

RAPPORT LNR 3576-96

**Begroing i
drikkevannsledninger**

Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00

Sørlandsavdelingen

Televeien 1
4890 Grimstad
Telefon (47) 37 04 30 33
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Rute 866
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Thormøhlensgt 55
5008 Bergen
Telefon (47) 55 32 56 40
Telefax (47) 55 32 88 33

Akvaplan-NIVA A/S

Søndre Tollbugate 3
9000 Tromsø
Telefon (47) 77 68 52 80
Telefax (47) 77 68 05 09

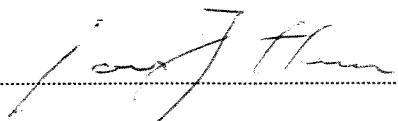
| | | |
|--|-------------------------------------|------------------|
| Tittel: Begroing i drikkevannsledninger | Løpenr. (for bestilling) 3576-96 | Dato 03.09.97 |
| | Prosjektnr. Undernr. P-96601 | Sider Pris 50 |
| Forfatter(e) Hem, Lars J. Norgaard, Erik Efraimsen, Harry | Fagområde Vannforsyning | Distribusjon |
| | Geografisk område | Trykket NIVA |

| | |
|---|-------------------|
| Oppdragsgiver(e) Norsk institutt for vannforskning | Oppdragsreferanse |
|---|-------------------|

Sammendrag

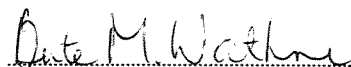
Det er en kjennsgjerning at biofilmer etableres i dagens drikkevannsledninger til tross for behandling. Biofilmene kan fungere som kilde for humanpatogene bakterier (og andre mikroorganismer) og i tillegg spille en vesentlig rolle ved forringelse av vannkvalitet og ledningsnett. I rapporten gis en oversikt over nødvendige fysisk/kjemiske egenskaper i vann og ledningsnett for etablering av biofilmer. Videre er sammenhengen mellom begroingspotensialet (AOC) og henholdsvis totalt organisk karbon (TOC) og farge studert. Begroingspotensialet er også målt som funksjon av molekylstørrelse på det organiske materialet. Mens vannets farge i hovedsak er knyttet til naturlig organisk materiale med molvekt over 10.000, er begroingspotensialet først og fremst knyttet til organisk materiale med molvekt mindre enn 1000. Forskjellene i begroingspotensialet i ferskt humusvann og i en innsjø nedstrøms viste seg å ha sammenheng med innholdet av totalt organisk karbon, og da spesielt organisk materiale med molvekt mindre enn 1000. Ulike metoder for vannbehandling kan redusere eller øke begroingspotensialet. Rapporten er basert på et litteraturstudium og vannanalyser.

| | |
|--|--|
| Fire norske emneord 1. Biofilm 2. Bakterier 3. Analyser 4. Molvekt | Fire engelske emneord 1. Biofilm 2. Bacteria 3. Analysis 4. Molecular weight |
|--|--|



Prosjektleder

ISBN 82-577-3128-5



Forskningssjef

Begroing i drikkevannsledninger

Forord

Denne rapporten beskriver resultatene fra et ett-årig instituttprogram om vannforsyning. Dersom finansieringen kan realiseres vil programmet bli videreført, og vil da i stor grad bestå av studier av biofilmdannelse i vannledninger.

Laboratorietestene har vært utført av Åse Bakketun og Nicole Hiller. Åse Bakketun har gjennomført testene mhp. begroingspotensialet (assimilerbart organisk karbon - AOC), mens Nicole Hiller har utført molvektfraksjoneringen av vannprøvene.

Utvikling av metodikk for AOC-analysene er delvis utført i samarbeid med Gro Øfjord, Aquateam AS.

John Erik Samdal har kvalitetssikret rapporten.

Oslo, 31.08 1997

Lars J. Hem

Innhold

| | |
|---|-----------|
| Sammendrag | 5 |
| 1. Vannkvalitetsendringer i drikkevannsledninger | 6 |
| 2. Biofilmer i drikkevannsledninger, litteraturstudium | 8 |
| 2.1 Generelt | 8 |
| 2.2 Biofilmdannelse | 8 |
| 2.2.1 Fysikokjemiske faktorer | 8 |
| 2.2.2 Transport | 9 |
| 2.2.3 Adsorpsjon av bakterier til overflater | 10 |
| 2.2.4 Hvilken rolle spiller overflatens kvalitet? | 10 |
| 2.3 Glykokalyx - Extracellular Polymer Substances (EPS) | 11 |
| 2.4 Metoder for å generere biofilmer i laboratorie- og pilotskala | 12 |
| 2.5 Faktorer som påvirker mikrobiell vekst i drikkevann | 16 |
| 2.5.1 Temperatur | 16 |
| 2.5.2 Organisk karbon | 17 |
| 2.5.3 Fosfor | 18 |
| 2.5.4 Nitrogen | 18 |
| 2.6 Hvordan måles begroingspotensialet? | 18 |
| 2.7 Analyse av biofilmer | 21 |
| 2.7.1 Mikroskopering | 21 |
| 2.7.2 Billedanalyse | 23 |
| 2.8 Sensorsystemer for måling av mikrobiell aktivitet i biofilmer | 23 |
| 2.9 Andre destruktive analyser | 24 |
| 2.10 Overlevelse av patogene bakterier i biofilmer i drikkevannsledninger | 24 |
| 2.11 Effekt av vannbehandling på begroingspotensialet | 28 |
| 3. Måling av begroingspotensiale | 30 |
| 3.1 Bakgrunn | 30 |
| 3.2 Metodebeskrivelse | 31 |
| 3.2.1 Måling av assimilert organisk karbon | 31 |
| 3.2.2 Molekylfraksjonering av naturlig organisk materiale i vann | 35 |
| 3.3 Beskrivelse av prøvestedene | 37 |
| 3.4 Resultater og diskusjon | 38 |
| 3.4.1 Generelt | 38 |
| 3.4.2 Resultater | 39 |
| 3.4.3 Effekt av biologisk omsetning på ledningsnettet | 41 |
| 3.4.4 Begroingspotensialet som funksjon av molekylstørrelse | 42 |
| 3.4.5 Effekt av "alder" på det organiske materialet | 43 |
| 3.4.6 Begroingspotensialet som funksjon av vannbehandling | 43 |
| 4. Referanseliste | 45 |

Sammendrag

Det er gjennomført litteraturstudium med formål å forklare hvilke kriterier som må være til stede for å danne biofilmer i drikkevannsledninger, hvordan biofilmer kan karakteriseres / kvantifiseres og til sist i hvilken grad biofilmer spiller en rolle for overlevelse av humanpatogene bakterier. Arbeidet er utført fordi drikkevann (vann som næringsmiddel) blir å anse som en begrenset ressurs som må skjermes mot forurensing.

Det er en kjennsgjerning at biofilmer etableres i dagens drikkevannsledninger. Dette skjer til tross for en vannbehandling som inkluderer ett eller flere trinn for å fjerne mikroorganismer og tildels for å hindre gjenvekst av disse. Det er dokumentert at biofilmer kan fungere som reservoar for humanpatogene bakterier. Biofilmene kan i tillegg spille en vesentlig rolle ved forringelse av vannkvalitet og ledningsnett.

I rapporten gis en oversikt over nødvendige fysisk/kjemiske egenskaper i vann og ledningsnett for etablering av biofilmer. Organisk karbon som begrensende variabel diskuteres særlig inngående sammen med metoder for måling av vannets begroingspotensial (målt som assimilerbart organisk karbon (AOC) eller bionedbrytbart organisk karbon (BDOC)). I tillegg gis en kort oversikt over andre metoder for å kvantifisere eller kvalitetsbeskrive biofilmer.

NIVAs laboratorium har innarbeidet en metode for å måle assimilerbart organisk karbon (AOC), som er et mål på begroingspotensialet i vannet. Dette begroingspotensialet vil være en indikator på mulighetene for dannelse av biofilm i bassenger og rør.

Det er dernest gjennomført målinger av begroingspotensialet i vannkilder i Bærumsmarka, samt i rentvannet fra Bærum vannverk. Det er fokusert på å klarlegge sammenhengen mellom begroingspotensialet og henholdsvis totalt organisk karbon og farge, samt begroingspotensialet som funksjon av molekylstørrelse på det organiske materialet. Mens vannets farge i hovedsak er knyttet til naturlig organisk materiale med molvekt over 10.000, er begroingspotensialet først og fremst knyttet til organisk materiale med molvekt mindre enn 1000.

Det synes å være en klar sammenheng mellom begroingspotensialet og totalt organisk karbon i råvann for naturlig organisk materiale med molvekt mindre enn 1000, mens for organisk materiale med høyere molvekt enn 1000 er denne sammenhengen mindre klar. Forskjellene i begroingspotensialet i ferskt humusvann og i en innsjø nedstrøms viste seg å ha sammenheng med innholdet av totalt organisk karbon, og da spesielt organisk materiale med molvekt mindre enn 1000. Forskjellen i begroingspotensialet i de to vanntypene viste seg å være mindre enn forskjellene i farge og totalt organisk karbon, noe som har sammenheng med at det ferske humusvannet hadde en større andel organisk materiale med relativt høy molvekt.

Vannets begroingspotensial er av betydning for valg av renseprosesser. Flere av de tradisjonelle norske renseprosessene for fjerning av løste organiske forbindelser er utviklet for humusfjerning, og er spesielt egnet for å fjerne relativt store organiske molekyler (molvekt over 10.000). Disse rensemetodene er i mindre grad egnet til å fjerne den andelen av det organiske materialet som bidrar til begroing.

Oksidasjonsprosesser, og da spesielt ozonering, øker begroingspotensialet vesentlig, og bør ikke benyttes for behandling av humusvann uten et etterfølgende adsorpsjonstrinn og/eller biologisk rensetrinn.

1. Vannkvalitetsendringer i drikkevannsledninger

Et vannforsyningssystem består, noe forenklet, av en vannkilde, et vanninntak, et vannbehandlingsanlegg, et distribusjonsnett og husinnstallasjoner. Vannkvaliteten vil kunne endres i alle disse ulike delene av vannforsyningssystemet, og disse endringene er dels tilsiktet, som f.eks. inaktivering av patogener ved desinfeksjon, og delvis utilsiktet, som f.eks. dannelse av biprodukter ved desinfeksjon.

De vannkvalitetsendringene vi skal omtale her er de som finner sted i ledningsnettet. Disse endringene kan deles inn i:

- Kontaminering pga. innsug av forurenset vann. Dette forutsetter lekkasjer i ledningene og undertrykk i drikkevannsledningen.
- Slamdannelse pga. begroing i ledningsnettet, og etterfølgende sedimentering og utspyling. Dette kan også medføre økning eller reduksjon i turbiditeten, trykktapsøkning i ledningene, samt en økning i kimtallet (Johansen et al., 1987).
- Blanding av vann fra ulike vannkilder kan gi utfellinger eller oppløsning av avsatt materiale.
- Økt innhold av jern, og da gjerne i form av et rødbrunt slam eller vann. Dette skyldes korrosjon på ledningsnettet.
- pH-endringer pga. kjemiske reaksjoner med rørmaterialet.
- Utløsning av asbest fra asbestsementrør.
- Utløsning av kobber, sink og bly fra husinnstallasjoner.

De fire siste vannkvalitetsendringene er på ulike måter knyttet til at norsk vann er bløtt og relativt surt, og derfor vil kunne være korrosivt på de metallene og sementbaserte materialene som vannledningene består av.

De ulike fenomenene som er nevnt kan medføre endringer i vannkvaliteten mhp. en rekke ulike parametre pga. transporten gjennom ledningsnettet. De vannkvalitetsparametrene som kan endres er innholdet av patogener, kimtall, farge, turbiditet, suspendert stoff, jern, kobber, sink, bly, asbest, pH, alkalitet og kalsium (Fiksdal, 1996).

Korrosjon i ledningsnettet er et stort problem i Norge, og er en medvirkende årsak til de mange lekkasjene på distribusjonsnettet i Norge. Det er imidlertid etablert solid kunnskap både om hvordan korrosjonshastigheten kan variere som funksjon av vannkvaliteten, og om hvordan korrosjonen skal reduseres ved å justere vannkvaliteten ut fra vannbehandlingsanlegget (Hem and Vik, 1996, Vik and Storhaug, 1996).

Tilførsel av patogener til drikkevannet pga. lekkasjer er heldigvis ikke noe stort problem i Norge. I og med at det utarbeides planer for å redusere lekkasjene (Spigseth, 1995), er det håp om at problemene vil bli mindre på sikt.

Utfellinger og oppløsning av allerede utfelt materiale kan være et problem der vannkvaliteten endres pga. at ledningsnettet tilføres vann fra ulike kilder med vesentlige forskjeller i vannkvalitet. Dersom ledningsnettet normalt tilføres hardt grunnvann kan f.eks. tilførsel av et bløtt relativt surt vann medføre at utfellinger oppløses og at vannkvaliteten hos abonnentene preges av dette oppløste slammet (Giles, 1996).

Heterotrof begroing på vannledningsnettet har sin årsak i et begroingspotensiale i rentvannet fra vannbehandlingsanlegget. Utlekking av organisk karbon fra rør er mulig der rørene er av plastmaterialer eller fra innvendig korrosjonsbeskyttelse med epoxy (Arvin, 1996, Conroy et al., 1993). Både fordi det er maksimumskrav til hvor mye karbon som kan migrere fra et materiale i kontakt med vannet, og fordi støpejern, galvanisert jern og kobber dominerer som materialer i hovedledninger og husinnstallasjoner vil tilførsel av organisk karbon fra rørmaterialet være av vesentlig mindre betydning enn organisk karbon i råvannet.

Tilgangen på næringssalter kan være begrensende for begroingen, men det vil normalt være noe næringssalter slik at den begrensede tilgangen ikke vil eliminere begroing. Tilgangen på mikroorganismer er normalt ingen begrensning for biologisk vekst med den svakkloringen vi har i Norge.

2. Biofilmer i drikkevannsledninger, litteraturstudium

2.1 Generelt

Etablering av biofilmer på overflater nedsenket i vann er resultatet av en serie med fysiske, kjemiske og biologiske prosesser og reaksjoner. Svært ofte er tilnærmingen til problemstillinger knyttet til etablering av biofilmer faglig ensartet, og det finnes få arbeider som søker forklaringer utfra kunnskap om hvordan fysikk, kjemi og biologi griper inn i hverandre.

Fremvekst av biofilmer i drikkevannsledninger må forstås / forklares ut fra flere forhold. Kjemiske og fysiske egenskaper i overflatene som biofilmen dannes på, og kvaliteter i vannet som overflatene eksponeres til, spiller viktige roller.

Her vil det bli omtalt de viktigste faser i biofilmdannelse, kvaliteter i primærfilm og tidlig biofilm samt forhold ved drikkevannet som begrenser eller stimulerer biofilmdannelse. Det gis en oversikt over hvordan biofilmer kan måles og beskrives samt metoder som kan anvendes for å bestemme assimilert eller bionedbrytbart organisk karbon som oftest vil være den begrensende faktoren ved biofilmdannelse i drikkevannsledninger.

2.2 Biofilmdannelse

En opplest og vedtatt (og dokumentert) regel er at dersom en bakterie overføres til vann, vil den praktisk talt alltid ende opp som kolonidannere på en hvilken som helst overflate eller partikkel som "krysser dens vei". Det antas at > 99% av de til enhver tid levende vannbakterier sitter fast på en eller annen overflate, og praktisk talt alle overflater kan dekkes med biofilmer.

Selv de mest komplekse biofilmsamfunn begynner som "rene" bakteriefilmer. På denne måten vil det å studere dannelsen av bakterielle biofilmer være den fornuftige tilnærmingen til forståelse av hvordan disse komplekse biosamfunnene oppstår på overflater som eksponeres for vann.

Hendelsene som inntreffer i interfasen mellom overflaten som skal begros og væsken der mikro-organismene befinner seg i tiden før kolonisering bestemmer på mange måter egenskapene i den endelige biofilmen.

2.2.1 Fysikokjemiske faktorer

Egenskapene til en overflate endres kontinuerlig etter eksponering til vannmiljøer. Selv i vandige systemer med lave konsentrasjoner av organiske stoff, er slike endringer foranlediget av at det dannes en *organisk primærfilm* på overflaten (Charaklis, 1981).

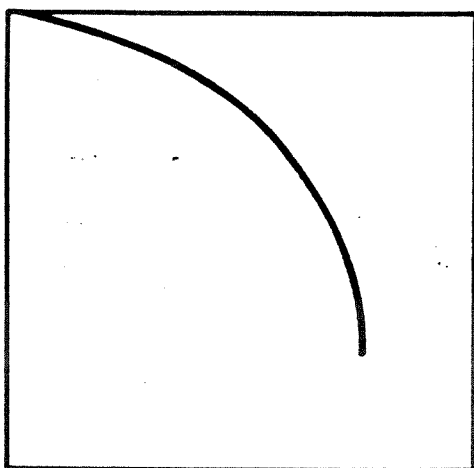
Begivenhetene umiddelbart før dannelsen av primærfilmen inkluderer konsentrering av løst organisk stoff i "interfasen" som dannes i et tynt sjikt like over overflaten. Denne akkumuleringen av organisk stoff nær opp til overflaten svekker tensjonskreftene (elektrostatisk skjold) som virker i slike interfaser.

Det finner altså sted et netto tap av fri energi når organiske molekyler adsorberes til overflater (Olson et al., 1991).

Den organiske primærfilmen som kan dannes på overflater bare få timer etter eksponering, vil i drikkevannsledninger hovedsakelig bestå av humusstoffer (Loeb og Neihof, 1975). Humusstoffer er anioniske, svakt sure, makromolekyler med et nitrogeninnhold på 1-5% hvorav mer enn 50% opptrer som heterosyklisk bundet. I tillegg til humusstoffer vil primærfilmer i drikkevannsledninger inkludere glykoproteiner (typiske biomolekyler) sammen med polysakkarider og fra tid til annen hydrokarboner (reduerte organiske forbindelser primært bygget opp av karbon og hydrogen).

Kinetikken som beskriver adsorpsjon av organisk stoff til overflater er ikke kjent, men det antas at "adsorpsjonsisotermer" følger en Langmuir-form¹ (Olsen, et al., 1991), d.v.s. et konvekst forløp som skissert i Figur 1.

Amount Adsorbed, C_S



Figur 1. Typisk konveks Langmuir-isoterm

En tommelfingerregel sier at en videre adsorpsjon av bakterier (mikroorganismer) og oppbygging av biofilm avhenger av at det er dannet en organisk primærfilm på forhånd (Charaklis, 1981).

2.2.2 Transport

Tre (3) fysiske forløp medvirker i transporten av små partikler i vann:

1. termiske prosesser (Brownske bevegelser og molekylær diffusjon),
2. strømnings effekter (turbulens og laminær strømming)
3. graviatsjonseffekter (sedimentasjon)

¹ Langmuir isotermer basert på konsentrasjoner: $C_S = k_1 C_M / (1 + k_2 C_M)$, hvor C_S er konsentrasjonen av adsorbent stoff, mens C_M er konsentrasjonen i væskefase. k_1 og k_2 er konstanter

2.2.3 Adsorpsjon av bakterier til overflater

Hva skjer når bakterier fester seg til overflater i fortynnede organiske løsninger, f.eks drikkevann? Allerede så tidlig som i 1943 beskrev Zobell (1943) en modell for adsorpsjon av bakterier til overflater. Tabell 1 beskriver modellens fysikokjemiske faktorer.

Tabellen omfatter ikke bakteriell adsorpsjon til ladete overflater (ionebyttere), vannløselige polyelektrolytter (flokkulering) eller immobilisering av hele celler gjennom kovalent binding.

Tabell 1. Adsorpsjon av bakterieceller til overflater nedsunket i fortynnede organiske løsninger.

| Adsorpsjonsfase | Mekanisme(r) | Netto effekt | Fysikokjemiske faktorer |
|-----------------|--|---|--|
| Reversibel | Likevekt mellom den elektrostatiske repulseringen mellom ladde partikler (celler) i dobbeltlag og London-van der Waalske tiltrekningskrefter | Løst tilknyttede celler konsentreres i en bestemt distanse fra overflaten (0.20 Å). Cellene lar seg lett fjerne | * pH, * elektrolytt-konsentrasjon, * konsentrasjon av organisk stoff, * retning og hastighet av væskestrøm |
| Irreversibel | Adhesjon grunnet biologisk aktivitet, f.eks syntese av og forankring med polyanioniske karbohydrater | Cellene bindes sterkt til overflaten p.g.a. biologiske broer mellom celle og overflate. For å fjerne cellene behøves hardhendte fysiske metoder | * tid * temperatur * overflatens fri energi (q) * kritisk overflatetensjon (q_c) * interaksjonkonstant (d) * fri energi for adhesjonen (WF) |

Bakteriell adsorpsjon til inerte overflater er altså en prosess som foregår i 2 faser. Det første trinnet er reversibelt og kontrolleres av elektrostatiske vekselvirkninger mellom celleoverflate og adsorbent. I det andre trinnet dannes det mer bestandige bindinger mellom celle og overflate. Dette trinnet benevnes derfor irreversibelt.

Bakterier som foreligger reversibelt "bundet" til en overflate vil lett fjernes f.eks ved risting eller, ute i naturen, p.g.a. vannstrømmens skjærkrefter.

2.2.4 Hvilken rolle spiller overflatens kvalitet?

Nær sagt alle overflater vil før eller siden tildekkes av biofilmer dersom forholdene ellers er tilrettelagt for det. Det er allikevel en kjensgjerning at biofilmer etableres ved ulike hastigheter alt avhengig av kvaliteten i den enkelte overflaten.

Visse materialer som brukes i drikkevannsledninger er vist å stimulere bakteriell vekst (Schoenen og Whese, 1988). Dette gjelder bl.a. gummi (både polybutylen og syntetiske produkter), silikon, PVC og polyetylen samt bitumenholdige belegg. Etter eksponering av bitumenbelegg til drikkevann i 48 timer ble det dokumentert utlaking av mer enn 40 organiske forbindelser som alle kunne stimulere bakteriell

vekst. For å hemme bakterievekst i det samme vannet var nødvendig klordose 30 mg/l (LeChevallier, 1990).

I marine systemer er det vist at biofilmer utviklet seg langt raskere på overflater av glass, stål og nikkel enn til kobber, PVC og Polytetrafluoretylen.

På overflaten av polytetrafluoren ble det bemerket spesielt sterk slimdannelse (Dexter, et al., 1975).

Overflatebehandling med produkter som avgir biocider eller andre toksiske forbindelser vil kunne forsinke, men neppe forhindre dannelsen av biofilmer. Slike produkter vil dessuten kunne komme i konflikt med miljø- og helseforhold.

2.3 Glykokalyx - Extracellular Polymer Substances (EPS)

Polysakkarider som bakteriene syntetiserer og skiller ut (eksopolymerer) er nødvendige for å oppnå fast forankring til overflater. Slike makromolekyler er demonstrert i et stort antall bl.a. gjennom mikroskopiske observasjoner av naturlige biofilmer. Slike ekstracellulære polymerer benevnes ofte *glykokalyx* i litteraturen og er et samlebegrep på et hvilket som helst polysakkarid-rikt belegg som dannes i en viss avstand fra bakteriens overflate; - d.v.s. til den ytre membranen i en gram-negativ bakterie og til overflaten av en gram positiv bakterie. I drikkevann vil hoveddelen av bakteriene være gram negative.

Glykokalyx hører til to hovedkategorier (Sutherland, 1988):

1. S-type
2. kapsel

Kapselkategorien er den dominerende. I en gram-positive bakterie inkluderer kapselen ofte teichoinsyrer som består av ulike polymerer inklusive polyol-fosfater og karbohydrater som glukose, galaktose og N-acetylglukosamin og N-acetyl-galaktosamin.

Kapselen i gram-negative bakterier kan være sammensatt av ulike homo- og heteropolysakkarider og de fleste bakterier produserer mer enn en polymertype av gangen,

Funksjon av den bakterielle glykokalyx i en biofilm er som bindemiddel eller en slags sement. Den binder bakterien irreversibelt til inerte overflater, og tillater samtidig bakterien å vokse, d.v.s. dele seg, dersom det er tilgjengelige næringsalter til stede i vannstrømmen.

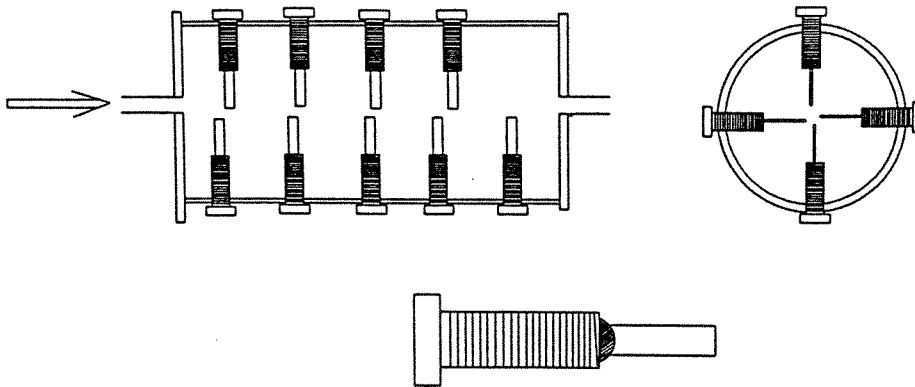
Glykokalyx gir bakterien fordeler utover det å kunne feste seg til overflater:

- øket overlevelse under forhold med næringsbegrensinger
C og N reservoar
- beskyttelse mot bakteriofag
virus som infiserer og potensielt ødelegger bakterier. Er oftest verts-spesifikke
- beskyttelse mot beitetrykk
protozoer og amøber spiser (eller beiter på) bakterier, og vil på denne måten influere på sammensetningen og konsentrasjonen av bakteriepopulasjonen
- beskyttelse mot ulike desinfeksjonsmidler
forhindrer en effektiv diffusjon og/eller forbruker oksyderende ekvivalenter stoffer

2.4 Metoder for å generere biofilmer i laboratorie- og pilotskala

I laboratorie-skala er det vanlig å benytte en eller annen form av "Robins device" (se Figur 2) for å etablere biofilmer for kvalitative og kvantitative undersøkelser. Slike monterbare enheter kan med letthet etableres i delstrømmer i ulike posisjoner (f.eks avstander fra behandlingsenhet) av drikkevannsnettet. Utformingen av Robins device kan tilpasses prøvetakingsfrekvens, laboratorieplass og analysemetoder (nedstrøms).

Systemet under er beskrevet av Manz et al. (1993) og består av en sylinder av rustfritt stål (l: 500 mm, Φ : 200 mm.) med 40 gjengete hull (Φ : 30 mm.). Skruer av rustfritt stål på 40 - 60 mm påmontert dekkglass i enden (i silikon) skrues inn i hullene. På den måten kan flere dekkglass eksponeres samtidig og hentes ut for analyse ved ulike tidspunkt (Figur 2).

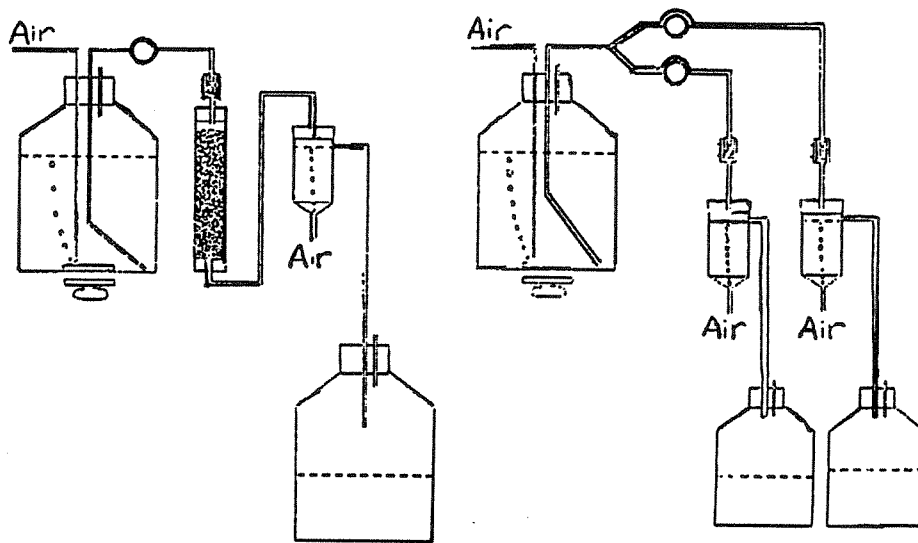


Figur 2. Robins device for etablering av biofilm (Manz et al., 1993)

En annen metode for å lage biofilmer på er å eksponere glasskuler for gjennomstrømmende vann. Slike systemer eller reaktorer er enkle å etablere i laboratoriet og består gjerne av et reservoar med ønsket vannkvalitet som gir fødevann til en glassylinder fylt med små kuler av glass eller annet materiale (f.eks PVC eller PE). Szewsyk et al., (1994) beskriver et system med glasskuler (Φ : 2 mm) i en glassylinder (l: 180 mm, Φ : 20 mm.) som ble drevet som et overislingssystem (Figur 3).

I et forsøk med dette utstyret ble etablering og overlevelse av en patogen *Escherichia coli* i en biofilm av en gram positiv bakterie (stamme B4) undersøkt.

Gjennomstrømningen ble satt til 150 ml / time og biofilmen ble dannet i løpet av en uke. En stabil konsentrasjon av bakterier i utløpet fra biofilmreaktoren ble oppnådd etter 2 uker.



Figur 3. Gjennomstrømningsanlegg for etablering av biofilm (Szewsyk et al., 1994)

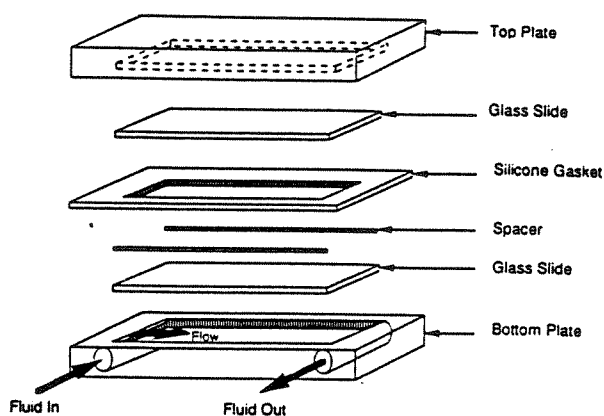
de Beer et al., (1994) anvendte en loopreaktor som inkluderte en slange med innmonterte stålplater. Etter en uke hadde biofilmen en tykkelse på 150 - 200 μm .

Parent et al. (1996) anvendte en rørslyfe med kjøling og med mulighet for å ta ut prøver av vann og biofilm uten å tømme sløyfen for vann.

Cargill et al., (1992) beskriver en meget enkel metode der 4-8 stålplater ble eksponert til vann i såkalte Mason-kolber (kolber med spesielt vide åpninger). Vannet ble holdt i bevegelse ved magnetrøring (285 r.p.m.).

Rogers og Keevil (1992) etablerte biofilmer på overflaten av steriliserte kuponger av glass eller polybutylen (gummi) med areal på 1 cm^2 i et kjemostatsystem. Montering skjedde i silikon v.h.a. nedsetting i spor.

Banks og Bryers (1991) anvendte flowcellen vist i Figur 4. Biofilmreaktoren er konstruert for å holde to standard objektglass (parallellprøver).



Figur 4. Flowcelle for etablering av biofilm (Banks og Bryers, 1991).

Glassene ble på forhånd vasket med 10% HCl og skyllet med filtrert autoklavert vann. Reaktoren ble vasket med 70% EtOH og skyllet med filtrert autoklavert vann. Driftskriterier gjengis i Tabell 2.

Tabell 2. Driftskriterier for flowcelle (Banks og Bryers, 1991)

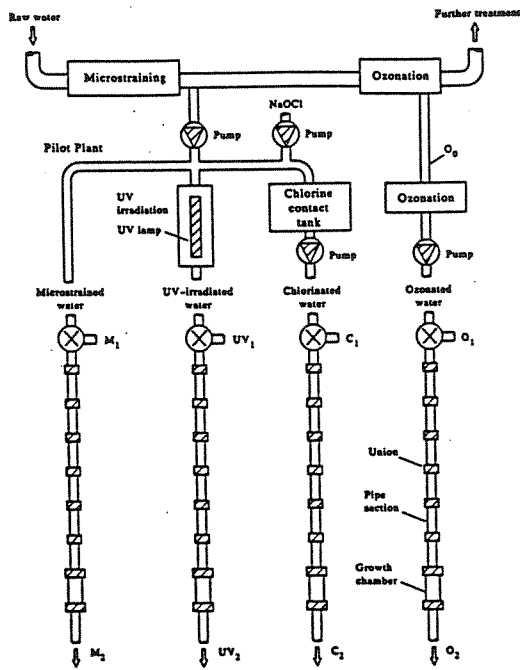
| Dimensjoner | Benevning | |
|---|----------------------------------|------------------------|
| Innvedig bredde | cm | 2 |
| Innvendig lengde | cm | 7.5 |
| Innvendig høyde | cm | 0.5 |
| Overflate areal (netto) | cm ² | 39.5 |
| Volum | cm ³ | 7.5 |
| <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> | | |
| Driftskriterier | Benevning | |
| Tilførselshastighet til flowcelle | cm ³ /min | 2 |
| Gjennomstrømningshastighet | cm/s | 3.2 x 10 ⁻² |
| Reynolds tall | $d_h \times v_m \times \Psi/T^2$ | 2.67 |
| Skjærkrefter | N / m ² | 3.9 x 10 ⁻⁴ |
| Temperatur | ° C | 20 |

Dersom formålet er å påvise spesielle bakterier eller kjemiske markører i biofilmen er behovet for å opprettholde biofilmens opprinnelige struktur ikke tilstede. Systemer for å etablere biofilmer for destruktive analyser består vanligvis av vannledningsrør av ulike dimensjoner og kvaliteter.

Schulze-Röbbecke og Fischeder, (1989) benyttet f.eks silikonslanger med indre diameter på 3 mm for å påvise *Mycobacterier* i biofilmer. Slangene ble påmontert et forurenset varmtvannsystem. Gjennomstrømningen var satt til 0.2 ml/s og slangelengder på 5 cm ble klippet av for ulike undersøkelser ved regulære tidsintervaller.

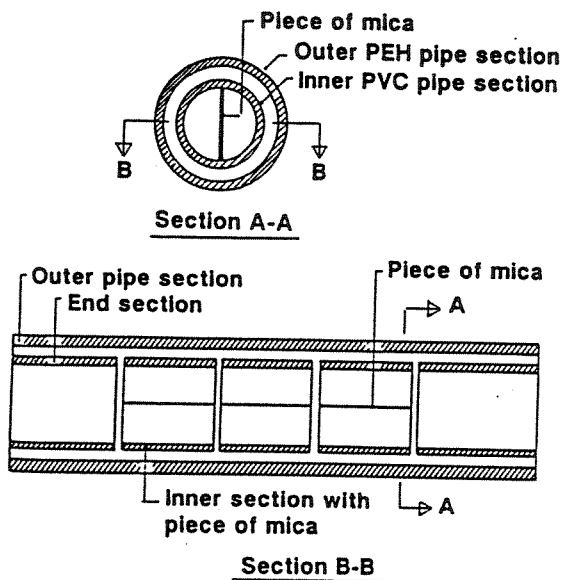
Lund og Ormerod, (1994) utviklet et testsystem bestående av parallelle linjer bygget opp av 13 PEH rør (drikkevannskvalitet) hvert med lengde på 200 mm og en indre diameter på 20.4 mm. Rørbitene ble forbundet med ledningen gjennom hurtigkoplinger (Figur 5).

² $d_h \times v_m \times \Psi / T = \text{Reynoldsfaktor}$; - d_h : hydraulisk diameter for ikke sirkulære snitt, v_m : gjennomsnittlig gjennomstrømningshastighet, Ψ : væsketetthet, T: viskositet



Figur 5. Pilotsystem for generering og undersøkelser av biofilmer i drikkevannsledninger (Lund og Ormerod, 1994)

På enden av hver PEH-linje etableres det forfatterne kaller et "vekstkammer" med mulighet for å innsette glimmerskiver vertikalt på vannstrømmen (Figur 6).



Figur 6. Skisse over vekstkammeret (Lund og Ormerod, 1994).

Formålet var å kunne følge etableringen av biofilmen. Glimmer egner seg godt for direkte studier i Scanning Elektron Mikroskop (SEM). Systemet ble designet for turbulente vannstrømmer med gjennomstrømninger på 0.2 - 0.25 l/s som korre-sponderer til en Reynoldsverdi på $(9.6 - 12) \times 10^3$.

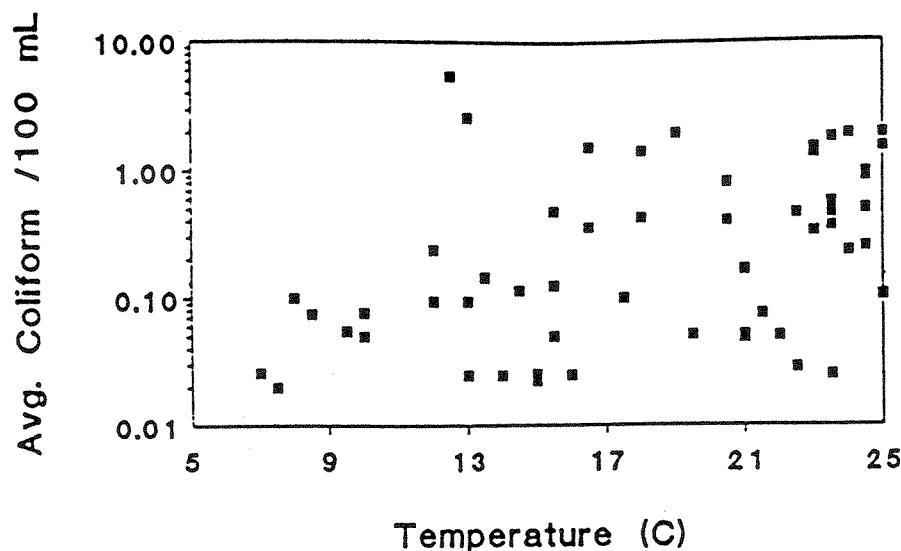
2.5 Faktorer som påvirker mikrobiell vekst i drikkevann

2.5.1 Temperatur

Vanntemperaturen er en viktig variabel som regulerer bakterievekst. I drikkevannsledninger vil temperaturen, direkte eller indirekte, påvirke de viktigste faktorer som har med mikrobiell vekst å gjøre. Temperaturen påvirker veksthastigheten, effekten av (kinetikken i) aktuelle behandlingsprosesser, oppløsning og spredning av desinfeksjonsrester, korrosjonshastigheter og gjennom endret vannbehov hos publikum virker temperaturen indirekte inn på vannets hydrauliske egenskaper og gjennomstrømningshastigheten i ledningsnettet.

Vanntemperaturen er det imidlertid i praksis vanskelig å påvirke gjennom tiltak. Heldigvis er den mikrobielle aktivitet vesentlig lavere i kaldt vann, d.v.s. temperaturer $< 13-15^{\circ}\text{C}$, enn i varmt vann (LeChevallier et al., 1991).

Figur 7 viser forbindelsen mellom forekomsten av koliforme bakterier og temperaturen i drikkevann.



Figur 7. Forbindelse mellom temperatur og gjennomsnittlig forekomst av koliforme bakterier (LeChevallier, 1990).

Fransolet, et al. (1985), viste at både hvilefasen før aktiv vekst (lagfase) og celleutbyttet ble påvirket av temperaturen;- f.eks var lagfasen for *Pseudomonas putida* (i drikkevann) 3 dager ved 7.5°C , men bare 10 timer ved 17.5°C . Dette understøtter påstanden om at mange bakterier vil være lite aktive ved lave temperaturer, noe som øker muligheten for at de vaskes ut av et ledningsnett. Fransolet et al. (1985) fant også at *Escherichia coli* og *Enterobacter aerogenes* vokste meget langsomt ved temperaturer $< 20^{\circ}\text{C}$ (veksthastigheter på < 0.1 celledelinger / time).

Perioder med regnvær viser seg ofte å sammenfalle med rapporter om koliforme bakterier i drikkevann. Lowther og Moser fant at TOC-nivåer i råvann var på det høyeste når turbiditeten økte etter regnvær.

LeChevallier et al., (1990) dokumenterte en sammenheng mellom regnvær og forekomst av koliforme bakterier i ledningsnett. Oppblomstringen skjedde imidlertid først en uke etter nedbørsperioden, noe som forklares med en viss transporttid for regnvann til ledningsnettet samt at bakteriene (som er tilstede) ikke responderer momentant på næringstilførselen, men må gjennomgå en lagfase først.

2.5.2 Organisk karbon

Organisk karbon utnyttes av heterotrofe bakterier enten til nydanning av biomasse (assimilasjon) eller som en kilde til energi (dissimilasjon). Mesteparten av det organisk karbon som finnes løst i drikkevann er i en naturlig form og stammer opprinnelig fra levende planter og plantemateriale i forråttelse. Disse komponentene vil ofte inkludere humussyrer og fulvinsyrer, sukkerpolymere, proteiner og karboksylsyrer. I norske drikkevannskilder som leverer vann til anlegg for > 100 personer kan TOC-konsentrasjoner ligge innenfor et vidt område (fra $\ll 1$ mg TOC/l til > 20 mg TOC/l), mens drikkevannsforskriftene for godt drikkevann angir en absolutt grense på < 5 mg TOC/l og en veiledende verdi på 3 mg TOC/l (SHO, 1995).

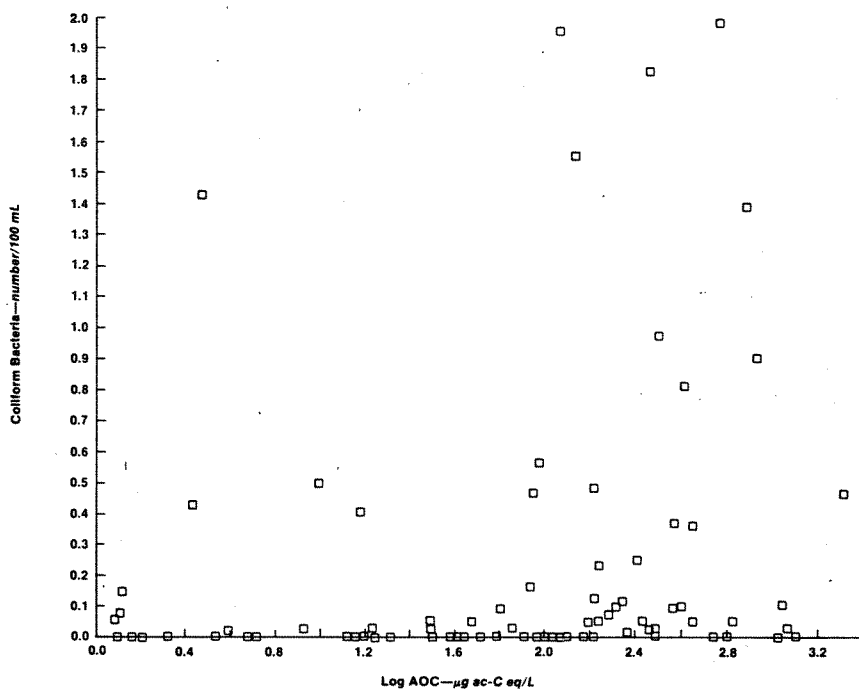
Fordi heterotrofe bakterier behøver karbon, nitrogen og fosfor i et vektforhold tilnærmet 100:10:1, vil organisk karbon ut fra kunnskap om drikkevannskvaliteter være det begrensende næringsstoffet i drikkevann.

Den delen av organisk karbon i drikkevann som lett kan utnyttes av bakterier til vekst kalles for Assimilerbart Organisk Karbon (AOC) eller Bionedbrytbart (løst - Dissolved) Organisk karbon (BDOC).

En distinksjon mellom disse to begrepene er at sistnevnte også inngår som energikilde (dissimilatorisk karbon); - d.v.s. at forbindelsen mineraliseres (under dannelse av CO_2 og H_2O).

AOC utgjør normalt en liten fraksjon (0.1 - 10 %) av TOC. LeChevallier har vist at AOC-nivåene avtar med avstand fra kilden (behandling) og at forbruket manifesteres som biofilmer på overflaten dette.

Hvor mye AOC må drikkevannet inneholde før gjenvekst av bakterier blir et problem? Le Chevallier viste (1993) at gjenvekst av et *E.coli* isolat ble hemmet ved AOC-nivåer < 54 $\mu\text{g/l}$. Van der Kooij et al., (1985) viste at vann som innehold mer en 50 μg AOC/l alltid legger forholdene til rette for gjenvekst av heterotrofe bakterier. Med utgangspunkt i at drikkevannet skal inneholde < 5 mg TOC/l, og at AOC utgjør inntil 10 % av TOC, kan gjenvekst av både indikatorbakterier og heterotrofe bakterier være et problem. Figur 8 viser sammenhengen mellom AOC (ved t_0) og koliforme bakterier i ledningsnettet syv dager etter ($t_{7\text{dgn}}$) (Le Chevallier, 1990).



Figur 8. Forholdet mellom AOC og koliforme bakterier i drikkevann (LeChevallier, 1990).

2.5.3 Fosfor

Fosfor blir ikke konsumert gjennom mikrobiell aktivitet, men resirkuleres tilbake til miljøet. Resirkuleringshastighetene er derfor viktigere enn fosforkonsentrasjoner i vannet i ledningsnett som forklaring på eventuell begrensning. Ut fra kunnskap om drikkevannskvaliteter kan fosfor være begrensende for vekst (LeChevallier, 1990, Hem og Weideberg 1994).

2.5.4 Nitrogen

Nitrogen anses ikke å være begrensende for bakterievekst i drikkevannsledninger. Når det gjelder nitrogenets rolle for oppvekst av koliforme bakterier kan det imidlertid være vanskelig å konkludere fordi enkelte *Klebsiella*-stammer kan fikserer nitrogen fra luftas nitrogen (LeChevallier, 1990)

2.6 Hvordan måles begroingspotensialet?

Det finnes mange metoder for å bestemme assimilerbart organisk karbon (AOC) eller bionedbrytbart organisk karbon (BDOC). Metodene deles inn i biomassebaserte og DOC-baserte metoder (Huck, 1990):

Biomassebaserte metoder :

Disse metodene har sitt utgangspunkt i at AOC er begrensende for vekst. Metodene kan igjen deles i to etter hva slags inokulum som brukes.

Metodene til van der Kooij et al., (1982) og Kemmy et al. (1987) benytter kjente organismer, mens metodene til Werner (1985) og Jago og Stanfield (1989) benytter den naturlige floraen i prøven.

Førstnevnte metode har fordelen av at de er reproducerbare og at resultatene kan sammenliknes. Den naturlige floraen er imidlertid tilpasset de eksisterende forhold i prøven. Den vanligste måten å måle biomasse på er gjennom registrering av kolonidannende enheter (CFU/ml prøve). I flere av metodene konverteres den målte verdien til en spesifikk organisk konsentrasjon gjennom bruk av en omregningsfaktor.

I metoden til van der Kooij (1982) måles AOC i vann ved å registrere veksten til *Pseudomonas fluorescens* stamme P17. Bakterien er representant for en vanlig "drikkevannsbakterie" som kan utnytte et uttall organiske substrater i relativt høye og lave ($\mu\text{g/l}$) konsentrasjoner. Bakterien har ingen behov for spesifikke vekstfaktorer og kan bruke nitrat som terminal elektronakseptor (dissimilatorisk) samt både nitrat og ammonium som N-kilde (assimilatorisk).

Selv om en enkelt organisme ikke kan anvende alle mulige assimilerbare forbindelser i vann, så vil AOC-verdier fra oppdyrking av *Pseudomonas fluorescens* P17, representere / inkludere omdanning av aminosyrer, karboksylsyrer, hydrokarboksylsyrer, alkoholer og karbohydrater. Ett unntak er oksalsyrer som bl.a. dannes ved ozonering. En *Spirillum* stamme, NOX, som er i stand til å benytte oksalat er imidlertid identifisert og blir nå tilsatt i van der Kooij-testen (van der Kooij et al., 1984 og 1989).

Metoden kan nå også inkludere en *Flavobacterium* sp. som er i stand til å metabolisere glyserol.

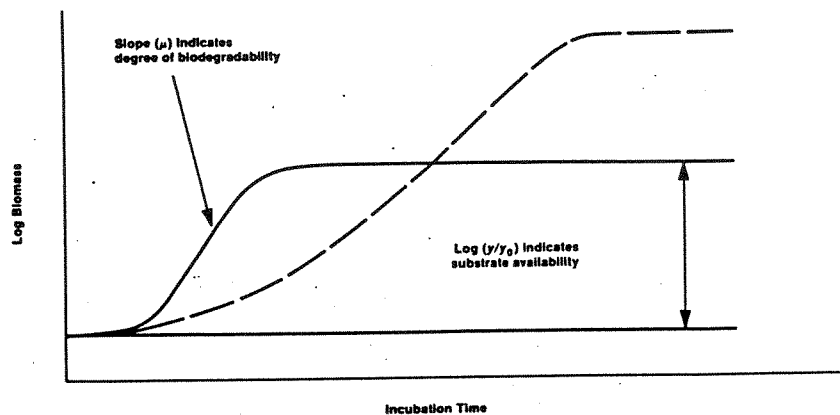
Første trinn i metoden omfatter ødeleggelse av alle vegetative celler til stede i prøven. Dette skjer ved moderat oppvarming av prøven til 60°C i vannbad før overføring til 60°C ovn med behandling i 30 minutter.

Etter nedkjøling inokuleres prøven fra stockkulturer av *Pseudomonas fluorescens* P17 og *Spirillum* NOX (eventuelt *Flavobacterium* sp.). Prøven holdes uten risting ved 15°C til det maksimale antall kolonier på relevant medium oppnås.

CFU registreres normalt daglig. van der Kooij har etablert en korrelasjonsfaktor mellom CFU / ml prøve og utbytte av *P. fluorescens* P17 på eddiksyre (Y_{acetat}). Metoden er for øvrig foreslått forenklet av Kaplan og Bott (1988 og 1993). Forenklingen går bl.a. på bruk av 40 ml 's medisinglass istedenfor store 1 liters kolber samt at resultatene er uavhengige av om inokulum er hentet fra eksponensiell vekst eller stasjonærfase.

Kemmy et al., (1985) benytter sterilfiltrert prøve istedenfor varmebehandlet og erstatter *Spirillum* st. NOX og *Flavobacterium* sp. med to *Corynebacterier* og en *Curtobacterium*.

Werner (1985) benytter den naturlige floraen i sterilfiltrert vann. Bakterier vasket av filterflaten inokuleres i en kuvette som holdes inkubert ved 20°C . Turbiditet måles hver 30 minutt over en periode på 30 til 120 timer. Vinkelkoeffisienten i et turbiditet/tid-diagram (μ) forteller noe om substratkvaliteten (bionedbrytbarhet), mens tallverdien $\log(y/y_0)$ indikerer substratkvantiteten (Figur 9).



Figur 9. Typiske resultater oppnådd i forsøk der Werner-metoden er benyttet (Werner und Hamsch, 1988).

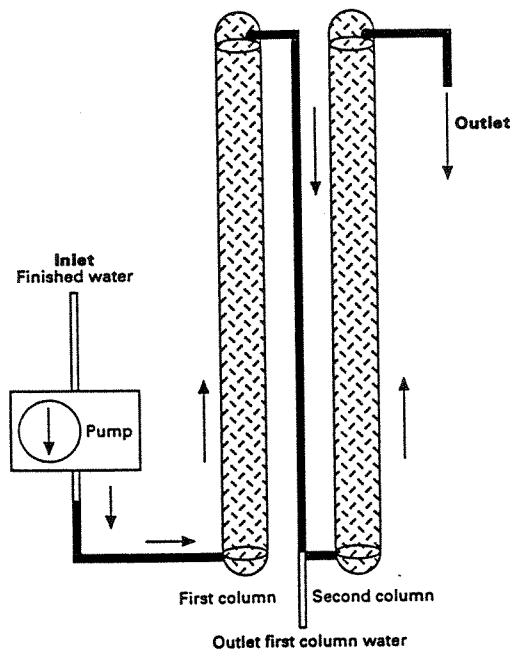
Stanfield og Jago (1989) måler bakteriell vekst indirekte gjennom registreringer av ATP-konsentrasjoner (adenosin trifosfat). ATP verdier konverteres til AOC-verdier ved bruk av en standard omdanningsfaktor. En liknende prosedyre er utviklet av Le Chevallier et al. (1993). Forfatterne korrelerer for øvrig metoden med resultater fra standard oppdyrking etter metoden til van der Kooij (1989).

DOC-baserte metoder:

Disse metodene er basert på å måle forskjeller i DOC før og etter inkubering av en prøve (Δ DOC). Nedbrytningen kan enten skje i batch eller i gjennomstrømmningssystemer (biofilm).

Servais et al., (1987) har utviklet en metode som kan registrere BDOC-verdier > 0.3 mg / l. Prøven sterilfiltreres gjennom membranfilter ($0.22 \mu\text{m}$) før den inokuleres med 1% (v / v) råprøve som har passert et filter ($2 \mu\text{m}$) for å eliminere protozoer. Prøven inkuberes mørkt i 4 uker. DOC registreres ved start og avslutning av inkuberingen og differensen avleses som BDOC i prøven. Metoden gir ingen informasjon om kinetikken i den biologiske nedbrytningen.

Ved å lede vannprøven gjennom en biofilm oppnår Frias et al. (1992) og Ribas et al. (1995) å forkorte BDOC-analysen vesentlig (3-5 timer). En prinsippsskisse av reaktoren er vist i Figur 10.



Figur 10. Skisse av reaktoroppsett for registrering av bionedbrytbart organisk materiale i vannprøver (Riba et al., 1995)

Oppsettet inkluderer 2 glasskolonner som er fylt opp med inert støttemateriale (porøse glasskuler med diameter 1-2 mm, porediameter på 60 - 300 μm , porevolum på 55-60 % og et areal på 0.15 m^2/g). Prøven pumpes opp i kolonnene med en hastighet på 3.5 ml/min. DOC ble registrert i utløpet og innløpet etter en hydraulisk oppholdstid på 2 timer.

2.7 Analyse av biofilmer

Biofilmer kan karakteriseres kvalitativt eller kvantitativt ved bruk av metoder som enten ødelegger biofilmen eller metoder hvor biofilmen beholdes intakt.

2.7.1 Mikroskopering

Mikroskopering er et vanlig hjelpemiddel for å undersøke utseende eller morfologiske egenskaper i biofilmen (McCoy et al., 1991) eller vurdere tykkelser av slike (Nielsen, 1987). Metoder som utnytter vanlig lys mikroskop vil svært ofte være ikke-destruktive.

Mikroskopering av preparater behandlet med fargestoff :

Etter hvert har det dukket opp metoder som benytter mikroskopering av biofilmer behandlet med fargestoff. Slike kan danne spesifikke bindinger med bakteriens arvemateriale (DNA og RNA), eller koples til antistoff som reagerer med antigener i bakteriens cellevegg, eller til oligonukleotidprober som igjen hybridiserer (binder seg til) med DNA-sekvenser eller sekvenser av RNA. Sistnevnte metoder kan gjøres meget spesifikke.

Acridine orange (AO) er et fluorescerende fargestoff som binder seg til DNA og RNA i cellene som sitter i en biofilm. Bølgelengden i det fluorescerende lyset forteller noe om cellens tilstand (bølgelengde avhenger av forholdet mellom DNA og RNA).

Tolkningen av AO-preparater kan imidlertid være vanskelig, da fargestoffet har en tilbøyelighet til å binde seg uspesifikt til molekyler i celleveggen eller til negativt ladede jordpartikler.

Yu et al. (1993), beskriver en metode som anvender AO-farging for å studere desinfeksjon av biofilmer (*Klebsiella pneumoniae* Kp1). Det ble gjort forsøk med monolagfilmer, og selve fargeprosedyren tok ikke mer enn 5 minutter.

Et annet hyppig brukt fluorescerende fargestoff er 4,6-Diamidino-2-PhenylIndol (DAPI) som bindes spesifikt til DNA. DAPI er mindre belemret med støy (jfr. uspesifikk binding som for AO), men gir ofte svake signaler.

Mikroskopering som metode for å dokumentere aktivitet (aktive bakterier):

5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium klorid (CTC) og rodamin (Rh 123) er fargestoffer som benyttes for å angi aktivitet i biofilmer. CTC er en løselig redoks indikator som reduseres i bakterier med aktiv respirasjon. Produktet er et fluorescerende krystall CTC-formazan (Yu og McFeters, 1993, McFeters et al., 1995).

Rh 123 opptas av bakterier i hastigheter som er direkte proporsjonale med oppbyggingen av H⁺-gradienten over bakteriemembranen (cellas protone motive force = pmf).

Akkumulering av intracellulær Rh 123 kan registreres ved bruk av fluorescens mikroskopering (Yu og McFeters, 1993).

Mikroskopering av preparater behandlet med fargestoff (hybridteknikk):

Szewzyk et al (1993) undersøkte kolonisering og overlevelse av en patogen stamme av *Escherichia coli* i en homolog biofilm dannet fra en benzoat-nedbrytende gram-positiv bakterie (stamme B4). Undersøkelsen ble gjennomført i en flow reaktor. *E. coli* ble dokumentert å være i stand til å vokse i B4-biofilmen og "reinfisere" vannstrømmen i høye konsentrasjoner.

Blandede biofilmer med B4 og *E. coli* ble også dyrket på glassplater for detaljert eksaminering av romlig utbredelse. Individuelle celler så vel som mikrokolonier med *E. coli* ble påvist i biofilmene ved fluorescensmikroskopering. Biofilmen ble behandlet med en fluorescerende (koplest fargestoff) 23S-rRNA-søkende oligonukleotidprobe. *E. coli* fordelte seg i alle lag av de jevnt tykke biofilmene.

I den senere tid har en lang rekke med spesifikke rRNA-søkende oligonucleotidprober blitt utviklet for et kommersielt marked (De Long et al, 1989, Giovannoni et al., 1988 og Manz et al., 1992).

En stor fordel med oligonukleotidprobene er at liten størrelse gjør dem i stand til å diffundere inn i biofilmene (Amman, 1992). Siden de ofte er rettet mot ribosomalt RNA er påvisning avhengig av konsentrasjoner og dermed også av statusen til den enkelte cella; - høye rRNA-konsentrasjoner = aktive celler.

2.7.2 Billedanalyse

For å få kunnskap om etablering av, cellebevegelser i, og avskallinger fra en biofilm utviklet Escher og Characklis, (1988) en meget spesiell metode for gjennomføring av kontinuerlige billedanalyser. Bakterieceller fra en kjemostat ble tilført et kapillarrør med kvadratisk tverrsnitt påkøplet et høyoppløsnings-videokamera.

Forfatterne konkluderte med:

- At billedanalyser tillater direkte registreringer (målinger) av essensielle og uavhengige prosesser vedrørende kolonisering av en overflate
- At billedanalyser egner seg til in-situ observasjoner av ulike aktivitetsnivåer i en biofilm; - slik som vekst, hastighet og retning av/på bevegelse og organismenes orientering
- At billedanalyse gir informasjon om bakteriens romlige orientering under selve adsorpsjonsfasen
- At billedanalyse kan dokumentere at binding til overflater er avhengig av skjærkrefter og CFU-konsentrasjoner i bulkfasen, mens vekst-relaterte prosesser avhenger av cellekonsentrasjoner på overflaten
- At billedanalyser bygger opp under at binding til overflater er nullte-ordens prosesser, mens vekstrelaterte prosesser er prosesser av første orden (Monod-kinetikk)
- At billedanalyser bygger opp under konklusjonen som sier at selv om vekst (etter kort tid) er den dominerende prosessen for biomasseøkning i en biofilm, vil mengde akkumulerte CFU være avhengig av ulike adsorpsjonsprosesser.

2.8 Sensorsystemer for måling av mikrobiell aktivitet i biofilmer

Til tross for at biofilmer er svært tynne fra noen hundre μm til noen få millimeter vil det normalt innrette seg en vertikal sjiktning som reflekterer respirasjonsprosesser.

Ved bruk av mikroelektroder kan slike mikrosjiktninger studeres med en oppløsning på ned mot 100 μm (Revsbech og Jørgensen, 1986).

Oksygenrespirasjon og fotosyntese i biofilmer er nøye undersøkt i de senere år (Chen og Bungay, 1989, Kuenen et al., 1986).

Utvikling av en oksygen/nitrogenoksyd-elektrode og mikroelektroder for ammonium og nitrat har gjort det mulig å undersøke nitrogen-omsetningen i biofilmer (Debeer og Swerts, 1989, Revsbech et al., 1988).

Kühl og Jørgensen (1992) har tilrettelagt en metode for å måle sulfatreduksjon og sulfid oksidasjon i biofilmer.

de Beer et al. (1994) registrerte klor-diffusjon i biofilmer ved desinfeksjon ved bruk av en mikroelektrode som var følsom for klor i mikromolarområdet.

2.9 Andre destruktive analyser

Ved destruktive metoder skrapes biofilmen arealspesifikt av overflaten og opparbeides for ulike undersøkelser:

- Analyser av våtvekt og tørrvekt (Pedersen, 1987)
- Måling av ATP-nivåer og C/N-forhold (Afring og Taylor, 1979)
Slike analyser sier noe om aktivitetsnivået eller "helsestatus" i biofilmen
- Analyse av protein og polysakkarider (Afring og Taylor, 1979)
Dette er analyser som er biomasserettet og faktisk også spesifikke for bakterieregistreringer. Polysakkaridbestemmelser vil være egnet til å beregne bakteriefilmmasse.

Elektronmikroskopiering av snittpreparater av fargede *cryopreparater* benyttes dessuten ofte til å se på romlig fordeling av bakterier i biofilmer samt registrering av aktivitetsgradienter, f.eks i tilknytning til effekt av desinfeksjonsmidler (Huang et al., 1995).

2.10 Overlevelse av patogene bakterier i biofilmer i drikkevannsledninger

Gjenvækst av patogene bakterier i drikkevannssystemer er godt kjent som fenomen. Normalt vil ingen patogene bakterier kunne påvises i behandlingsanleggene selv ved bruk av sensitive metoder som påviser hvilende bakterier eller registrere aktivitet gjennom bruk av fargestoffer. Gjenvækst av koliforme bakterier skjer i distribusjonssystemet i noen avstand fra behandlingsanlegget, ofte til tross for høye restkonsentrasjoner av desinfektant (f.eks klor). Den vanlige forklaringen på slike gjenvækstfenomener er at bakterier kommer inn i distribusjonssystemet og bindes til biofilmer der de får utvikle seg.

Det er utførlig dokumentert at overflater i drikkevannsledninger koloniseres av bakterier i mer eller mindre homogene biofilmer. Elektronmikroskopistudier av overflatebelegg viser alle samme egenskaper:

1. en hard, men porøs overflate
2. en mengde med krystaller like under overflaten
3. mikroorganismer dominerer like ved overflaten
4. mikrokolonier av ensartede organismer som indikerer aktiv vekst i overflaten

X-dispersjonsanalyser av overflater i vannledningsnett har vist at tuberkler er bygget opp av jern, kalsium, silisium, fosfor, aluminium og svovel (Tuovinen et al., 1980, Ridgeway og Olson, 1981), med jern som det dominerende materialet (LeChevallier et al., 1987). Overflaten av disse jerntuberklene er ofte dekket med sprekker som gir utvidet areal for binding, utvikling og beskyttelse av bakterier. Tuovinen et al., (1980) dokumenterer gradienter m.h.p. Eh og pH innover i tuberklene. De bakteriene som dominerer i prøver av biofilmer, partikler eller slam fra drikkevannsledninger i konsentrasjoner på typisk 2×10^3 CFU / 100 cm² til 10^9 CFU / cm² (LeChevallier, 1990) eller 100 CFU / g TS til 3.1×10^8 CFU / g TS (LeChevallier, 1990) er beskrevet i Tabell 3.

Tabell 3. Bakterier i biofilmer fra distribusjonssystemer for drikkevann (LeChevallier et al., 1987)

** : dominerende art, * art som vanligvis påvises

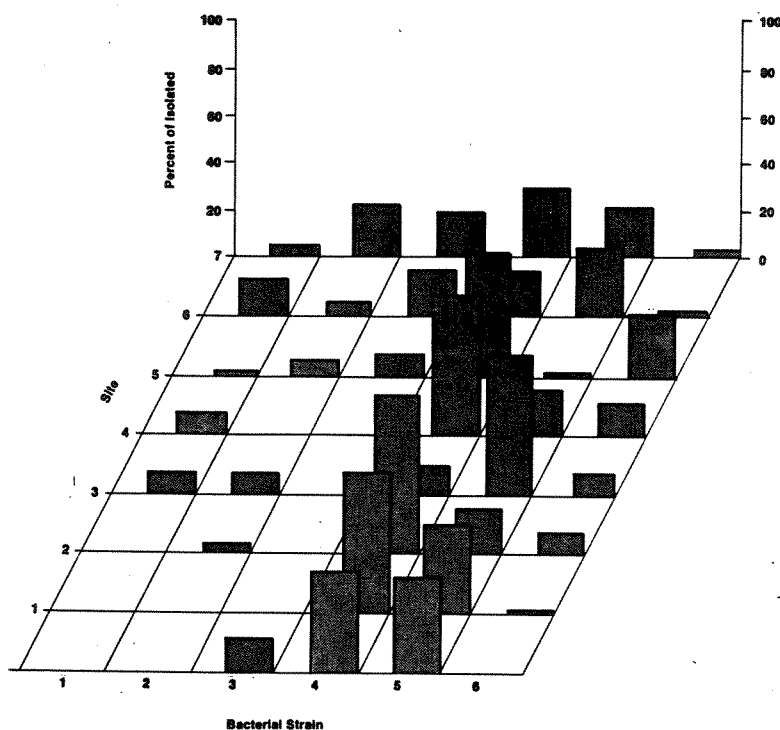
| Bakterie | Vann | Fnokker | Sediment | Tuberkler | Biofilm |
|----------------------------------|------|---------|----------|-----------|---------|
| <i>Pseudomonas vesicularis</i> | ** | ** | * | | ** |
| <i>Flavobacterium spp.</i> | ** | ** | * | | ** |
| <i>Pseudomonas dimunita</i> | * | | | * | |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | | | | | * |
| <i>Pseudomonas pickettii</i> | | | | | * |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | | | * | | * |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | | | * | * | |
| <i>Pseudomonas putida</i> | | | | * | |
| <i>Pseudomonas paucimobilis</i> | * | | | * | |
| <i>Pseudomonas maltophila</i> | * | | | | |
| <i>Alcaligenes spp</i> | | | | | * |
| <i>Acinetobacter spp</i> | * | | | | * |
| <i>Moraxella spp</i> | * | | * | | * |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> | | | | | * |
| <i>Arthrobacter spp</i> | | | ** | ** | * |
| <i>Corynebacterium spp.</i> | | | | * | * |
| <i>Bacillus spp</i> | | | | | * |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | | | | | * |
| <i>Micrococcus spp.</i> | * | | | | |

Lund og Ormerod (1994) påviste *Leptotrix* spp. og *Hyphomicrobium* spp i biofilmer utviklet i et pilotskala-anlegg. Førstnevnte er for øvrig observert i norske vannbehandlingsanlegg selv ved lave mangankonsentrasjoner i råvannet (Hem og Weideborg, 1994).

Som vi ser av Tabell 3 er tarmbakterier eller indikatororganismer (med unntak av *E. agglomerans*) ikke regnet som vanlige beboere av drikkevannsledningsnett.

På tross av at biofilmer finnes i drikkevannssystemet er det sparsomt med beviser på at patogene bakterier utvikles.

Undersøkelser i New jersey viste at koliforme bakterier i drikkevannet stammet fra biofilmer i ledningsnett (LeChevallier, 1987). Målinger viste at konsentrasjoner av koliforme bakterier økte med opp til 20 ganger med avstand fra vannverket. Beregninger viste også at disse konsentrasjonsøkningene ikke kunne skyldes vekst i vannmassene alene, men måtte ha sin årsak i vekst i biofilm i ledningsnett. Identifikasjon av organismene dokumenterte også en diversitetsøkning med avstand fra vannverket (Figur 11).



Figur 11. Koliform diversitet som funksjon av avstand fra vannverk. 1: *Escherichia coli*. 2: *Klebsiella pneumoniae*, 3: *K. oxytoca*, 4: *Enterobacter agglomerans*, 5: *E. cloacae*, 6: andre (LeChevallier et al., 1987)

Seidler et al. (1977), påviste *Klebsiella* spp. som vokste i slimlag på trestaver nedsatt i lagringstanker av behandlet drikkevann. Disse bakteriene var for øvrig årsak til at konsentrasjonene av koliforme bakterier overskred grensen for drikkevann (membranmetode) med opp til 40 ganger. Olson (1982) rapporterte om *E.coli* fra organiske overflatefilmer på betongrør i drikkevannledninger i Metropolitan Vanddistrikt i California. Victoreen (1977) isolerte *Enterobacter cloacae* og *Serratia marscescens* fra tuberkler i overflater fra ledningsnett i Wilmington.

Fordi diversitet er en god indikator på barrierer eller seleksjonspress i et miljø viser resultatene i Figur 11 at det aktuelle distribusjonsnett egner seg godt for oppvekst av koliforme organismer. I et fattig miljø ville vi forventet kun et fåtall arter med høyt spesialiserte egenskaper.

Olivieri et al., (1984) påviser og forklarer funn av *Klebsiella* spp. og *Enterobacter* spp. med oppvekst og overlevelse i biofilmer. Bakteriene ble påvist ved høye temperaturer i drikkevannet og ved så høye restkonsentrasjoner av fritt klor som 5-8 mg/l. Frittlevende bakterier overlevde ikke slike konsentrasjoner, mens bakterier i biofilmer tolererte dosene. Forfatterne bruker også negativ påvisning av *Clostridium pefringens* som indikasjon på at de koliforme bakteriene må ha utviklet seg i biofilmer internt. *C. pefringens* vil alltid finnes sammen med koliforme bakterier og en positiv test ville indikert ekstern kilde.

I en undersøkelse av drikkevannskilder i England ble det ikke påvist dyrkbare *Legionella pneumophila* fra tappekraner (Colbourne et al., 1988), mens det derimot ble gjort funn av bakterien i grunnvann, overflatevann og vann i ledningsnett. Påvisningen ble gjort v.h.a. en indirekte metode basert på fluorescens (IFA=immuno fluorescence assay). I hovedledninger ble bakterien eksklusivt påvist i

biofilmer eller sedimenter. Ikke dyrkbare *L. pneumophila* påvist i drikkevann gjennom IFA gjenvant dyrkbarhet gjennom varmesjokk. Det stilles spørsmål ved om *L. pneumophila* i drikkevann er potent patogen, men det er en kjensgjerning at "virulensfaktoren" er isolert fra slike kilder.

Det er dokumentert at Mycobactier, *Mycobacterium kansaii* og *M. flavescens*, kan forurense drikkevann. Schulze-Röbbecke og Fischeder, (1989) demonstrerte at biofilmer som fikk utvikle seg fra forurenset drikkevann etter 10 måneder inneholdt henholdsvis $2 \cdot 10^5$ CFU / cm² og $7 \cdot 10^4$ CFU / cm². Undersøkelser viste også at 25 - 50% av biofilmen var såkalte syrefaste bakterier. Forfatterne trekker den slutning at biofilmer er nødvendige som habitat for utvikling av *Mycobacterium* spp og biofilmer kan også være en forklaring på at det har vist seg nesten umulig å kontrollere drikkevannets innhold av mycobactier v.h.a. konvensjonelle desinfeksjonsmetoder.

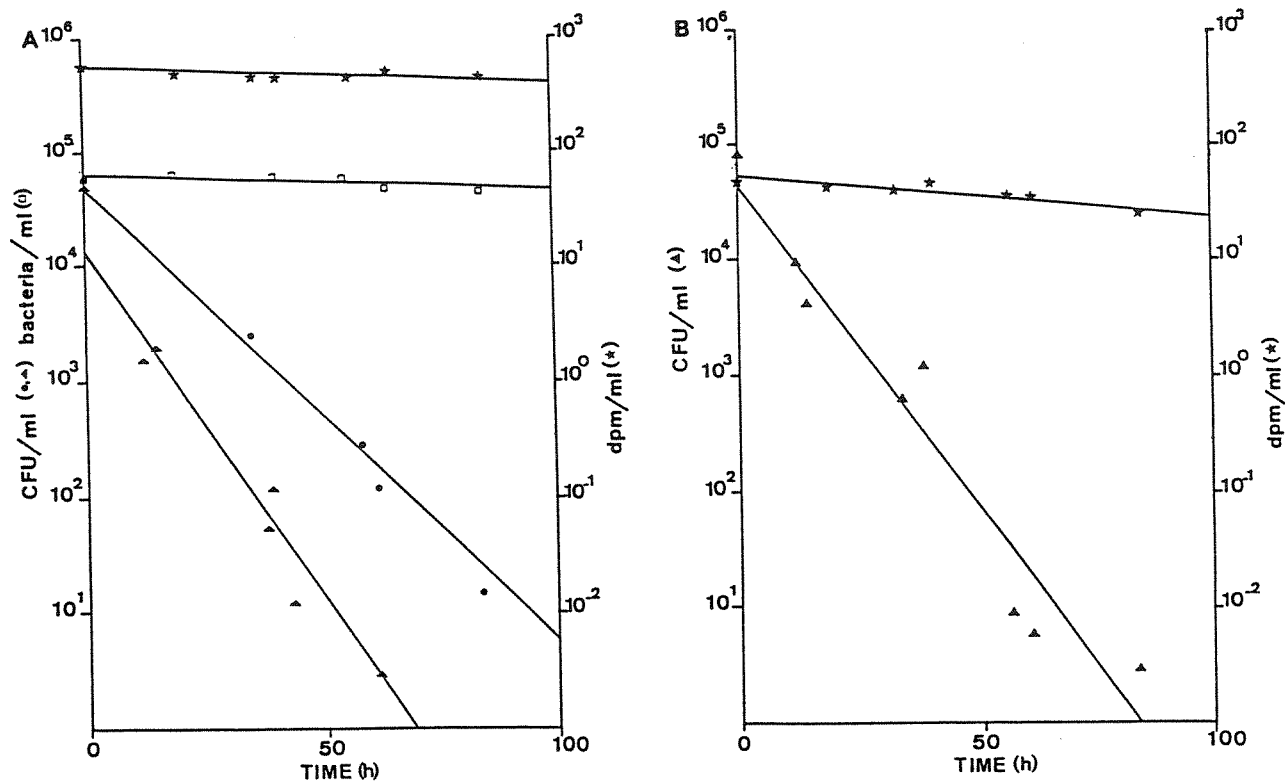
Positive funn av koliforme bakterier (eller andre patogene bakterier) i drikkevann er heldigvis ikke vanlig, og det finnes mange undersøkelser som ikke oppgir positive funn. Imidlertid må det presiseres at problemene med å påvise disse bakteriene kan ha sin årsak i at:

1. De er ujevnt fordelt i biofilmen og sitter ofte i helt adskilte områder av denne (tuberkler f.eks)
2. Påvisningsmetodene er mangelfulle

Vedrørende punkt 2 over kan det stilles store spørsmålstegn ved egnetheten av **oppdyrking** av heterotrofe bakterier som metode for å bestemme bakteriekonsentrasjonen i næringsfattige vannprøver (f.eks drikkevann og sjøvann).

Det er rapportert om store avvik mellom konsentrasjoner bestemt ved direkte mikroskopering, indirekte aktivitetsbestemmelser og tradisjonell oppdyrking på agarmedier (Roszak og Colwell, 1987).

Garcia-Lara viser dette missforholdet på en meget elegant og avslørende måte for patogene bakterier i sjøvann, gjennom å anvende ³H-merket thymidin og direkte mikroskoptelling av DAPI-fargede preparater som referansemetoder til oppdyrking på henholdsvis spesifikke og uspesifikke medier (Figur 12).



Figur 12. Tap av dyrkbarhet for *E.coli* på et spesifikt medium (\blacktriangle), et ikke spesifikt medium (\bullet), tap av talletall ved direkte mikroskopering (\square) og tap av radioaktivitet (\ast) i filtrert og autoklavert sjøvann (A) og i ubehandlet sjøvann (B) (Garcia-Lara et al., 1991) (dpm=disintegrations per minute).

Det må antas som sannsynlig at vannprøver alltid vil inneholde et større eller mindre antall bakterier som lever, men som ikke lar seg dyrke på konvensjonelle medier. Dette viser høyst sannsynlig at bakterier har overlevelsesmekanismer som selvsagt varierer med hensyn på stammer, miljøforhold og eksponeringstid under de rådende forhold.

2.11 Effekt av vannbehandling på begroingspotensialet

En rekke arbeider er publisert der begroingspotensialet er målt ulike steder i et vannbehandlingsanlegg, noe som selvsagt illustrerer effekten på begroingspotensialet av ulike enhetsprosesser for vannbehandling.

Effekten på begroingspotensialet av å ozonere vann er entydig, og ozonering øker dette potensialet betydelig (Bradford et al., 1994, Eaton, 1993, Huck et al., 1991, Jago and Sidorowicz, 1994, Janssens et al., 1985, van der Kooij et al., 1982, Tobiasson et al., 1993). Begroingspotensialet målt som AOC er rapportert å øke med 60-800 % som følge av ozonering, avhengig av vanntype og ozondosering. De største økningene i begroingspotensialet ble målt ved ozondoser over 8 mg O₃/l, noe som tilsvarte ozon/TOC-forhold på over 3 mg O₃/mg C. Ozonering øker begroingspotensialet både når det anvendes som forozonering og som mellomozonering etter koagulering og sedimentering, eller som sluttozonering (Easton, 1993).

Klorering kan gi økt begroingspotensial, og inntil 83 % økning i AOC er målt som følge av klorering (Easton, 1993, Kaplan et al., 1994). Det må imidlertid understrekes at de største økningene i

begroingspotensialet ble målt ved klordoser som ga fritt restklor på over 1 mg Cl₂/l, noe som innebærer mye høyere klordoser enn det som er vanlig i Norge. Ved doseringer på 1 mg Cl₂/l som avsluttende desinfeksjon ble det en økning i begroingspotensialet på 0-20 % avhengig av forutgående vannbehandling (Easton, 1993).

Koagulering, flokkulering og sedimentering er rapportert å redusere begroingspotensialet (målt som AOC) med inntil 85 % (Easton, 1993, Huck et al., 1991, Kaplan et al., 1994, Noble et al., 1996). De høyeste reduksjonene i AOC ble oppnådd ved doseringer av 120 mg FeCl₃/l (Noble et al., 1996). Dette er betydelig høyere enn det som er relevant for fjerning av naturlig organisk materiale (NOM) i Norge.

Membranfiltrering med en membran med midlere porestørrelse 1000 D (tilsvarende molvekt 1000) ga ingen endring i begroingspotensialet (AOC) (Noble et al., 1996).

Filtrering gjennom biologisk aktive GAC (granulært aktivt karbon) -filtre reduserer begroingspotensialet med inntil 80 % etter ozonering og hurtigsandfilter (Huck et al., 1994, Janssens et al., 1985). Bruk av GAC-filter etter forkloring, koagulering og sedimentering reduserte begroingspotensialet med 1/3 i forhold til om hurtigsandfilter ble benyttet (Easton, 1993). Ozonering etterfulgt av filtrering gjennom aktivt karbon kan gi både høyere og lavere AOC-verdier enn det en har i råvannet.

Langsomsandfilter reduserer begroingspotensialet (Easton, 1993). En reduksjon av AOC på 48 % ble målt i et vann som på forhånd hadde gjennomgått hurtigfiltrering.

3. Måling av begroingspotensiale

3.1 Bakgrunn

I Norge er organisk materiale i drikkevann av naturlig opprinnelse (naturlig organisk materiale - NOM), og utgjøres i stor grad av humussyrer og fulviksyrer. Humus- og fulviksyrer er relativt høymolekylære, med molvekt 500 til 2.000 for fulviksyrer og 1.000 til over 10.000 for humussyrer (målt med "Kratky small-angle X-ray scattering goniometer") (Thurman et al., 1982).

NOM i norsk drikkevann kan være en kilde for dannelse av uønskede biprodukter ved desinfeksjon, det kan gi vannet en uønsket farge, samt slamdannelse pga. utfelling og begroing (Ødegaard, 1988). I Norge fjernes NOM ved koagulering og direktefiltrering, membranfiltrering, ionebytting, samt ozonering og biologisk nedbrytning. Dette er prinsipielt forskjellige metoder for vannbehandling, og omfatter koagulering, fysisk separasjon, adsorpsjon, oksidasjon og biologisk omsetning. Hvilke deler av NOM som fjernes ved de ulike behandlingsprosessene vil avhenge av hvilke prinsipper som behandlingen bygger på. I utgangspunktet er det i Norge ønskelig å fjerne den delen av NOM som bidrar til fargen, dvs. den høymolekylære fraksjonen av NOM, men de ulike behandlingsmetodene vil i varierende grad også fjerne den lavmolekylære fraksjonen som er lettere tilgjengelig for biologisk omsetning enn humusmolekylene.

Den metoden for fjerning av NOM som er dominerende ved store og middels store vannverk i Norge er koagulering og direktefiltrering. Ved koagulering destabiliseres kolloider og makromolekyler, fortrinnsvis ved hjelp av tilsetning av et metallsalt. Disse aggregatene blir så gjort større og separerbare gjennom flokkulering, før de separeres fra vannet i et filter. Koagulering og direktefiltrering har vist seg å være en effektiv metode for å fjerne farge forårsaket av NOM. Det vil imidlertid være en rest av NOM målt som TOC.

Dersom en vesentlig andel av NOM fjernes ved koagulering og direktefiltrering vil en forvente at begroingspotensialet reduseres. Resultater fra pilotforsøk med koagulering og direktefiltrering av Oslos råvann viste at mens fargetallet ble redusert fra 12 mg Pt/l til 3 mg Pt/l, og TOC ble redusert fra 3 mg C/l til 2-2,2 mg C/l, var det ingen reduksjon i begroingspotensialet (målt som bionedbrytbart organisk karbon - BDOC) (Hem et al., 1996). Dette viser at den andelen av NOM som bidrar til begroingspotensialet ikke ble fjernet ved denne vannbehandlingen, noe som kan få betydning ved valg av renseprosesser for fjerning av NOM. De målingene som ble gjennomført i forbindelse med idékonkurransen for Oset utgjør imidlertid et for dårlig grunnlag for å trekke konklusjoner om hvilke molvektfraksjoner i NOM som er av størst betydning for begroingspotensialet. Det er derfor gjennomført målinger av begroingspotensialet i ulike molvektfraksjoner i vannprøver tatt ulike steder i Aurevannsvassdraget i Bærum. De ulike vannprøvene representerer NOM med forskjellig alder, med forskjellig farge og med forskjellig innhold av TOC.

Det er i tillegg målt begroingspotensiale i ozonert og klorert Aurevann, henholdsvis rett etter vannbehandling og på en endeledning, som et eksempel på effekter av vannbehandling og av biologisk omsetning i ledningsnett.

3.2 Metodebeskrivelse

3.2.1 Måling av assimilerbart organisk karbon

Metode for bestemmelse av AOC i drikkevann

Internasjonalt er det allerede gjennomført et betydelig arbeide som kan danne grunnlag for å utvikle en standardisert metode for bestemmelse av AOC (assimilerbart organisk karbon). Flere forskere har i sitt arbeide kommet frem til at det ikke er lett å standardisere en metode, fordi mikroorganismenes vekstfysiologi er såvidt forskjellige under oligotrofe vekstbetingelser. Det er pekt på at én art sannsynligvis ikke er tilstrekkelig universell for bruk i en slik testmetode. Anvendelse av 2 - 3 ulike stammer kan være en alternativ hvis gode alternativer blir funnet (Frias et al., 1994).

AOC kan måles etter i hovedsak tre forskjellige prinsipper:

Registrering av bakterieinnhold med sprede-plateteknikk (colony formation units - CFU) er den enkleste metoden som krever lite avansert utstyr, men analyttisk erfaring. Bakterietilveksten kan også følges med farging av bakteriene og telling med EPI-fluorescens. Erfaringer som er rapportert viser at telling ved hjelp av mikroskop (EPI-fluorescenseteknikk) neppe er arbeidsbesparende sammenlignet med sprede-plateteknikk.

En utviklet målemetode med bruk av adenosin trifosfat - luciferin/luciferase (ATP) for bestemmelse av vekstresponsen har vist seg å være godt egnet. Water Research center i England har utarbeidet en foreløpig standard metode for AOC basert på ATP-måling. Det er gjort undersøkelser som viser at det er meget god korrelasjon mellom ATP og CFU (LeChevallier et al., 1993).

En tredje teknikk for å registrere bakterievekst er måling av turbiditet med et spesial designet instrument som er patentert (Hamsch and Werner, 1993).

AOC metoden er kun i liten grad tatt i bruk for registrering av tilvekst og dannelse av slam i drikkevann her til lands. Nyere kjennskap og erkjennelse om årsaksforhold som påvirker vannkvaliteten, både i råvannskilden og endring under transport i distribusjonssystemet, har økt behovet for analyser som kan beskrive effekter av vannkvalitet. De internasjonale krav til drikkevann, og de nye forskrifter for drikkevann som er samordnet med EU-direktivet (SHD, 1995), gjør at AOC-metoden sannsynligvis vil bli et interessant verktøy og tatt i bruk ved vurdering av norske vannverk.

Det internasjonale arbeidet som er utført ved anvendelse av AOC metoden er lagt til grunn for bruk av en slik metode i Norge. Det metodeopplegget som er brukt bygger på arbeidet til van der Kooij (1978) og de forbedringer som er gjort senere av LeChevallier et al. (1993) og Kaplan et al. (1993) for å utvikle en raskere (arbeidsbesparende) metode.

Inokulum

For å kunne komme fram til en internasjonal standardisert metode er det nødvendig å anvende definerte bakteriestammer. Flere bakterieslekter er beskrevet som representanter for indirekte årsak til tilvekst og funnet i drikkevann (Frias et al., 1994), men er det spesielt to stammer som er mest anvendt og som er tilnærmet standardiserte i denne sammenheng.

Disse bakteriestammene er:

Renkulturer av; *Pseudomonas fluorescens* (P17) (ATCC 49642), og *Spirillum* (NOX) (ATCC 49643)

Aquateam AS har disse bakteriestammene. NIVA har dyrket disse og foretatt overføring til lagringsmedium for oppbevaring (på keramikkuler) ved - 80 °C. i dypfryser. Anrikningsmedium er beskrevet nedenfor.

Anrikning av *Pseudomonas fluorescens* (P17) til Inokulum

Bakterie-stammene anrikes på et flytende medium laget av ultrarent vann (ELGA) lagret ved 20 °C i minst 7 døgn, tilsatt mineral buffer-løsning og sporstoff-løsning. Som karbonkilde tilsettes 2,535 mg Natriumacetat/l ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 500 µg/l acetat-C). Denne anriknings-løsning inkuberes ved 20 °C i 5-7 døgn før bakteriene kan anvendes i reell test.

Anrikningskulturen bør ha relativ stabil tetthet (CFU) under lagring ved 2-5 °C og bør kunne benyttes over 4-5 uker. Bakterietettheten skal sjekkes ofte før bruk når den har vært lagret over 30 døgn.

Glassutstyr:

Pyrex glassvare (flasker) med teflon innlegg i skrukorkene benyttes for dette bruksområdet. Alle testflaskene skal rengjøres ved vanlig laboratorievaske. Deretter skal de fylles med 0,1 N HCl vann (laget av ELGA-vann) og stå til neste dag før de til slutt skylles med destillert vann. Flaskeåpningen dekkes med Al-folie før en avsluttende varmebehandling ved 550-600 °C i 6 timer. Denne rengjøringsprosessen synes nødvendig for å sikre at all organisk stoff er fjernet før flaskene anvendes. Rene flasker til dette formål er nå også kommersielt tilgjengelig.

Prøvetakingsflasker:
0,5-1,0 l Pyrex glassflasker

Inkubering av testporsjonene:
100 ml pyrex flasker med teflon skrukork, eller kommersielt tilgjengelig "vials" av borosilikatglass, preparert for dette formål. 150 ml Erlenmeyer flasker med aluminium-caps kan også benyttes.

Målesylindere 100 - 1000 ml

Petrisåler:
Standard 90 mm plast petrisåler

Pipetter:
Engangspipetter av glass.
Pipette-tips av polyetylen (sterile med filter).

Filtreringsutstyr:

Undersøkelser med forskjellige typer filtermateriale har vist at glassfiberfilter er best egnet hvis testvannet inneholder så mye partikler at det bør filtreres. Det skal brukes trykkfiltrering ved bruk av vanlige sprøyter (50 mL) med filterholder for Whatman GF/C glassfiber filter. Filtrene skal først gjennomskylles med ELGA-vann og tørkes i varmeskap, før de settes i glødeovn ved 500-550 °C i en halv time.

Selve filterholderen skal rengjøres og skylles som beskrevet under vask av flasker. Deretter tørkes de ved 60-70 °C i varmeskap. De bør pakkes i Al-folie, eller legges i en egnet beholder med lokk for unngå hudkontakt eller støv før de anvendes.

Filtrering med sugeflaske anbefales ikke fordi forsøk som er gjort viser at bakgrunnverdier blir vesentlig høyere enn ved bruk av sprøyter.

Saltløsninger:

Mineral buffer-løsning:

Mineral buffer-løsning har følgende sammensetning:

| | | |
|-----------------------|--------|----------------|
| K_2HPO_4 | 7,0 | |
| KH_2PO_4 | 3,0 | |
| $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0,1 | |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1,0 | |
| NaCl | 0,1 | |
| $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0,0018 | |
| $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ | 0,1 | (eget forslag) |

Alle mengder er i milligram per liter.(LeChevallier et al., 1993).

Fosfat-kjemikaliene prepareres i 100 ml (tilsetning 1 ml/l til sluttkonsentrasjon)

Jern-løsningen prepareres separat og tilsatt 1 ml 1 M HCl (for å hindre utfelling), men de øvrige kjemikalier prepareres i en felles løsning. Alle, unntatt Fe-løsningen autoklaveres.

Sporstoff-løsningen:

Sporstoff-løsningen som ble bør benyttet har følgende sammensetning (Strotmann et al., 1995):

| | |
|-------|-------------------------|
| 50 mg | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ |
| 20 mg | $MnSO_4 \cdot H_2O$ |
| 50 mg | H_3BO_3 |
| 50 mg | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ |
| 10 mg | $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ |
| 15 mg | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ |
| 10 mg | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ |
| 10 mg | $NaWO_4 \cdot 2H_2O$ |

Sporstoff-løsningen må ikke autoklaveres pga. faren for utfelling.

Stamløsninger av Natriumacetat

Referanseløsningen lages av destillert vann, og tilsettes mineral- og sporstoffløsning for å unngå næringssaltbegrensning. Tilsett 1 ml/l.

Vei ut 28,35 mg (helst på mikro-analysevekt) til 100 ml destillert vann i en målekolbe. Denne stamløsning anvendes til preparering av kontrolløsning i selve AOC-analysen (og til hemningskontrollen dersom denne utføres).

Stamløsningen må lages ny hver gang, og umiddelbart før bruk.

Anrikningskultur

Bakterie-stammene anrikes på et flytende medium av destillert vann (som har vært lagret ved 20 °C i minst 3-4 døgn), tilsatt mineral buffer-og sporstoffløsning og 2,835 mg Natriumacetat/l ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 500 µg/l acetat-C). Inokulert løsning inkuberes ved 20 °C i 7 døgn.

(Det lages en stockløsning av natriumacetat som inneholder 2835 mg/l i karbonfritt (ultrarent) vann. 1 ml stockløsning benyttes pr. liter.)

Bakterieinnholdet er vanligvis relativt stabilt over en lengre periode. Innholdet av bakterier bestemmes ved telling og passende mengde tilsettes de individuelle testflasker.

Bacto R₂A-agar er et lav næringsmedium for bruk til kultivering og bestemmelse av antall bakterier i drikkevann, som er kommersielt tilgjengelig som dehydrert medium. Dette mediet benyttes i spredeplatteteknikk for å registrere tilvekst av bakterier under tilvekstfasen.

Petri-skåler med R₂A-agar tilberedes etter standard-prosedyre (NS-4790-5) tørkes og lagres i tette plastposer ved 2-5 °C. Holdbarhet: 2 måneder fra prepareringsdato.

Oppsetting av testprøve

For hver testprøve skal det anvendes 24 flasker som varmebehandles for å inaktivere vegetative mikroorganismer. Hver flaske tilsettes inokulum tilsvarende 50-500 CFU/ml.

Når bakterietilveksten er kommet over i stasjonær fase, etter 5, 7 og 9 døgn inkubasjon, analyseres innholdet av bakterier i 8 flasker hver gang. Det er kun tillatt med et prøveuttak fra hver flaske for å unngå kontaminering. Fra hver flaske foretas en enkel fortynningsrekke (10^n) slik at antallet kolonier er i omtådet 3-300 CFU/petriskål. Det foretas bare en utsåing til petriskål fra hvert fortytningstrinn. (Når tilveksten er mindre enn 50 % fra en analysedag til neste bedømmes den til å være i stasjonær fase).

Preparering av testprøve:

Hvis det er ønskelig å fjerne partikler i testvannet kan dette gjøres ved filtrering. Bruk glassfiberfilter (Whatman GF/C) 24 mm som passer i filterholdere for gjenbruk og som kan settes på 50 ml sprøyter. Fordel testvannet i 50 ml porsjoner i 100 ml flasker (eller 150 ml Erlenmeyer flasker) ved hjelp av en 50 ml målesylinder. Dette arbeidet utføres aseptisk.

Tilstedeværende bakterier i testvannet inaktiveres ved varmebehandling ved 70 °C i 30 min.

Det bør benyttes et vannbad hvor temperaturen kan kontrolleres med en nøyaktighet på ± 1 °C.

Kvalitetskontroll:

Kvalitetskontroll av testvannet utføres ved å tilsette 50 µg acetat-C og 1 mL av mineral buffer-løsning/l. Minimum 5 flasker går med til denne kontrollen. Kontrolltesten vil også gi informasjon om det finnes veksthemmende stoffer i testvannet. 2 flasker analyseres etter 5 døgn og de 3 øvrige etter 9 døgn inkubasjon.

Blank-kontroll:

Som blank-kontroller benyttes bare mineral buffer løsning, uten acetat-karbon tilsetning. Vekst i denne vil avsløre om det er karbon-kontaminering av glassutstyret. Det prepareres 3 flasker som analyseres samtidig ved 7 eller 9 døgn.

Inokulering av testporsjonene:

Hvis testvannet har vært oppbevart ved lav temperatur skal vannet tempereres til inkubasjonstemperatur før inokulering. Vekstforsøket startes ved inokulering med 0,1-1 ml inokulumsuspensjon slik at det er 50-500 cfu/ml i testmediet ved start. Flaskene settes på en sirkulærroterende rystemaskin ved 20 ± 1 °C. Prøveuttak til spredeplate-analyser foretas minst 3 ganger i overgangen til og i stagnasjonærvekstfase, fortrinnsvis etter 5, 7 og 9 døgn.

Prøvevolum og fortykning:

Det forventes bakterietall på opptil 10^6 - 10^7 /ml, slik at fortykning i spesial bufferløsning (destillert vann tilsatt mineral buffer-løsning, uten sporelementer) er nødvendig før utsåing på agar-platene. Standard volum ved utsåing er 0,1 ml, men opptil 0,5 ml kan være aktuelt.

Inkubasjon og telling av kolonier:

Agar-platene inkuberes ved 20 ± 1 °C i inntil 2-5 døgn (maksimalt antall kolonier). Koloniene telles under lupemikroskop ved maksimal forstørrelse 10 x.

Deteksjonsgrense og nøyaktighet

Jago (1992) oppgir deteksjonsgrensen til 20 µg C/l, og nøyaktigheten til ± 20 % for AOC-bestemmelse ved måling av ATP. Den samme nøyaktigheten vil bli brukt i vurderingen av resultatene, selv om det her er benyttet telling av kolonier for bestemmelse av AOC. Som det vil fremgå av kapittel 3.4.1 og 3.4.2 er denne nøyaktigheten noenlunde i overensstemmelse med de standardavvikene mellom ulike paralleller som fremkommer innen hver måling.

3.2.2 Molvektsfraksjonering av naturlig organisk materiale i vann

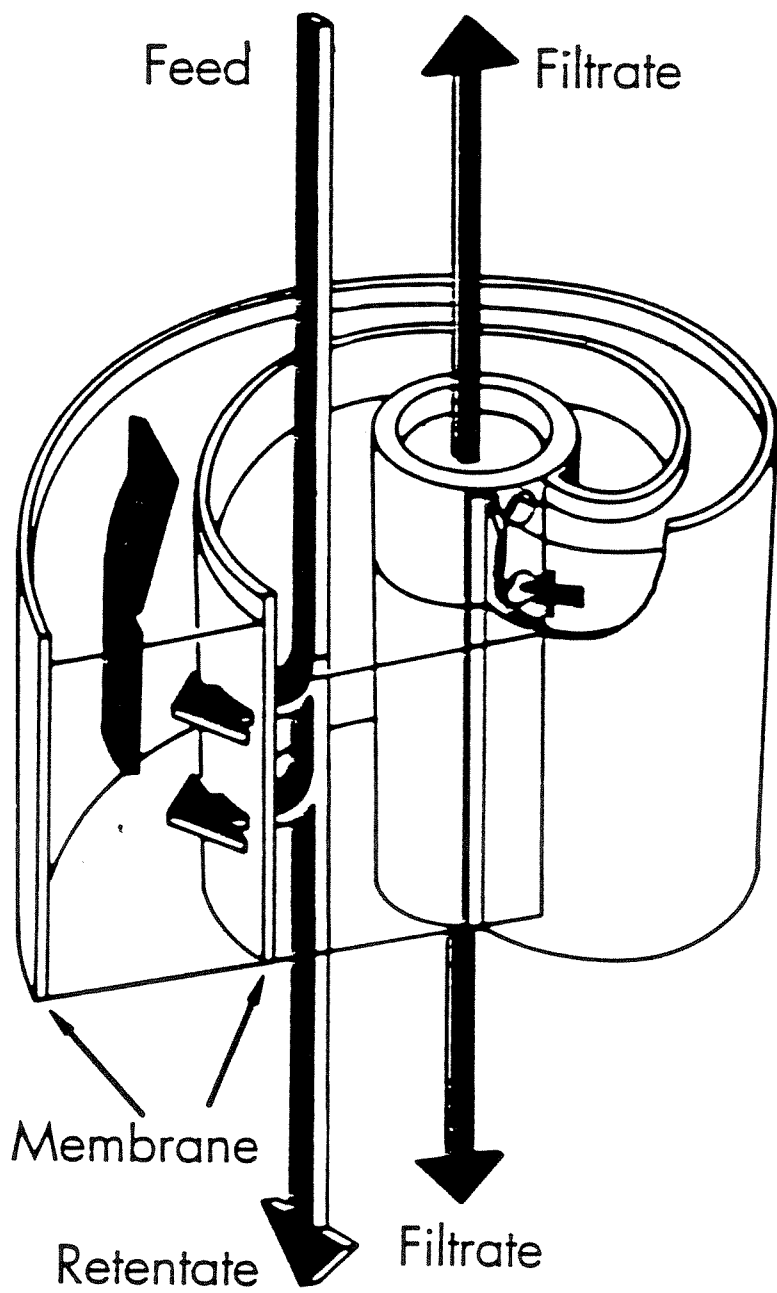
Det er to metoder som er vanlige for karakterisering av molvektsfordelingen for naturlig organisk materiale i vann:

- Gelfiltrering (kromatografi)
- Ultrafiltrering (membranfiltrering)

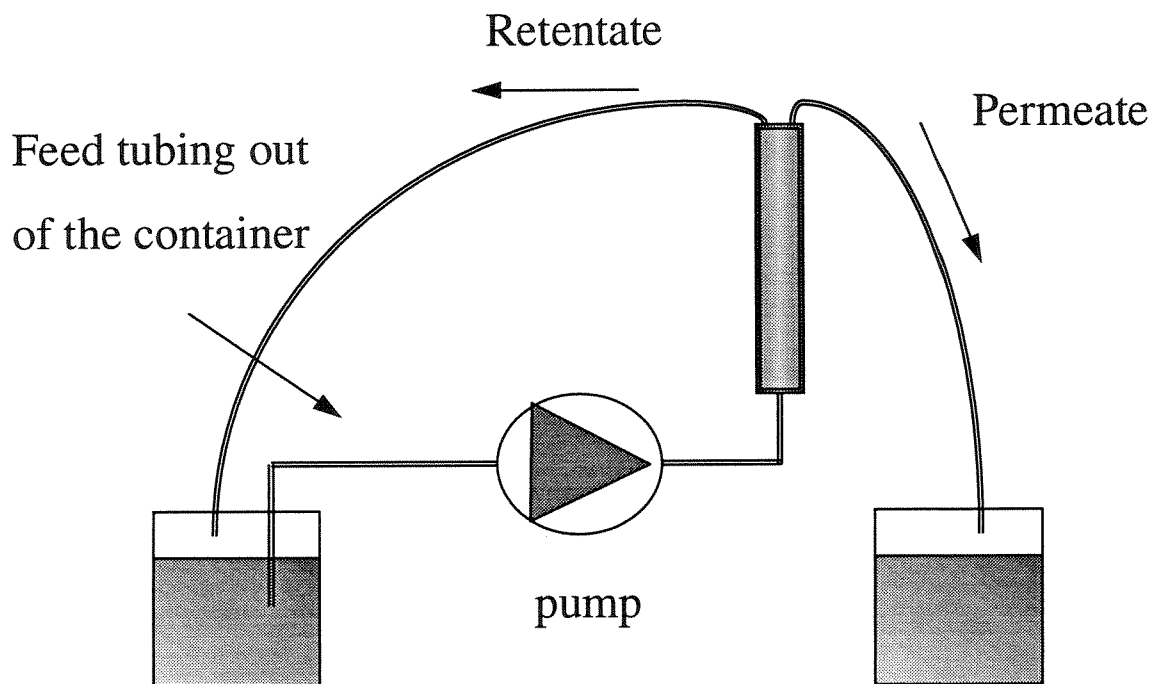
Begge metodene har bestemte fordeler og ulemper. Størrelsesfordelingene etter ultrafiltrering kan avvike fra fordelingene etter gelfiltrering på samme prøve (Amy et al., 1987, Grady, 1984).

Ultrafiltrering har den vesentlige fordel fremfor gelfiltrering at ved ultrafiltrering kan store volumer fraksjoneres og lagres for videre karakterisering. Dette var hovedgrunnen til at ultrafiltrering ble benyttet for fraksjonering i dette prosjektet, da det er behov for ca. 1,5 l av hver fraksjon for bestemmelse av begroingspotensialet som AOC.

Det ble benyttet spiraloppbygde membranmoduler av merket Millipore. Membranarealet var 0,56 m² (6 ft²). Membranmateriale var polyetersulfonat. Nominell molvekt-cut-off (MW cut-off) var oppgitt av leverandøren til henholdvis 1.000 og 10.000. Vannet som skal filtreres tilføres i den ene enden av modulen, og strømmer parallelt med membranen. Konsentratet kommer ut i motsatt ende av der løsningen tilføres. Permeatet (filtratet) strømmer gjennom membranen og videre inn til senter (aksen) av modulen, hvorfra det strømmer ut av modulen (se Figur 13). Oppsett for ultrafiltrering er vist i Figur 14.



Figur 13: Prinsipiell oppbygging av membranmodul for ultrafiltrering (Millipore, 1992).



Figur 14: Laboratorioppsett for ultrafiltrering (Hiller, 1997).

Filtreringen ble foretatt som angitt i Logan and Jiang (1990). All ultrafiltrering ble foretatt ved romtemperatur (ca. 20 °C). Prøver på 6-10 l ble filtrert ved en belastning mindre enn 1 l/min. Hydraulisk fluks på membranen var 30 l/m²*h. Konsentratet ble resirkulert inntil 80 % av prøven var filtrert (gjenvunnet). Hele filtratet ble samlet opp og blandet til én prøve. Logan and Jiang (1990) anbefaler at en ikke overstiger en gjenvinningsgrad på 90 %.

Transport av organisk materiale gjennom membranen vil avhenge av en rekke ulike forhold. Blandt disse er tilbakeholdelse av deler av det organiske materialet med molvekt mindre enn nominell MW cut-off for membranen, et fenomen som kan gi for lave verdier i NOM-konsentrasjonen i filtratet etter ultrafiltrering. Når en foretar en fraksjonering ved å filtrere gjennom membraner med forskjellig MW-cut-off vil denne feilen føre til at målt organisk stoff består av gjennomgående større molekyler enn det som faktisk er tilfelle i vannprøven I dette konkrete tilfellet vil feilen føre til at andelen av NOM i fraksjonen med molvekt over 10.000 blir for stor, og tilsvarende vil andelen av NOM med molvekt under 1000 bli målt for lavt. Logan and Jiang (1990) har foreslått en beregningsmetode for å kompensere for denne feilen, men metoden ga tvilsomme resultater for TOC. For AOC ble resultatene umulige dersom korreksjonsfaktoren for TOC ble anvendt. (Korreksjonen på den minste fraksjonen (< 1.000) ble så stor at AOC-verdien for denne fraksjonen ble større enn for ufiltrert prøve.) Resultatene fra AOC- og TOC-målingene etter fraksjonering ble derfor benyttet uten noen kompensasjon for tilbakeholdelse av molekyler med molvekt mindre enn MW-cut-off.

3.3 Beskrivelse av prøvestedene

Vannprøvene er tatt ved Aurevann, Trehjørningen og Hellerudmyra i Bærumsmarka høsten 1996. Både Hellerudmyra og Trehjørningen dreneres til Aurevann.

Ved Aurevann er prøvene tatt der en tar råvannsprøver inne på vannbehandlingsanlegget. Råvannsinntaket ligger på 15 m dyp. Ved Trehjørningen ble det tatt overflatevann ved dammen. Ved Hellerudmyra ble prøven tatt i et prøvetakingspunkt som ble etablert i 1962, og som består av en liten vanddam med utløpsrør.

Det er i tillegg tatt prøver to steder på ledningsnettet som forsynes med vann fra Aurevann, det ene rett etter vannbehandlingsanlegget og det andre på en endeledning (Fossum).

En beskrivelse av prøvepunktene og vannkvaliteten er gitt i Tabell 4.

Tabell 4: Prøvepunktene og vannkvalitet pr. mai 1996 (Gjessing, 1996).

| | Aurevann | Trehjørningen | Hellerudmyra |
|----------------------------------|----------|---------------|--------------|
| Høyde over havet (m) | 150 | 250 | 300 |
| Dybde på prøvetakingspunkt (m) | 15 | 0 | 0 |
| Teoretisk oppholdstid (måneder) | 9 | 4 | tilnærmet 0 |
| pH | 6,8 | 6,6 | 4,4 |
| Ledningsevne (mS/m) | 2,6 | 2,8 | 3,3 |
| UV-abs. (254 nm, 1 cm kyvette) | 0,22 | 0,20 | 0,80 |
| Farge (mg Pt/l) | 36 | 33 | 166 |
| DOC (mg C/l) | 6,0 | 5,9 | 19,5 |
| Klorid (mg Cl/l) | 1,3 | 1,4 | 1,0 |
| Sulfat (mg SO ₄ /l) | 3,4 | 3,8 | 3,4 |
| Silikat (mg SiO ₂ /l) | 2,9 | 3,1 | 2,9 |
| Nitrat (µg NO ₃ -N/l) | 105 | 160 | 8 |
| Totalt Nitrogen (µg N/l) | 270 | 320 | 320 |
| Kalsium (mg Ca/l) | 3,0 | 2,9 | 1,2 |
| Magnesium (mg Mg/l) | 0,4 | 0,4 | 0,3 |
| Natrium (mg Na/l) | 1,2 | 1,3 | 1,4 |
| Kalium (mg K/l) | 0,3 | 0,3 | 0,1 |
| Jern (µg Fe/l) | 45 | 35 | 385 |
| Mangan (µg Mn/l) | 41 | 39 | 16 |
| Kobber (µg Cu/l) | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Totalt aluminium (µg Al/l) | 140 | 170 | 520 |
| Reaktivt aluminium (µg Al/l) | 70 | 90 | 270 |

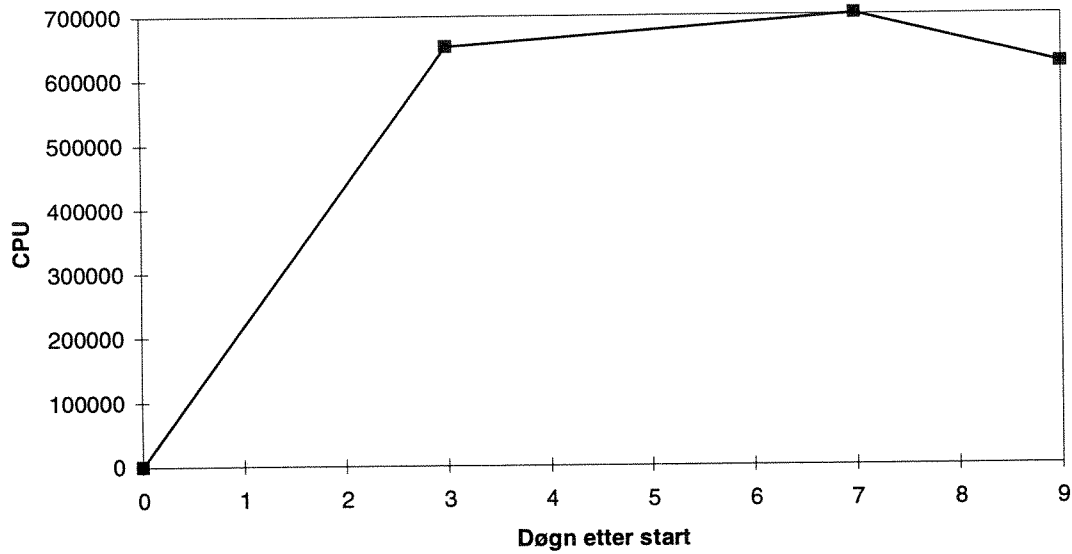
Vannets fargetall og innholdet av organisk karbon vil kunne variere over året, og de verdiene som er gitt i Tabell 4 gjelder for mai 1996.

3.4 Resultater og diskusjon

3.4.1 Generelt

Resultatene fra AOC-målingene fremkommer ved å sammenligne maksimalt antall koloniformere (CPU) (se Figur 15) med en standard med acetat som karbonkilde. Maksimalt antall koloniformere er en

middelverdi av 8 parallelle målinger av kimtall (8 parallelle flasker). Standardavviket for maksimalt antall koloniformere var med få unntak mindre enn 20 % av middelverdien (se Tabell 5, kapittel 3.4.2).



Figur 15: Eksempel på økning i CPU etter inkubering med P17 i råvannsprøve fra Hellerudmyra.

Som Figur 15 viser er maksimal CPU-verdi etter 7 dager, mens verdiene etter 3 og 9 dager var tett opptil maksimalverdien. Dette var et typisk forløp for AOC-testene for råvann fra Hellerudmyra, Aurevann og Trehjørningen.

3.4.2 Resultater

Resultater fra måling av begroingspotensialet samt data for farge og totalt organisk karbon er gitt i Tabell 5.

Tabell 5: Resultater fra analyse av farge, organisk karbon (TOC) og assimilerbart organisk karbon (AOC). (Ved AOC-analysene ble det bare inkubert med P17 såfremt det ikke er angitt noe annet. Det oppgitte standardavviket gjelder for én prøve, i og med at det pr. prøve og dag ble tatt 8 paralleller.)

| | Farge (mg Pt/l) | TOC (mg C/l) | AOC ($\mu\text{g C/l}$) \pm standardavvik |
|--|-----------------|--------------|--|
| Aurevann, råvann ⁴⁾ | 34 | 6,0 | 45 \pm 14 |
| Aurevann, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 10.000 | 6 | 4,4 | 36 \pm 5 |
| Aurevann, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 1000 | 3 | 2,3 | 32 \pm 8 |
| Aurevann, behandlet ¹⁾ (Jordbærhaugen) | 13 | 5,2 | 112 \pm 18 |
| Aurevann, behandlet ¹⁾ , endeledning (Fossum) | 17 | 4,1 | 44 \pm 12 |
| Aurevann, behandlet ²⁾ (Jordbærhaugen) | | | 55 \pm 15 (96 \pm 19 ³⁾) |
| Trehjørningen, råvann | 45 | 6,5 | 33 \pm 4 |
| Trehjørningen, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 10.000 | 10 | 3,4 | 30 \pm 8 |
| Trehjørningen, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 1.000 | 2 | 1,4 | 18 \pm 3 |
| Hellerudmyra, råvann | 171 | 19,6 | 70 \pm 14 |
| Hellerudmyra, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 10.000 | 32 | 7,7 | 49 \pm 7 |
| Hellerudmyra, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 1.000 | 13 | 3,1 | 36 \pm 7 |

1) Mikrosiling etterfulgt av dosering av ozon, kalk og kloramin (Hval, 1993).

2) Mikrosiling etterfulgt av dosering av kalk og kloramin.

3) Inkubert med både P17 og NOX.

4) Middell av 2 serier

I forbindelse med membranfiltreringen tilbakeholdes i noen grad molekyler som er mindre enn det MW cut-off for membranen skulle tilsi (se kapittel 3.2.2). Logan and Jiang (1990) har foreslått en metode for å korrigere DOC-verdiene, men denne kunne som før nevnt ikke benyttes i dette tilfellet. Alle molveksfraksjoner refererer derfor til fraksjoneringsmetodikken beskrevet i Logan og Jiang (1990), men uten korreksjon for tilbakeholdelse av molekyler med MW mindre enn MW cut-off.

AOC-analysene på klorert Aurevann viser at verdiene blir ca. 75 % høyere når en inkuberer med både P17 og NOX i forhold til når en inkuberer med bare P17. Dette viser at en bør inkubere med både P17 og NOX for å få omsatt alle lett nedbrytbare organiske forbindelser. Dette gjelder spesielt når vannet har gjennomgått en behandling som inkluderer et oksidasjonstrinn (Tobiasson et al., 1993).

De innbyrdes forholdene mellom farge, TOC og AOC er gitt i Tabell 6.

Tabell 6: Forholdet mellom farge og TOC og mellom AOC og TOC.

| | Farge/TOC (mg Pt/mg C) | AOC/TOC (µg C/mg C) |
|--|---------------------------|------------------------|
| Aurevann, råvann | 5,7 | 8 |
| Aurevann, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 10.000 | 1,4 | 8 |
| Aurevann, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 1.000 | 1,3 | 14 |
| Aurevann, behandlet ¹⁾ (Jordbærhaugen) | 2,5 | 22 |
| Aurevann, behandlet ¹⁾ endeledning (Fossum) | 4,1 | 11 |
| Trehjørningen, råvann | 6,9 | 5 |
| Trehjørningen, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 10.000 | 2,9 | 9 |
| Trehjørningen, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 1.000 | 1,4 | 13 |
| Hellerudmyra, råvann | 8,7 | 4 |
| Hellerudmyra, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 10.000 | 4,2 | 6 |
| Hellerudmyra, råvann, membranfiltrert med MW cut-off 1.000 | 4,2 | 12 |

1) Mikrosiling etterfulgt av dosering av ozon, kalk og kloramin (Hval, 1993).

Resultatene presentert i Tabell 5 og Tabell 6 viser at fargen først og fremst skyldes den molvektfraksjonen med MW over 10.000. Begroingspotensialet, målt som AOC, er derimot i stor grad knyttet til molvektfraksjonen med MW mindre enn 1.000.

3.4.3 Effekt av biologisk omsetning på ledningsnett

Den eksisterende vannbehandlingen ved Aurevann har eksistert siden 1963, og har medført en sterk begroing og slamdannelse i ledningsnett (Hval, 1993). At en får en økning i begroingspotensialet ved ozonering er forøvrig dokumentert ved en rekke forsøk (se kapittel 2.11).

Måling av begroingspotensialet i prøver tatt rett etter vannbehandlingen og i en endeledning bekrefter at det foregår en omfattende biologisk omsetning på ledningsnett i de delene av Bærum som forsynes fra Aurevann. Begroingspotensialet målt som AOC reduseres fra 112 mg C/l til 44 mg C/l mens vannet transporteres gjennom ledningsnett.

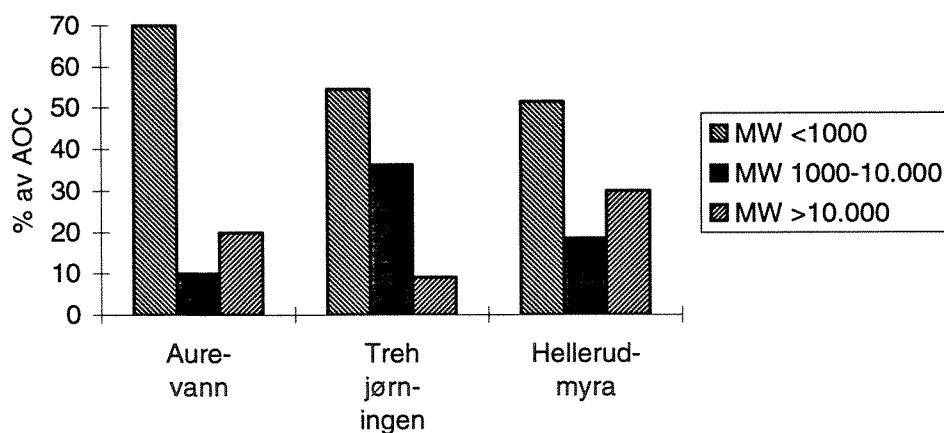
Dette er reduksjoner som er i overensstemmelse med det som ble funnet av Gibbs and Hayes (1993), der utgangspunktet var et eutroft råvann som hadde gjennomgått koagulering, filtrering gjennom aktivt karbon og klorering. AOC-verdiene var 180 µg C/l i råvannet og 190 µg C/l etter vannbehandlingen, mens verdiene på ledningsnett var varierte fra 73 til 120 µg C/l. De laveste AOC-verdiene ble målt i endeledninger. Kaplan et al. (1994) fant til sammenligning ingen endring i begroingspotensialet på ledningsnett når vannbehandlingen omfattet bl.a. koagulering, sedimentering, filtrering og klorering, men ikke ozonering (AOC etter behandling var ca. 80-190 µg C/l på de fire undersøkte vannverkene).

3.4.4 Begroingspotensialet som funksjon av molekylstørrelse

Innholdet av TOC og AOC i de ulike molvektfraksjonene er angitt i Tabell 7, og fordelingen av AOC på de ulike molvektfraksjonene er illustrert i Figur 16.

Tabell 7: Innholdet av TOC og AOC i molvektfraksjoner av NOM.

| | Aurevann | | | Trehjørningen | | | Hellerudmyra | | |
|----------------------------------|----------|------|-----|---------------|------|-----|--------------|------|------|
| MW (i 1000) | <1 | 1-10 | >10 | <1 | 1-10 | >10 | <1 | 1-10 | >10 |
| TOC (mg C/l) | 2,3 | 2,1 | 1,6 | 1,4 | 2,0 | 3,1 | 3,1 | 4,6 | 11,9 |
| AOC ($\mu\text{g C/l}$) | 32 | 4 | 9 | 18 | 12 | 3 | 36 | 13 | 21 |
| AOC/TOC ($\mu\text{g C/mg C}$) | 14 | 2 | 6 | 13 | 6 | 1 | 12 | 3 | 2 |



Figur 16: Prosentvis fordeling av begroingspotensialet på ulike molvektfraksjoner.

Den dominerende delen av begroingspotensialet finnes i den minste molvektfraksjonen, som inneholder 50-70 % av målt AOC. Dersom en ser på forholdet mellom AOC og TOC får en et mål på hvor stor andel av det organiske karbonet som er biologisk omsettbar, og som det fremgår av Tabell 7 er denne andelen vesentlig høyere i molvektfraksjonen med MW cut-off mindre enn 1000 enn i fraksjonene med høyere molvekt.

Når resultatene i Tabell 7 skal vurderes må en ta hensyn til presisjonen på AOC-analysen ($\pm 20\%$) (se kapittel 3.2.1), samt at for fraksjonene med molvekt 1000-10.000 og over 10.000 er AOC-verdiene fremkommet ved subtraksjon av AOC-verdier for total prøve og prøver molvektfraksjonert ved MW cut-off 1000 og 10.000. Dette innebærer at presisjonen på disse AOC-verdiene er $\pm 20\%$ av opprinnelig AOC-måling, hvilket vil si ca. $\pm 6-14 \mu\text{g AOC/l}$, slik at årsaken til de store variasjonene i AOC/TOC-forholdet i de molvektfraksjonene med molvekt over 1000 meget vel kan tilskrives nøyaktigheten i analysene. I Tabell 8 er det kun delt mellom NOM med molvekt over og under 1000.

Tabell 8: Innholdet av TOC og AOC i NOM med molvekt over og under 1000.

| | Aurevann | | Trehjørningen | | Hellerudmyra | |
|----------------------------------|----------|-----|---------------|-----|--------------|------|
| | <1 | >1 | <1 | >1 | <1 | >1 |
| MW (i 1000) | <1 | >1 | <1 | >1 | <1 | >1 |
| TOC (mg C/l) | 2,3 | 3,7 | 1,4 | 5,1 | 3,1 | 16,5 |
| AOC ($\mu\text{g C/l}$) | 32 | 13 | 18 | 15 | 36 | 34 |
| AOC/TOC ($\mu\text{g C/mg C}$) | 14 | 3,5 | 13 | 2,9 | 12 | 2,1 |

Når en kun deler NOM inn i fraksjoner med molvekt over og under 1000 reduseres støy pga. nøyaktigheten til AOC-målingene. Forholdet mellom AOC og TOC i fraksjonen med molvekt over 1000 er 2-3,5 $\mu\text{g C/mg C}$. Det høyeste forholdstallet gjelder for Aurevann som har den laveste prosentvise andelen NOM med molvekt over 10.000. Det laveste forholdstallet gjelder for Hellerudmyra som har den høyeste prosentvise andelen av NOM med molvekt over 10.000.

3.4.5 Effekt av “alder” på det organiske materialet

De ulike prøvene av råvann representerer NOM med ulik “alder”. Vann fra Hellerudmyra er tatt tilnærmet umiddelbart etter myra, mens vannet i Trehjørningen har teoretisk oppholdstid på 4 måneder og vannet i Aurevann har teoretisk oppholdstid på 9 måneder. Uten at en skal fokusere på sammenhengen mellom teoretisk oppholdstid og “alder” på NOM i vannprøvene, kan en fastslå at vann fra Hellerudmyra er relativt ungt, vann fra Aurevann er relativt gammelt, mens vannet fra Trehjørningen er “middels”. Effekten av alder må vurderes ut fra innholdet av TOC, AOC og farge, og ikke minst ut fra fordelingen av disse komponentene på ulike molvektsfraksjoner.

Effekten av alder er større for farge og TOC enn for AOC. Fordi det vil være en kontinuerlig nedbrytning av vannets innhold av biologisk nedbrytbart organisk materiale, forteller dette at det også skjer en kontinuerlig produksjon av relativt lett nedbrytbart organisk materiale ved nedbrytning av større organiske molekyler.

Både fargetall, TOC og AOC er høyere i ferskt humusvann fra Hellerudmyra enn i “lagret” vann fra Trehjørningen og Aurevann. Målingene gir ikke grunnlag for å trekke opp noe skille mellom vannkvaliteten i Trehjørningen og Aurevann mhp. de ulike metodene som er benyttet for å karakterisere det organiske materialet. I Aurevann er imidlertid andelen av det organiske materialet som har molvekt mindre enn 1000 større enn det som er tilfelle for Trehjørningen.

3.4.6 Begroingspotensialet som funksjon av vannbehandling

Effekten av den eksisterende vannbehandlingen på Aurevann mhp. begroingspotensialet er stor. Begroingspotensialet mer enn dobles pga. osonerering og klorering. Klorering alene gir en moderat økning i begroingspotensialet (ca. 25 % økning i AOC). At osonerering, og tildels klorering, øker begroingspotensialet i drikkevann, er i overensstemmelse med det som er rapportert av andre (se kapittel 2.11).

I kapittel 3.4.2 ble det vist at mens begroingspotensialet først og fremst er knyttet til organisk materiale med molvekt mindre enn 1000, er fargen knyttet til organisk materiale med molvekt over 10.000. Dette

viser at en vannbehandling som fjerner farge, og dermed også en vesentlig del av totalt organisk karbon, ikke nødvendigvis gir noen vesentlig reduksjon i begroingspotensialet.

4. Referanseliste

- Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. og Stahl, D. A. 1992. Molecular and microscopic identification of sulphate reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 58: 614-623.
- Amy, G. L., Collins, M. R., Kuo, C. J. and King, P. H. 1987. Comparing gel permeation chromatography and ultrafiltration for the molecular weight characterization of aquatic organic matter. *Jour. AWWA*. 79: 43-49.
- Arvin, E. 1996. Personlig meddelelse. Danmarks tekniske universitet.
- Banks, M. K. og Bryers, J. D. 1991. Bacteriel species dominance within a binary culture biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 1974-1979.
- deBeer, D. og Sweerts, R. A. 1989. Measurement of nitrate gradients with an ion selective microelectrode. *Anal. Chim. Acta*. 219: 351-356.
- deBeer, D., Srinivasan, R. og Stewart, P. S. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 4339-4344.
- Bradford, S. M., Palmer, C. J. and Olson, B. H. 1993. Assimilable organic carbon concentrations in Southern California surface and groundwater. *Wat. Res.* 28:427-435.
- Characklis, W. G., 1981. Fouling Biofilm development: a process analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1923-1960.
- Chen, Y. S. og Bungay, H. R. 1989. Microelectrode studies of oxygen transfer in trickling filter slimes. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 781-792.
- Colbourne, J. S., Dennis, P. J., Trew, R. M., Berry, C. og Vesey, G. 1988. Legionella and public water supplies. *Wat. Sci. Tech.* 20: 5-10.
- Conroy, P., Fielding, M. and Wilson, I. 1993. Investigating the effect of pipelining materials on water quality. *Water supply*. 11: 343-354.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S. og Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single cells. *Science*. 243. 1360-1363.
- Dexter, S. C., Sullivan, J. D., Williams, J. og Watson, S. W. 1975. Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces. *Appl. Microbiol.* 30: 298-312
- Easton, J. 1993. Measurement and significance of assimilable organic carbon. Report no. FR 0373, Foundation for Water Research, GB.
- Escher, A. R. og Characklis, W. G. 1988. Microbial colonization of a smooth substratum: A kinetic analysis using image analysis. *Water Science Technology*. 20: 277-283.

-
- Fiksdal, L. 1996. Mulige vannkvalitetsendringer med overføring av behandlet vann til forbruker. Foredrag på kurset Vannbehandling i lys av de nye drikkevannsforskriftene, NTNU, 3.-5. januar.
- Frias, J., Ribas, F. and Lucena, F. 1994. Critical study of the use of *Pseudomonas Fluorescens* P 17 to determine assimilable organic carbon (AOC). Wat. Res. 28: 1463-1469.
- Fransolet, G., Villers, G. og Maschelin, W. J. 1985. Influence of temperature on bacterial development in wtares. Ozone Sci. Engrg. 7: 205-210
- Garcia-Lara, J., Menon, P., Servais, P. og Billen, G. 1991. Mortality of faecal bacteria in seawater. Applied and Environmental Microbiology. 57: 885-888.
- Gibbs, R. A. and Hayes, C. R. 1989. Characterization of non-enteric bacterial regrowth in the water supply distribution network from a eutrophic reservoir. Wat. Sci. Tech. 21:3:49-53.
- Giles, D. 1996. Personlig meddelelse. Southern Water.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. og Pace, N. R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J. Bacteriology. 170: 720-726.
- Gjessing, E. 1996. Typing of NOM. Notat 03.10.96.
- Grady, C. P., Kirssch, E. J., Koczwar, M. K., Trgovcich, B. and Watt, R. D. 1984. Molecular weight distributions in activated sludge effluents. Wat. Res. 18: 2: 239-246.
- Hamsch, B. and Werner, P. 1993. Control of bacterial regrowth in drinking water treatment plants and distributionsystem. Water Supply. 11: 299-308.
- Hem, L. J. and Vik, E. A. 1996. Norwegian Experiences with different corrosion monitoring techniques. Proceedings from an international workshop and seminar on internal corrosion in water distribution systems (ed. by Hedberg, T., Vik, E. A. and Ferguson J). Chalmers, Göteborg.
- Hem, L. J. og Weideborg, M. 1994. Metoder for å unngå manganutfelling i filterdyser ved Vestfold Interkommunale Vannverk (VIV). Aquateam-rapport 94-139.
- Hem, L. J., Weideborg, M., Hval, S., Vik, E. A., Samdal, J. E. og Stene-Johansen, S. 1996. Idékonkurranse Oset. Drift og resultater av forsøksanleggene ved Oset vannrenseanlegg 1994/95. OVA/NIVA/Aquateam-rapport.
- Hiller, N. 1997. Typing of NOM. Notat. NIVA.
- Huck, P. M., Fedorak, P. M. and Anderson, W. B. 1991. Formation and removal of assimilable organic carbon during water treatment. Jour. AWWA. 83:12:69-80.
- Huck, P. M., Zhang, S. and Price, M. L. 1994. BOM removal during biological treatment; a first-order model. Jour. AWWA. 86:6:61-71.
- Hval, S. 1993. Forsøk med behandling av vann fra Aurevann vannverk, Bærum. Hovedoppgave D1-
-

1993-24 ved Institutt for vassbygging, NTH.

- Jago, P. and Sidorowisc. 1994. Final report on the association between AOC and BDOC, and an evaluation of the Lumac/KIWA biofilm monitor. Report no. FR 0463, Foundation for Water Research, GB.
- Janssens, J. G., Meheus, J. and Dirickx, J. 1985. Ozone enhanced biological activated carbon filtration and its effect on organic matter removal, and in particular on AOC reduction. *Wat. Sci. Tech.* 17:1055-1068.
- Johansen, Ø., Lund, V. og Ormerod, K. 1987. Problemer forårsaket av beleggdannelse og vekst av organismer i distribusjonssystemer for vann. Delrapport 1. Rapport 23 fra NTNFs utvalg for drikkevannsforskning.
- Kaplan, L. A., Bott, T. L. and Reasoner, D. J. 1993. Evaluation and simplification of the assimilable organic carbon nutrient bioassay for bacterial growth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 1532-1539.
- Kaplan, L. A., Reasoner, D. J. and Rice, E. W. 1994. A survey of BOM in US drinking waters. *Jour. AWWA.* 86:2:121-132.
- van der Kooij, D. 1978. The occurrence of *Pseudomonas spp.* in surface water and in tap water as determined on citrate media. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 43: 225-240.
- van der Kooij, D., Visser, A. and Hijnen, W. A. M. 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *Jour. AWWA.* 74:540-545.
- Kuenen, J. G. Jørgensen, B. B. og Revsbech, N. P. 1986. Oxygen microprofiles of trickling filter biofilms. *Water Res.* 20: 1589-1598.
- Kühl, M. og Jørgensen, B. B. 1992. Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 58: 1164-1174.
- Logan, B. E. and Jiang, Q. 1990. Molecular size distributions of dissolved organic matter. *Jour. Env. Eng.* 116:1046-1061.
- LeChevallier, M. W., Babock, T. M. og Lee, R. G. 1987. Examination and Characterization of distribution system biofilm. *Applied and Environmental Microbiology.* 53: 2714-2724
- LeChevallier, M. W. 1990. Coliform regrowth in drinking water: A review. *Jour. AWWA.* 82: 74-86.
- LeChevallier, M. W., Schulz, W. og Lee, R. G. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology.* 57: 857-862.
- LeChevallier, M. W., Shaw, N. E., Kaplan, L. A. and Bott, T. L. 1993. Development of a rapid assimilable organic carbon method for water. *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 1526-1531.

-
- Liu, D., Lau, Y. L., Chau, Y. K. og Pacepavicius, G. 1994. Simple technique for estimation of biofilm accumulation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 913 - 918.
- Loeb, G. A og Neihof, R. A., 1975. Marine conditioning films. *Adv. Chem. Ser.*, 145: 319-335.
- Lu, C., Biswas, P. og Clark, R. M. 1994. Simultaneous transport of substrates, Disinfectants and microorganisms in waater pipes.
- Lund, V. og Ormerod, K. 1994. The influence of disinfection processes on biofilm formation in water distribution systems. *Wat. Res.* 29. 1013-1021.
- Manz, W., Amann, R. Ludwig, W. Wagner, M og Schleifer, K-H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15. 593-600.
- Manz, W., Szewzyk, U., Erichsson, P., Amann, R. Schleifer, K-H. og Stenström, T.-A. 1993. In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S- og 23S rRNA-directed fluorescenbt oligonucleotide probes- *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 2293-2298.
- McCoy, W. F., Bryers, J. D. Robbins, J. og Costerton, J. W. 1981. Observation of fouling biofilm formation. *Can. J. Microbiol.* 27: 910-917.
- McFeters, G. A., Yu, F. P., Pyle, B. H. og Stewart, P. S. 1995. Physiological methods to study biofilm disinfection. *Journal of Industrial Microbiology.* 15: 333-338.
- Millipore, 1992. *Pharmaceutical process filtration catalogue 1992/1993.* Millipore Corporation.
- Nielsen, P. H. 1987. Biofilm kinetics and dynamics during high rate sulphate reduction under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 53: 27-32.
- Noble, P. A., Clark, D. L. and Olson, B. H. 1996. Biological stability of groundwater. *Jour. AWWA.* 88:5:87-96.
- Olivieri, V. P., Bakalian, A. E., Bossung, K. W. og Lowther, E. D. 1984. Recurrent coliforms in water distribution systems in the presence of free residual chlorine. In Jolley, K. L., Bull, R. J., Davis, W. P., Kats, S., Roberts, M. H. Jr. and Jacobs, V. A. (eds.): *Water chlorination, chemistry, environmental impacts and health effects.* Lewis Publishers, Inc. Chelsa, Mich., USA.
- Olson, B. H. 1982. Assesment and implications of bacterial regrowth in water distribution systems. EPA-600/52-82-072. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Olson, B. H., McCleary, R. og Meeker, J. 1991. Background and models for bacterial biofilm formation and function in water distribution systems. I Modelling the environmental fate of microorganisms. Hurst, C. J.(Ed). ISBN 1 - 555 - 81031 - 4.
- Parent, A., Fass, S., Dincher, M. L., Reasoner, D., Gatel, D. and Block, J. C. 1996. *Jour. CIWEM.* 10:6:442-445.
-

-
- Revsbech, N. P. og Jørgensen, B. B. 1986. Microelectrodes: their use in microbial ecology. *Adv. Microb. Ecology*. 9: 293-352.
- Revsbech, N. P., Nielsen, L. P., Christensen, P. B. og Sørensen, J. 1988. Combined oxygen and nitrous oxide microsensor for denitrification studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 2245-2249.
- Ridgway, H. F. og Olson, B. H. 1981. Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*. 41: 274 - 287.
- Rogers, J. og Keevil, C. W. 1992. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 2326-2330.
- Rozsak, D. B. og Colwell, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbial reviews*. 51: 365-379
- Schulze-Röbbecke, R. og Fisheder, R. 1989. Mycobacteria in biofilms. *Zbl. Hyg.* 188: 385-390.
- Seidler, R. J., Morrow, J. E. og Bagley, S. T. 1977. *Klebsiella* in drinking water emanating from redwood tanks. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 893-899
- Servais, P., Billen, G. og Hascoët, E. C. 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res.* 44: 445
- SHD (Sosial og Helsedepartementet). 1995: Forskrift om vannforsyning og Drikkevannsnormer
- Spigseth, T. 1995. Personlig meddelelse. OVA.
- Stanfield, G. og Jago, H. P. 1989. Application of ATP determinations to measure the concentration of assimilable organic carbon in water, side 99-108 i *ATP-luminescence* (Stanley, P. E., McCarthy, B. J. og Smither, R. / eds). Blackwell Scientific publications, Oxford.
- Strotmann, U. J, Schwarz, H. and Pagga, U. 1995. The combined CO₂/DOC test - a new method to determinate the biodegradability of organic compounds. *Chemosphere*. 30:525-538.
- Sutherland, I. W. Microbial exopolysaccharides - Their role in microbial adhesion in aqueous systems. *CRC-Critical Reviews in Microbiology*. 10: 173-201.
- Swerinnski, H., Gaiser, S. og Bardtke, D. 1985. Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: Interference of the test in biofilm reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 21: 125-128.
- Szewzyk, U., Manz, W., Amann, R., Schleifer, K-H. og Stenström, T.-Å. 1994. Growth and in situ detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water bacterium by use of 16S- og 23S - rRNA directed fluorescein oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*. 13: 169-176.
- Thurman, E. M., Wershaw, R. L., Malcolm, R. L. and Pickney, D. J. 1982. Molecular size of aquatic
-

humic substances. *Org. geochem.*, 4:27-35.

- Tobiason, J. E., Edzwald, J. K., Reckhow, D. A. and Switzenbaum, M. S. 1993. Effect of pre-ozonation on organic removal by in-line direct filtration. *Wat. Sci. Tech.* 27:11:81-90.
- Tuovinen, O. H. og Hsu, J. C. 1982. Aerobic and anaerobic microorganisms in the turbercles of the Columbus, Ohio, water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 761-764
- Victoreen, H. T. 1977. Water Quality deterioration in water pipelines. *Proc. AWWA. WQTC. Kansas city, Mo. U.S.A.*
- Vik, E. A. and Storhaug, R. 1996. Corrosion control - Norwegian experiences. *Proceedings from an international workshop and seminar on internal corrosion in water distribution systems* (ed. by Hedberg, T. , Vik, E. A. and Ferguson J). Chalmers, Göteborg.
- Werner, H. 1985. Eine Methode zur Bestimmung der Verkeimungsneigung von trinkwasser. *Vom Wasser*. 655: 257-270
- Werner, H. und Hamsch, B. 1988. Ursachen und Erfassung der Wiederverkeimung von Trinkwasser. *DVGW-Schriftenreihe Wasser*.
- Yu, F. P., Pyle, B. og McFeters, G. 1993. A direct viable counmt method for the enumeration of attached bacteria and assesment of biofilm disinfection. *Journal of Microbiological methods*, 17: 167-180.
- Yu, F. P. og McFeters, G. A. 1994. Rapid in situ assessmentr of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes. *Journal of Microbioloical methods*. 20: 1 - 10.
- Zobell, C. E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* 46:39-56.
- Ødegaard, H. 1988. Humus i norsk drikkevann - en problemkartlegging. Foredrag ved VAR-dagene, Tapir forlag.

Norsk institutt for vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00

Telefax: 22 18 52 00

Ved bestilling av rapporten,
oppgi løpenummer 3576-96

ISBN 82-577-3128-5