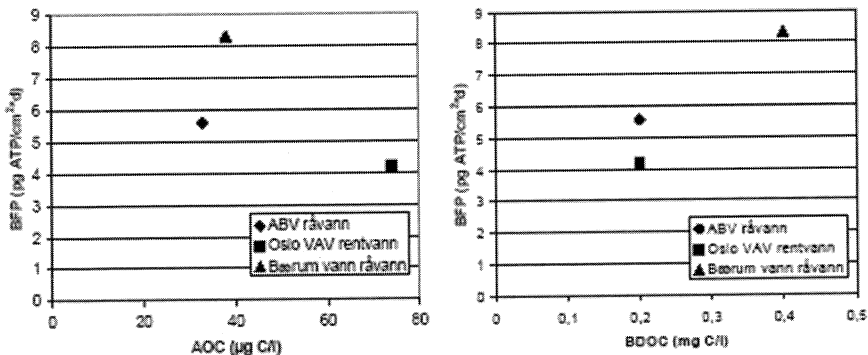
Måling av dannelse av biofilm

In-situ måling av begroing kan måles ved å bestemme biomassen i (deler av) ledningsnettet. Det er mulig å måle mengden biomasse på biter av rør som tas ut fra ledningsnettet, eller mengden biomasse som skrapes av veggene i høydebasseng med mer (Hem, 2003b). En kan da måle biomassen som kimtall, flyktig suspendert stoff (VSS) eller ATP. Dette vil være målinger som ofte ikke er mulig å reproducere, som f.eks. når en foretar målinger i et rør som er gravd opp.

Potensialet for dannelse av biofilm (BFP) måles med en metodikk og utstyr for måling av biofilm-

dannelse på rørbitar/ringer (van der Kooij and Veenendal, 1993). Rørbitene eksponeres mot vannet i kontinuerlig eller diskontinuerlig vannstrøm, avhengig av hva som studeres. Rørbitene eksponeres i f.eks. 6 måneder, med uttak av prøver/rørbitar hver 14. dag. Mengden ATP/cm² på rørbitene måles, og vil gi et mål på begroingspotensialet. Dersom det benyttes glassringer anses resultatet å være et mål på vannets begroingspotensial, siden glass hverken virker inhiberende eller lekker organisk materiale som kan bidra til biologisk vekst. Typisk verdi med norsk overflatevann i kontinuerlig vannstrøm er målt til 0,2 pg ATP/cm²*d (pg=10⁻¹² g).

Det er gjennomført et NFR-prosjekt der både begroingspotensialet på glassringer i konstant strømmende vann og på rørbitar av ulike materialer i diskontinuerlig vannstrøm er målt (Hem and Skjevrak, 2002, Hem, 2003). I det førstnevnte ble samtidige resultater fra AOC, BDOC og ATP-målinger i vannet sammenlignet, for å få et bilde av sammenhengen mellom de ulike målemetodene.



Figur 3. En sammenligning av BFP med AOC og BDOC

Det var overensstemmelse mellom den målte biofilmdannelsen og BDOC ved de ulike vannverkene, i den forstand at i råvannet til Bærum Vann var både biofilmdannelsen og BDOC-innholdet omtrent dobbelt så stor som ved de to andre vannverkene. Det må understrekes at en slik sammenligning kun er holdbar så lenge en har det samme inokulumet. Prøvene må derfor analyseres samtidig, og inokulumet må være relevant for vanntypene som skal analyseres. I dette tilfellet ble det benyttet overflatevann som inokulum for å analysere prøver tatt av råvann og rentvann med overflatevann som råvannskilde. Vannets innhold av AOC var vesentlig høyere i nett vann fra Oslo enn i råvann fra ABV og fra Bærum Vann.

Sammenligning av BFP, AOC og BDOC

Det er vel kjent at AOC og BDOC er mål på ulike sider ved BOM. AOC måles med 1-2 indikatororganismer som nyttiggjør seg av en begrenset del av det organiske materialet som bl.a. fettsyrer. BDOC måles med et naturlig vann som inokulum, der en vil ha et større mangfold med hensyn til ulike typer mikroorganismer. Dette gjør at en større del av det organiske materialet kan nyttiggjøres til biologisk vekst enn tilfellet er i AOC-analysen. AOC måles over et tidsrom på inntil 9 dager, mens BDOC-analysen går over 28 dager, og muligheten for at større organiske molekyler nedbrytes og at partikulært materiale hydrolyseres, vil derfor være større i BDOC-analysen enn i AOC-analysen. Resultatene tilsier at

BDOC er et bedre mål på begroingspotensialet enn det AOC er. BDOC-analysen er imidlertid relativt grov pga. begrensninger i DOC-måling, samtidig som de absolutte resultatene fra BDOC-analysene er vanskelige å reproducere. Det sistnevnte tilsier at det ville være gunstig å ha en standard vanntype som en sammenligner BDOC-analyseresultatene med. AOC-verdiene øker når vannet kloreres eller ozoneres (Hem et al., 1997, Hem and Charnock, 1999), noe som er en del av forklaringen på at AOC i nett vann i Oslo var høyere enn i råvann fra ABV og Bærum Vann. BDOC øker i mindre grad med de klordosene som er vanlig i Norge (Hem and Charnock, 1999).

I Stockholm er det vist at mens BFP i hurtigfiltrert vann var 6 ganger høyere enn i langsomfiltrert, var forskjellen i AOC bare ca. 20 %, noe som bekrefter at AOC ikke fullt ut er representativt for BFP (Blomberg och Lagerqvist, 1999).

Kjemiske metoder som indikatorer på begroingspotensialet eller faktisk biologisk vekst

De mikrobiologiske målemetodene er relativt kostbare, og med unntak av AOC "light" tar det 10-150 dager før en kan få et resultat. De er derfor dårlig egnet som driftsparametre, men bør heller brukes i en kartlegging av rå- og rentvann, og i forbindelse med valg av renseprosess. Det er også behov for informasjon utover AOC og BDOC for å forklare hvorfor en får endringer i BOM som følge av ulike vannbehandlinger.

Dersom det er mulig å koble resul-

tater av kjemiske vannanalyser til vannets begroingspotensial vil dette være et bedre utgangspunkt for å finne operative parametre. Vannets farge og

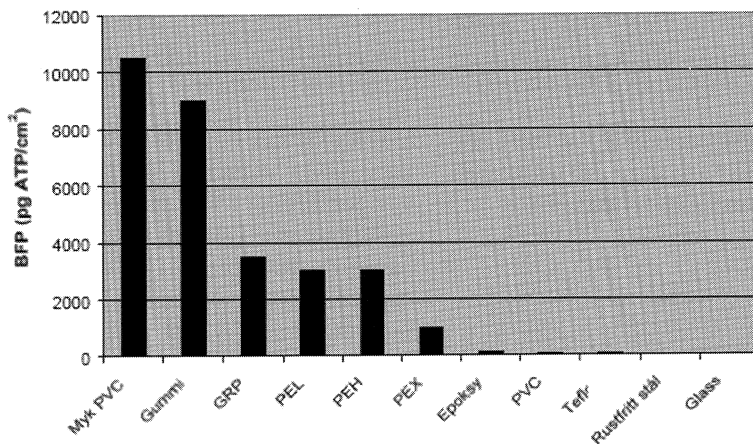
TOC-innhold er tvilsomme parametre i denne sammenheng, noe som er vist i tabellen under der effekten av membranfiltrering av 3 ulike råvann er vist.

Tabell 1: Reduksjon i assimilerbart organisk karbon (AOC), totalt organisk karbon (TOC) og farge ved membranfiltrering av 3 ulike råvann

	% -vis reduksjon ved membranfiltrering	
	MW cut-off 10 000	MW cut-off 1000
Farge	78-82	91-96
TOC	27-61	78-84
AOC	9-30	29-49

I figur 2 ble det vist at det meste av BOM, målt som AOC, er knyttet til molekyler med molekylvekt (MW) mindre enn 1000. Forholdet mellom AOC og TOC i disse tre vannene var 4-8 µg Ac-C/mg TOC, mens det tilsvarende forholdet for MW-fraksjonen <1000 var 12-14 µg Ac-C/mg TOC. Dette indikerer at TOC i denne MW-fraksjonen kan være egnet som mål på BOM. Det er forøvrig logisk at bakterier lettest nyttiggjør seg små molekyler.

Måling av ATP i vannet gir et mål på mengden levende celler, dvs. et mål på hvor mye biologisk vekst som faktisk har forekommet (Ormerod, 1984). ATP etter en viss kontakttid er bl.a. brukt til å måle i hvilken grad ulike materialer i kontakt med vann lekker organisk materiale som kan gi grunnlag for biologisk vekst, som vist i figur 4.

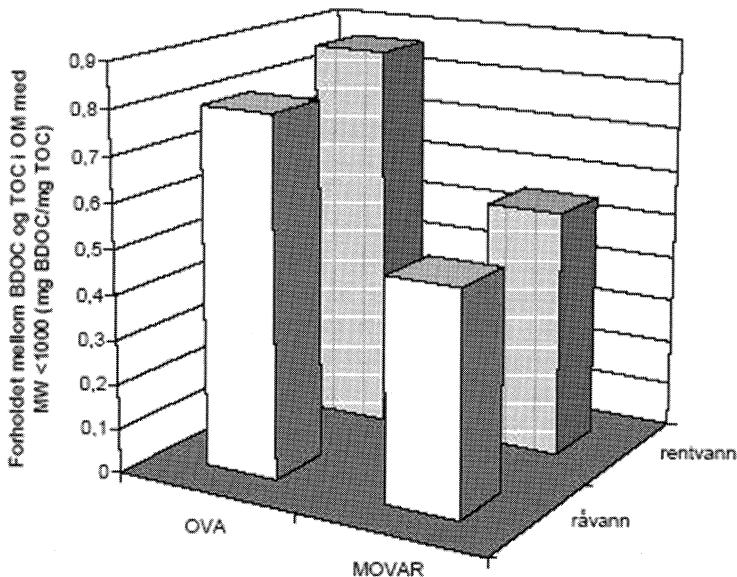


Figur 4. Begroing på ulike materialer i kontakt med drikkevann (etter van der Kooij et al., 1999)

Myk PVC, gummi, glassfiberarmert polyester og polyetylen hadde størst biofilmvekst. Forskjellen mellom veksten på rustfritt stål og (hard) PVC hos van der Kooij et al. (1999) var ikke så stor, noe som er i overensstemmelse med resultater fra måling av biofilmvekst på rør av jern og PVC (LeChevallier, 1999)

Måling av organisk materiale

med lav molekylvekt vil kunne gi en indikasjon på vannets innhold av BOM, fordi BOM i stor grad er knyttet til små molekyler (se også tabell 1). Sammenhengen mellom BDOC og TOC i NOM med MW<1000 er vist i figur 5. Den %-vise reduksjonen i BDOC var tilnærmet lik reduksjonen i TOC i NOM med MW<1000.



Figur 5. Biologisk nedbrytbart løst organisk karbon (BDOC) versus totalt organisk karbon (TOC) i naturlig organisk materiale (NOM) med molekylvekt (MW) <1000

Molekylvektfordeling (MWD) av TOC finner en ved å fraksjonere det organiske materialet (OM) i f.eks.:

- <1000
- 1000-2000
- 2000-5000
- 5000-10.000
- 10.000-20.000
- 20.000-50.000
- 50.000-100.000
- >100.000

MW-fraksjoneringen kan utføres ved sekvensiell membranfiltrering eller ved gelfiltrering. Ved gelfiltrering må gelkolonnen kalibreres med et materiale med en kjent MWD, f.eks. med en proteinstandard. I gelfiltrering separeres molekylene ved at små molekyler bruker lenger tid på å passere kolonnen enn store, fordi små molekyler diffunderer inn i flere porer. I hver av fraksjonene måles TOC.

Måling av MWD av TOC er relativt kostbart når det måles TOC i mange fraksjoner, men kostnadene blir mer enn halvert når en kun fokuserer på OM med MW <1000. Måling av MWD er imidlertid uansett for tungvint og dyrt som driftsparameter. På den annen side er dette en metode som gir mye informasjon om vannet, ikke minst når en skal vurdere effekten av ulike typer vannbehandling.

Måling av konsentrasjonen av de

spesifikke molekylene som bidrar til BOM ville vært en eksakt måte å registrere BOM. Så langt er imidlertid kun en meget liten del av de organiske komponentene som bidrar til BOM kartlagt.

Konklusjon

Det finnes ulike måter å måle vannets BOM innhold og BFP, og de ulike metodene har både fordeler og ulemper, og dette er oppsummert i tabell 2.

Tabell 2. Fordeler og ulemper med ulike måter å måle biologisk nedbrytbar organisk materiale (BOM) og potensialet for biofilmdannelse (BFP).

Metode	Kostnad	Tid før resultatet foreligger	Reproduserbar	Nøyaktighet/deteksjonsgrense	Måler BOM direkte	Måler BFP direkte	Ferdig utviklet metode
AOC	middels	lang	god	god	ja	nei	ja
AOC "light"	lav	kort	god	middels	ja	nei	ja
BDOC	middels til høy	lang	dårlig	dårlig	ja	nei	ja
Turbiditet som mål på bakterievekst	lav	lang	dårlig	usikker	usikkert	nei	usikkert
TOC med lav MW	middels	kort	god	god	nei	nei	ja
ATP	lav	kort	god	god	nei	nei	ja
Kimtall	lav	middels	god	god	nei	nei	ja
BFP (KIWA)	høy	lang	middels	usikker	ja	ja	ja

De metodene som er nærmest til å måle BOM eller BFP direkte, er pga. tid, kostnader og reproduserbarhet minst egnet som operative parametre. Den riktige innfallsvinkelen er trolig å få en utførlig beskrivelse av råvann og

renset vann med både mikrobiologiske og kjemiske metoder, og dernest kalibrere relativt enkle kjemiske eller mikrobiologiske måleprinsipper som operative parametre for BOM.

Forkortelser

AOc = assimilert organisk karbon
ATP = adenosine-5-trifosfat
BOD = biokjemisk oksygenforbruk
BDOC = biologisk nedbrytbar løst organisk karbon
BFP = potensialet for dannelse av biofilm
BOM = biologisk nedbrytbar organisk materiale
DOC = løst organisk karbon
MW = molekylvekt
MWD = molekylvektsfordeling
NOM = naturlig organisk materiale
TOC = totalt organisk karbon
VSS = flyktig suspendert stoff

Referanser

Beckman (1985): Microtox[®] Acute Toxicity Basic Test Procedures, Instruction Manual. Beckman Instruments Carlsbad: CA, USA.
Blomberg, J. och Lagerqvist, B. (1999): Undersökning av biofilmtilväxten i snabbfiltrat och långsamfiltrat. Etapp 1. Kallt vatten. Rapport nr. 22, Stockholm Vatten.
Hem, L. J., Norgaard, E. og Efraimsen, H. (1997): Begroing i drikkevannsledninger. NIVA-rapport 3576-96.
Hem, L. J. and Efraimsen, H. (2001): AOC in MW fractions of NOM. *Water Research*, :35:4:1106-1110.
Hem, L. J. and Charnock, C. (1999): Biofilm formation potential in Norwegian drinking waters. The influence of raw water quality and treatment technology. *Proceedings, 1999 AWWA annual conference*.
Hem, L. J. and Skjevraak, I. (2002): Potential water quality deterioration of drinking water caused by leakage

of organic compounds from materials in contact with the water. 20 th NoDig conference, Copenhagen May 28-31 2002.

Hem, L. J. (2003): Biostabilitet i drikkevannsledninger. Aquateam-rapport 03-032.

Hem, L. J. (2003b): Bruk av PE- og PVC-rør; betydning for biofilmdannelse (begroing) og uønsket lukt og smak på vannet. Aquateam-rapport 03-011. O-02136.

LeChevallier, M. W., Babock, T. M. and Lee, R. G. (1987): Examination and characterization of distribution system biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:2714-2724.

LeChevallier, M. W. (1999): The case for maintaining a disinfection residual. *Jour. AWWA*. 91:1:86.

Miettinen, I. T., Vartiainen, T. and Martikainen, P. J. (1999): Determination of assimilable organic carbon (AOC) in humus-rich drinking waters. *Wat. Res.* 33:2277-2282.

Ormerod, K. (1984): Påvisning av biologisk aktivitet i ledningsnett for vann ved ATP-analyse. NIVA-rapport FP-83831

Ulitzur, N. (2002): Personlig kommunikasjon, CheckLight, Israel.

van der Kooij, D. and Veenendaal, H. R. (1993): Assessment of the biofilm formation potential of synthetic materials in contact with drinking water during distribution. *AWWA WQTC, Nov. 7-11, 1993, Miami*.

van der Kooij, D., van Lieverloo, J. H. M., Schellart, J. and Hiemstra, P. (1999): Maintaining quality without a disinfectant residual. *Jour. AWWA*. 91:1:55-64.