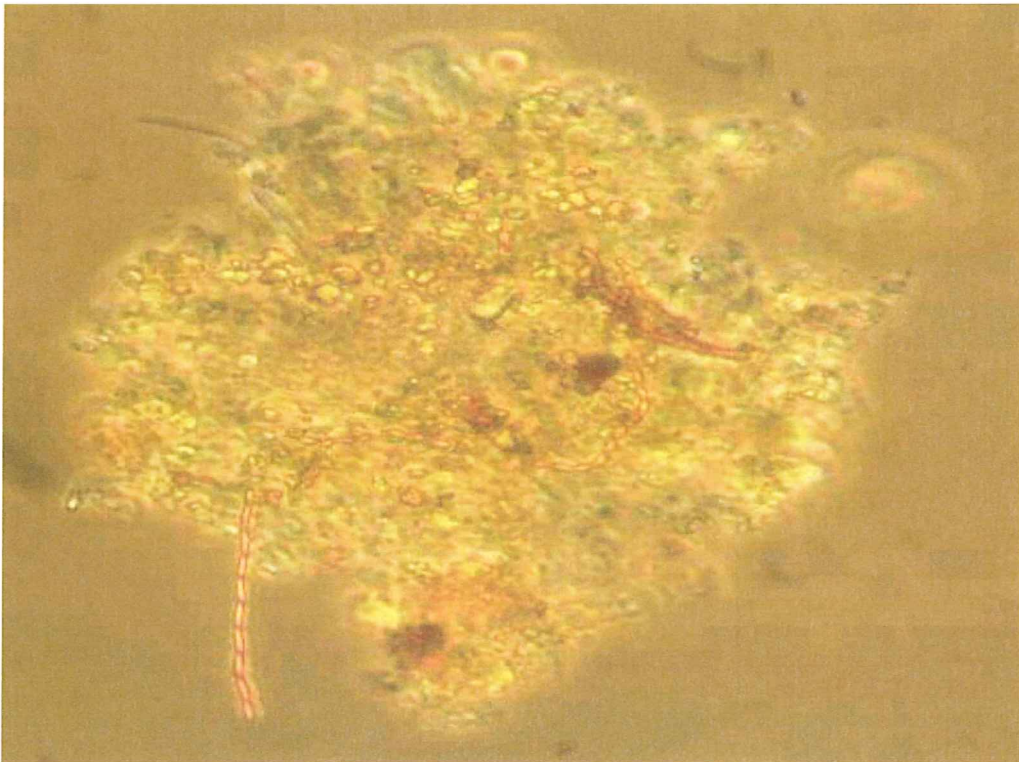


RAPPORT LNR 4464-2001

Biofilm og avleiringer i gammel drikkevannsledning i Oslo

Karakterisering og dannelsesbetingelser



Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00
Internet: www.niva.no

Sørlandsavdelingen

Televeien 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 37 29 50 55
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Sandvikaveien 41
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Nordnesboder 5
5005 Bergen
Telefon (47) 55 30 22 50
Telefax (47) 55 30 22 51

Akvaplan-niva

9296 Tromsø
Telefon (47) 77 75 03 00
Telefax (47) 77 75 03 01

Tittel Biofilm og avleiringer i gammel drikkevannsledning i Oslo. Karakterisering og dannelsesbetingelser.	Løpenr. (for bestilling) 4464-2001	Dato 17.12.2001
	Prosjektnr. Undernr. O-20173 2	Sider Pris 22
Forfatter(e) Harry Efraimsen Henning Mohn	Fagområde Miljøteknologi	Distribusjon åpen
	Geografisk område Oslo	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) VAV – Oslo kommune, Vann og Avløpsverket, v/ K. Reksten og S. Fosser	Oppdragsreferanse
--	-------------------

<p>Sammendrag</p> <p>For å belyse mikrobiologiske forhold knyttet til slamdannelse og begroing i distribusjonssystemet for drikkevann, ble det oppsamlet spyleslam fra to spylinger med to måneders mellomrom av et ca 100 meter langt rørstrekk i Oslo. Analysene to måneder etter første spyling indikerer at drikkevannet fører med seg nødvendige faktorer for mikrobiell oppblomstning på rørveggene, og det tar under to måneder å re-etablere en solid biofilm etter en spyling.</p> <p>Jern var det dominerende metall i uorganisk fraksjon av slammet. Den jernoksiderende bakterien <i>Gallionella</i> ble påvist i rikelig forekomst i slammet. Det er sannsynlig at korrosjonen er biologisk betinget.</p> <p>Assimilerbart organisk karbon (AOC) var vesentlig høyere på Lysehagan enn i vannprøve tatt ut fra utløpet fra Oset vannverk. Testing av membranfiltrert spyleslam viste at begroingslammet kan inneholde mye AOC. Dette tyder på at det frigis AOC fra det organiske materialet i begroingen som etableres i ledningsnettet, som kan gi grunnlag for bakterievekst i selve vannet. Arbeid med å isolere spesielle "pinpoint" bakterier førte ikke til påvisning hverken i vann eller i begroingslam.</p>
--

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Drikkevannsledninger 2. Biofilm 3. Slamdannelse 4. Mikroorganismer 	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Drinking water distribution networks 2. Biofilm 3. Sludge deposits 4. Microorganisms
---	---


Harry Efraimsen
Prosjektleder


Henning Mohn
Forskningsleder


Torsten Källqvist
Forskningssjef

Biofilm og avleiringer i gammel drikkevannsledning i Oslo.

Karakterisering og dannelsesbetingelser.

Forord

I løpet av de senere år er det blitt viet stadig mer fokus til de biologiske og kjemiske prosessene som foregår i distribusjonssystemene for drikkevann, bl.a. i Oslo kommune. Blant hovedprosessene i drikkevannsnettet kan nevnes dannelse av fastsittende mikrobiologisk kultur (biofilm) og avleiring av organisk materiale på innsiden av rørene.

Dette arbeidet er utført for å studere sammensetningen av mikroorganismesamfunnene i biofilmen og det avsatte materialet. Arbeidet er et bidrag til å øke drikkevannskvaliteten til konsumentene i Oslo.

Vi takker Vann- og Avløpsetaten i Oslo kommune for oppdraget.

Oslo, 17.12.2001

Henning Mohn

Innhold

Sammendrag	5
Summary	6
1. Innledning	7
2. Mål og strategi	7
3. Konklusjon	8
4. Metodebeskrivelser	9
4.1 Innsamling av prøvemateriale	9
4.1.1 Filtrering	9
4.2 Tørrstoff og Glødetap	9
4.3 Metaller	9
4.4 Organisk stoff	9
4.4.1 TOC/DOC	9
4.4.2 TOC i fast stoff	9
4.5 Fosfor og nitrogen	9
4.6 Produsert biomasse som polysakkarider (glykokalyx)	9
4.7 Mikrobiologiske parametre	10
4.7.1 Assimilerbart organisk karbon (AOC)	10
4.7.2 Kimtall	10
4.7.3 Identifisering av "pinpoint" bakterier	10
4.8 Mikroskopering av slam/begroing	10
5. Resultater og diskusjon	11
5.1 Spyleslammet	11
5.1.1 Biomasse og organiske stoffer i slammet	11
5.1.2 Organisk karbon, fosfor og nitrogen i drikkevann og membranfiltrert slamvann	13
5.1.3 Heterotrofe bakterier (kimtall)	14
5.1.4 Søking etter "pinpoint"-bakterier i drikkevann og i slam fra spylingen	15
5.1.5 AOC	15
5.1.6 Mikroskopi av spyleslam	16
6. Litteratur	18
7. Vedlegg	19

Sammendrag

Denne undersøkelsen er utført på oppdrag fra Vann og Avløpsetaten (VAV) i Oslo kommune for å belyse mikrobiologiske forhold knyttet til slamdannelse og begroing i distribusjonssystemet for drikkevann. Arbeidet er basert på oppsamling av spyleslam fra to spylinger med to måneders mellomrom i sommersesongen 2001 av et ca. 100 meter langt rørstrekk. Arbeidet ble utført på et rørstrekk nederst i veien Lysehagan ved Lysakerelva.

Blandet spyleslam fra første spyling viste seg å være dominert av rustavleiringer og hadde et relativt lavt innhold av bakterie-biomasse og organisk stoff. Analysene to måneder seinere indikerer at drikkevannet fører med seg alle nødvendige faktorer for mikrobiell oppblomsting på rørveggene, og med dagens vannkvalitet tar det under to måneder å re-etablere en solid biofilm etter en spyling.

Jern var det dominerende metall i uorganisk fraksjon av slammet. Den jernoksiderende bakterien *Gallionella* ble påvist i rikelig forekomst i slammet. Det er sannsynlig at korrosjonen er biologisk betinget og at denne bakterien er en viktig faktor.

Konsentrasjonen av løst organisk karbon lå rundt 4 mg/l, mens innholdet av fosfor og nitrogen var henholdsvis mindre enn 10 µg/l og 350-400 µg/l. Assimilerbart organisk karbon (AOC) var vesentlig høyere på Lysehagan enn i vannprøve tatt ut fra utløpet fra Oset vannverk. Testing av membranfiltrert spyleslam viste at begroingslammet kan inneholde mye AOC. Dette tyder på at det frigis AOC fra det organiske materialet i begroingen som etableres i ledningsnett, som kan gi grunnlag for bakterievekst med forhøyet bakterietall i selve vannet.

Arbeid med å isolere "pinpoint" bakterier, som i en tidligere undersøkelse viste størst overensstemmelse med arten *Pseudomonas mephitica* og *Janthinobacterium lividum*, førte ikke til påvisning av bakterien hverken i vann eller i begroingslam. Kimtall-nivåene i drikkevannet mellom hver spyling var forholdsvis lave.

Summary

Title: Biofilm and sludge deposits in an old drinking water distribution pipe in Oslo.
- Characterisation and conditions of formation.
Year: 2001
Authors: Harry Efraimssen and Henning Mohn
Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-4111-6

This investigation is carried out for City of Oslo's Department of water and waste water management (VAV) in order to study biological growth and sludge deposits within the drinking water distribution network. The work is based on two events of flushing in June and August 2001 on an approx. 100 metres long pipe. The work was conducted in the road named Lysehagan, by the stream Lysakerelva.

Mixed sludge from the first flushing event was dominated by rust-deposits and had a relatively low content of bacteria and organic matter. The analysis two months later indicates that the drinking water provides all required factors for microbial biofilms on the pipe walls, and with the current drinking water quality it takes less than two months to re-establish a solid biofilm.

Iron was the dominating element of the inorganic fraction of the sludge. The iron-oxidising bacterium *Gallionella* was identified in large numbers in the sludge. It is likely that bacteria cause the ongoing corrosion, hereof *Gallionella* species.

The concentration of dissolved organic carbon was approx. 4 mg/l, while the phosphorus and nitrogen content was 10 µg/l and 350-400 µg/l, respectively. The assimilative organic carbon (AOC) content was significantly higher at Lysehagan than by the Oset water work. Analysis of membrane-filtrated sludge from flushing revealed high AOC concentrations within the organic sludge. This indicates that AOC is released from the biofilm in the distribution network, which subsequently can lead to increased bacterial growth throughout the distribution network.

Bacterial isolation work was conducted in order to demonstrate presence or absence of so-called pinpoint bacteria. During this work, no such species were identified neither in the water phase nor in the sludge phase. Previously, pinpoint species like *Pseudomonas mephitica* or *Janthinobacterium lividum* were identified within Oslo's water distribution system.

1. Innledning

Denne undersøkelsen er utført på oppdrag fra Vann og Avløpsetaten (VAV) i Oslo kommune for å belyse slamdannelse og begroing i distribusjonssystemet for drikkevann i hovedstaden. Hensikten med arbeidet er å fremskaffe bedre kunnskap om kjemisk sammensetning av biofilm og avsatt slam, og dettes innvirkning på vannkvaliteten lokalt på nettet. Undersøkelsen må bl.a. sees i sammenheng med NIVAs undersøkelse for VAV i 2000 for karakterisering av en såkalt ”pinpoint-bakterie” på distribusjonsnettet, samt en utvikling i råvannskilden som gir økende farge på vannet.

Arbeidet ble utført på et rørstrekk nederst i veien Lysehagan ved Lysakerelva. VAV tok flere hensyn ved utvelgelse av prøvetakingssted, bl.a. skulle det forekomme periodevis oppblomstring av heterotrofe bakterier i vannet på lokaliteten. Videre skulle lokaliteten være egnet for praktisk gjennomføring selve spylingen, og forsøkene skulle forstyrre den normale driftssituasjonen minst mulig. Det ble derfor valgt ut en endeledning med få tilkoblingspunkter. Personell fra VAV utførte selve spylingen med svamp-plugger i hht vanlig prosedyre.

2. Mål og strategi

Arbeidets mål var følgende:

1. Karakterisering av de mikrobiologiske samfunn og deres vekstmiljø i biofilm og avleiret materiale fra et 80 år gammelt støpejernrør som sannsynligvis aldri tidligere er blitt spylt.
2. Karakterisering av de mikrobiologiske samfunn og deres vekstmiljø i nydannet biofilm og avleiret materiale fra samme rørstrekk etter en periode på to måneder med normal drift.
3. Evaluere forskjellen i sammensetning og dannelsesbetingelser i gammel og ny biofilm.
4. Evaluere endring i tilgang til biologisk vekstsubstrat (AOC) ved Oset vannverk og i Lysehagan.

Arbeidet er basert på oppsamling av spyleslam fra to spylinger med to måneders mellomrom i sommersesongen 2110 av et ca 100 meter langt rørstrekk. Spyleslam ble samlet opp av NIVAs personell og analysert i hht. beskrivelser presentert i kapittel 4. Resultatene er presentert i detalj i kapitel 5.

3. Konklusjon

Blandet spyleslam fra første spyling viste seg å være dominert av rustavleiringer og hadde et relativt lavt innhold av bakterie-biomasse og organisk stoff. Dette slammet besto av 18 % organisk materiale (glødetap), herav en andel av organisk karbon på 25 %. Innholdet av polysakkarider var 16,6 mg/g TTS. En annen prøve uttatt fra dette slammet etter ett minutt henstand inneholdt 31% organisk karbon i det organiske materialet og 29,0 mg polysakkarider per gram TTS, noe som indikerer at biologisk vekst skjer adskilt fra de tunge jern og slagpartiklene.

I nydannet spyleslam etter en 2 måneders periode med normalt vannforbruk for nyetablering av begroing ble det funnet 22% organisk materiale i blandprøven, og 18,6 mg/g TTS polysakkarider. Dette er en klar økning, og viser dannelse av frisk biomasse med stor evne til å re-etablere seg etter første spyling. En annen prøve uttatt på et tynt slam etter spyling med to pluggar inneholdt 32 % organisk karbon i det organiske materialet og 29,9 mg polysakkarider per g TTS, bekrefter inntrykket.

Resultatene fra slamanalysene indikerer at drikkevannet fører med seg alle nødvendige faktorer for mikrobiell oppblomsting på rørveggene, og med dagens vannkvalitet tar det under to måneder å re-etablere en solid biofilm etter en spyling.

Jern var det dominerende metall i uorganisk fraksjon av slammet. Årsaken til dette er oksidasjon av toverdig jern fra rørmaterialet eller slamavleiringer. Den jernoksiderende bakterien *Gallionella* ble påvist i rikelig forekomst i slammet. Det er sannsynlig at korrosjonen er biologisk betinget og at denne bakterien er en viktig faktor. En spyling med fjerning av gammel avsetning kan bidra til at jernoksiderende bakterier som f.eks. *Gallionella* får gunstigere vilkår for oksidasjon av jern, og at det i den etterfølgende periode faktisk foregår en økt dannelse av korrosjonsprodukter på rørveggen.

Metallinnholdet i slammet fra siste spyling var faktisk høyere per gram tørrstoff enn ved første spyling. Mikroskopiske observasjoner som ble gjort av slamstrukturen, kan underbygge denne antakelsen. Konsentrasjonen av mangan var minimal. Derfor er det lite sannsynlig at manganoksiderende bakterier gjør seg gjeldende, selv om hylsebakterier (genus *Leptothrix*) ble funnet.

Konsentrasjonen av løst organisk karbon var tilnærmet 4 mg/l, mens innholdet av fosfor og nitrogen var forholdsvis lavt, med henholdsvis mindre enn 10 µg/l og 350-400 µg/l. Assimilerbart organisk karbon (AOC) var vesentlig høyere på Lysehagan enn i vannprøve tatt ut fra utløpet fra Oset vannverk. Testing av membranfiltrert spyleslam viste at begroingslammet kan inneholde mye AOC. Dette tyder på at det frigis AOC fra det organiske materialet i begroingen som etableres i ledningsnett, og gir grunnlag for bakterievekst med forhøyet bakterietall i selve vannet.

Det ble imidlertid påvist lave kimtall i drikkevannet under testperioden mellom hver spyling. Umiddelbart etter siste spyling var der en vesentlig økning, men som allerede etter ett døgn var tilbake på normalt nivå for prøvestedet.

Arbeid med å isolere "pinpoint" bakterier fra kimtallsplatene, som i en tidligere undersøkelse viste størst overensstemmelse med arten *Pseudomonas mephitica* og *Janthinobacterium lividum*, førte ikke til påvisning av bakterien i vann eller i begroingslam.

4. Metodebeskrivelser

4.1 Innsamling av prøvemateriale

Alt glassutstyr som ble benyttet til prøvetakingen var godt rengjort og varmebehandlet ved 580 °C. Umiddelbart etter at spyleplugg hadde kommet ut av røret ble konsentrert slamvann samlet opp i 5 og 10 liters glassflasker for spesialanalyse.

4.1.1 Filtrering

Et delvolum av slamvannet ble filtrert gjennom membranfilter med porestørrelse 0,45 µm, (forbehandlet i spesialvask og skylt i destillert vann) for analyse av AOC (assimilerbart organisk karbon). Tilsvarende filtrering ble også foretatt på behandlet drikkevann fra vannverket ved Oset og ledningsnettets ved Lysehagan den 21. juni 2001. Denne filtreringen er obligatorisk for vann som skal analyseres for AOC.

4.2 Tørrstoff og Glødetap

Bestemmelsen ble utført i henhold til NIVA metode B3. Totalt tørrstoff ble bestemt ved tørking til tørrhet ved 105 °C og glødetapet etter forbrenning ved 550 °C.

4.3 Metaller

En representativ delprøve av slam ble oppløst i salpetersyre (NIVA-metode 10-1) og analysert med ICP- OES etter NIVA-metode E9. Konsentrasjonen av de enkelte metaller i tørrstoff og uorganisk fraksjon er beregnet på basis av vekt.

4.4 Organisk stoff

4.4.1 TOC/DOC

Total (TOC) og løst organisk stoff (DOC) ble analysert etter NIVA metode G 4-2 ved bruk av Dohrmann Phoenix 8000 TOC analysator. DOC analyse ble utført etter at prøven var filtrert gjennom 0,45 µm membranfilter.

4.4.2 TOC i fast stoff

Total organisk stoff på tørket materiale (tørrstoff) ble analysert etter NIVA metode G 6. Analyse materialet ble syrebehandlet for å eliminere uorganisk karbon, og konsentrasjon bestemt med Carbo Erba element analysator modell 1106.

4.5 Fosfor og nitrogen

Konsentrasjonen av total fosfor og nitrogen ble analysert på filtrert prøve av slamvannet og av drikkevann fra Lysehagan. Hensikten var å detektere konsentrasjonen av fosfor og nitrogen som blir frigitt fra slam ved spyling i forhold til konsentrasjonen i selve drikkevannet. NIVA metodene D2-1 og D6-1 ble anvendt for de to respektive parametre.

4.6 Produsert biomasse som polysakkarider (glykokalyx)

Ekstracellulære polymere forbindelser som bakterier produserer består hovedsakelig av polysakkarider. Dette materialet kan betraktes som "limstoffet" i dannelsen av biofilm. Ved å analysere på innholdet av polysakkarider i slam vil man få et grovt inntrykk av hvor aktiv begroingen har vært. For bestemmelse av polysakkaridkonsentrasjonen ble det benyttet en metode hvor fenol-

svovelsyre blandes med et definert prøvolum (G. Pacepavicius *et. al.* (1)). Polysakkarider omdannes til 5-(hydroksymetyl)-2-furaldehyd i sterk syre og fargedannelsen (absorbansen) kan avleses i et fotometer ved 485 nm.

4.7 Mikrobiologiske parametre

4.7.1 Assimilerbart organisk karbon (AOC)

Assimilerbart organisk karbon (AOC) er definert som den fraksjon av biologisk tilgjengelig løst organisk stoff som kan omdannes til celle-biomasse av bakterier, og uttrykkes som ekvivalent karbon konsentrasjon ved bruk av en omregningsfaktor for acetat-karbon.

Bakteriestammer med renkulturer av *Pseudomonas fluorescens* (P17) (ATCC 49642), og *Spirillum* (NOX) (ATCC 49643) ble benyttet i denne metoden. Stammene er de mest benyttede og anvendes som standard organismer i denne testen.

Det ble benyttet en forenklet metode av Mark W. LeChevallier, *et. al.* 1993 (2). Alle flasker til prøvetaking og inkubering av delprøvene ble varmebehandlet ved 550 °C. Tilstedeværende mikroorganismer i testvannet ble inaktivert ved 60 °C i 30 minutter før inokulering med de to stammer av testbakterier. Testprøvene ble inkubert ved 20 ± 1 °C i 7 døgn. Antall kim/ml ble bestemt ved dyrkning på R₂A agarmedium. AOC verdine ble beregnet ved å anvende den mest brukte utbytteverdi for acetat for disse to bakteriene, som er 4.1×10^6 cfu (P17) og 1.2×10^7 cfu (NOX) / µg acetat-C, uttrykt som acetat-C ekvivalenter per liter.

4.7.2 Kimtall

Det ble foretatt analyser av heterotrofe bakterier (kimtall) i drikkevannet foran første spyling, under etableringsperioden mellom spylingene og like etter siste spyling. Standardmetode ISO-NS 6222 ble benyttet for denne metoden.

4.7.3 Identifisering av "pinpoint" bakterier

Kolonier som viste karakteristisk vekst, og som tidligere var betegnet som pin-point ble dyrket på kimtallsmedium. For å isolere disse koloniene ble det foretatt ompoding på R₂A agarskåler til de var i renkultur. En kommersielt tilgjengelig identifikasjonstest (API- E20 bestemmelsesnøkkel fra bioMérieux) ble benyttet for å kunne fastslå slekt (genus) eventuelt artsnavn (species).

4.8 Mikroskopering av slam/begroing

Materialet i slamvannet ble undersøkt ved mikroskopi for kvalitativ observasjon. Det var primært partiklenes form og utseende som ble observert. Forekomst av karakteristiske jernoksiderende bakterier som *Gallionella* og *Leptothrix* var av størst interesse, men også andre arter som kan bidra til utfelling av jern og mangan og forårsake stor slamdannelse i ledningsnettene ble vurdert i denne sammenheng.

Typisk begroingsslam ble behandlet med syrereagens for oppløsning av utfelt jern for å fremheve grunnstrukturen i strukturen. Det er presentert bilder av denne delen av undersøkelsen i rapporten som illustrerer godt begroingsslammets grunnstruktur.

5. Resultater og diskusjon

5.1 Spyleslammet

5.1.1 Biomasse og organiske stoffer i slammet

Innholdet av mengden bakterier kan ikke måles direkte, men bestemmes indirekte vha. analyser for organisk karbon og polysakkarider. I fersk bakteriebiomasse vil andelen av organisk karbon representere 40-50 % av det organiske materialet (målt som glødetap). Polysakkarider er en viktig substans i de ekstracellulære polymere som bakteriene utskiller. Dette er en parameter med begrenset erfaringsgrunnlag for bruk på denne type slam, men vi anser likevel analysen for relevant. Spyleslammets innhold av organiske forbindelser er vist i tabell 1.

Tabell 1. Organisk materiale (glødetap), TOC og polysakkarider i slammets tørrstoff.

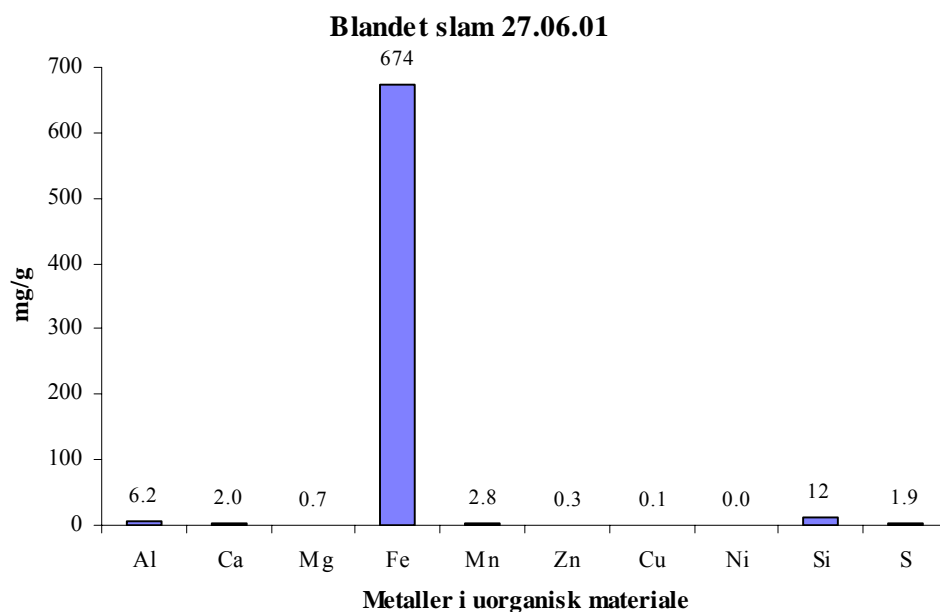
Prøve- taking		Organisk materiale, %			TOC mg/g TTS	Polysakkarider mg/g TTS
		Delprøve		Snitt		
Dato	Prøve	1	2	Snitt	mg/g TTS	mg/g TTS
27.06.2001	Blandet slam	18.5	17.8	18.2	45.3	16.6
"	Toppslam	16.0	16.8	16.4	50.7	29.0
28.08.2001	Spyleslam	21.2	22.1	21.6	97.4	18.6
"	Uttynnet slam	24.4	24.0	24.2	78.0	29.9

Spyleslammet tatt 27.06.01 inneholdt en betydelig andel grovt partikulært materiale som sedimenterte raskt. Det ble derfor valgt å preparere to prøver til analyse av slammet. Blandet slam er en representativ prøve av blandingen, mens "toppslam" er prøve tatt ut etter ca. ett minutt henstand slik at de raskest sedimenterbare partiklene ble skilt fra. Det var antatt at toppslam ville ha en høyere andel organisk materiale enn blandet slam, men det ble analysert til å være nesten to prosent lavere.

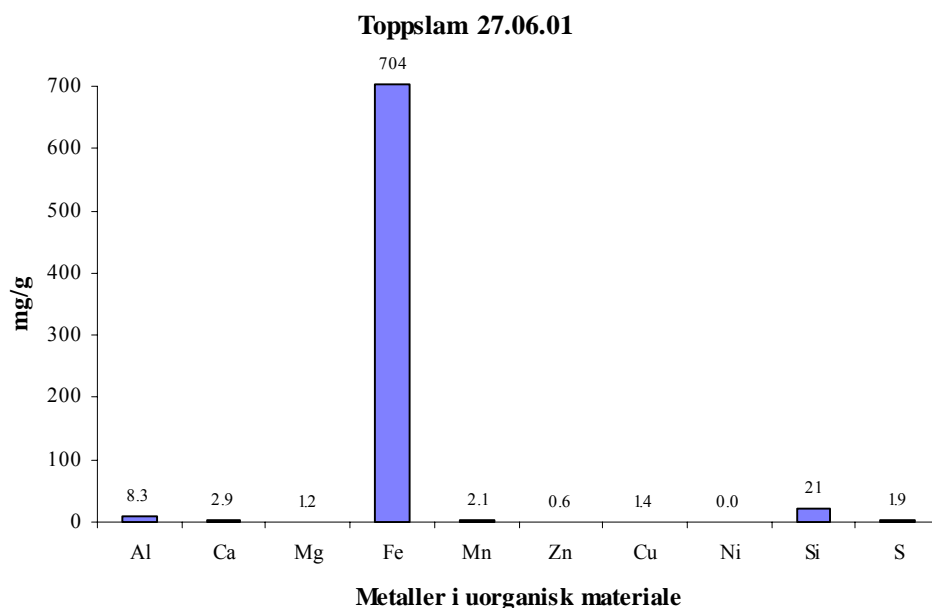
Gjentatt spyling foretatt den 28.08.01 viste at slammets organisk andel hadde økt merkbart. Også ved den siste spylingen ble det analysert to prøver. Slamprøven merket "spyleslam" ble tatt etter at første plugg ble sendt gjennom ledningsstrekking, mens "uttynnet slam" ble tatt etter at den andre pluggen var sendt gjennom ledningen. Resultatene viser at uttynnet slam inneholdt en signifikant høyere andel organisk materiale enn første spyleslam, som også er forventet sett på bakgrunn av slammets partikkelstruktur og utseende.

Innholdet av organisk karbon, gir et bilde av hvor mye "bakteriebiomasse" det er i materialet, sammen med konsentrasjon av polysakkarider. I fersk bakteriebiomasse vil andelen av karbon representere 40-50 %. I de foreliggende verdier var karboninnholdet i blandet slam ca. 25 % av organisk fraksjon, mens det var ca. 31 % i toppslam. Fra andre spyling, som skal være et ferskere slam, er verdien for første prøve av spyleslam lite representativ og sannsynligvis feil. I uttynnet slam var mengden av karbon 32 %, som er det samme som i toppslam fra første spyling. Disse to slamprøvene viste også likeverdig innhold av polysakkarider basert på tørrstoffinnhold.

Sammensetningen av det uorganiske materialet er viktig for å belyse hva som er årsaken til slamdannelsen. Resultatene fra analysene for slam fra spylingen i juni er vist i figurene 1 a og 1 b. Konsentrasjonen av jern dominerte fullstendig, mens innholdet av mangan var meget lavt, mindre enn 3 mg/g. Innholdet av metaller som aluminium, kalsium, og silisium er signifikant, men må betraktes som lavt. I toppslammet var konsentrasjonen høyere enn i blandet slam som kan indikere at jern og silisium var forfordelt til partiklene av mindre størrelse og som sedimenterte langsommere.



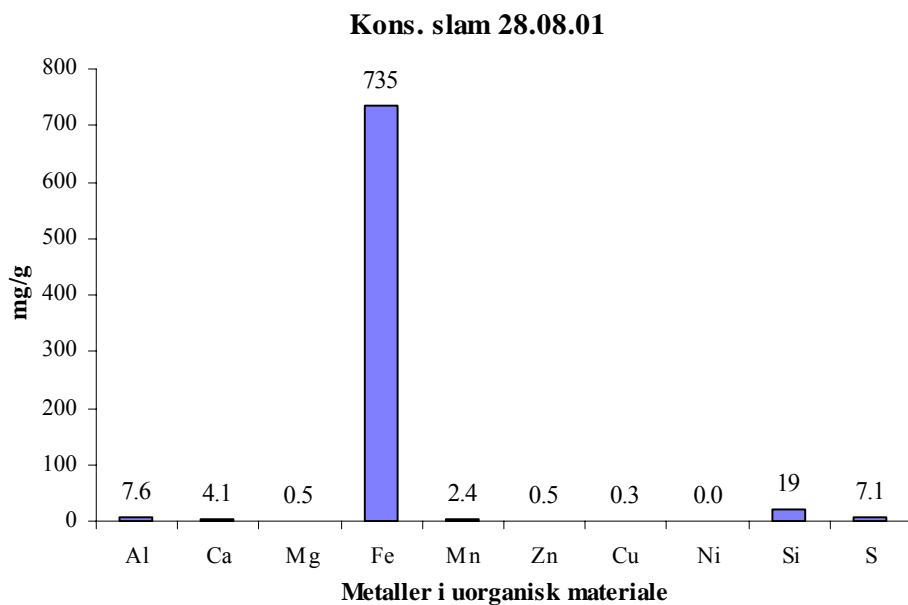
Figur 1 a. Konsentrasjonen av metaller i blandet slam.



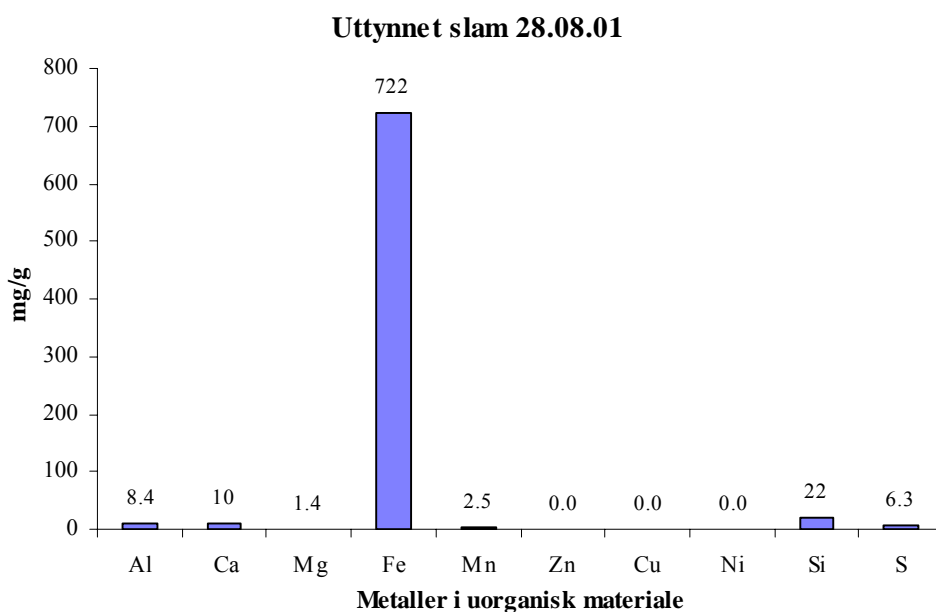
Figur 1 b. Konsentrasjonen av metaller i toppslam

I figur 2 a og b er konsentrasjon av metallene i spyleslammet fra 28. august vist på tilsvarende måte som for første spyling. Mesteparten av slamdannelsen må være etablert siden forrige spyling og kan derfor betraktes som relativt ferskt slam.

Konsentrasjonen av jern i begge slamprøvene ble målt til å være høyere enn i slam fra første spyling, mens de øvrige metaller er på samme nivå. Dette tyder på at korrosjon av jern har vært betydelig i perioden etter første spyling.



Figur 2 a. Konsentrasjonen av metaller i konsentrert slam



Figur 2 b. Konsentrasjonen av metaller i uttynnet slam

5.1.2 Organisk karbon, fosfor og nitrogen i drikkevann og membranfiltrert slamvann

Det ble utført kjemiske analyser i drikkevann i perioden mellom de to spylingene og i membranfiltrert slamvann. Hensikten var å få kjennskap til næringsgrunnlaget for mikrobiell vekst og dannelsen av biofilm.

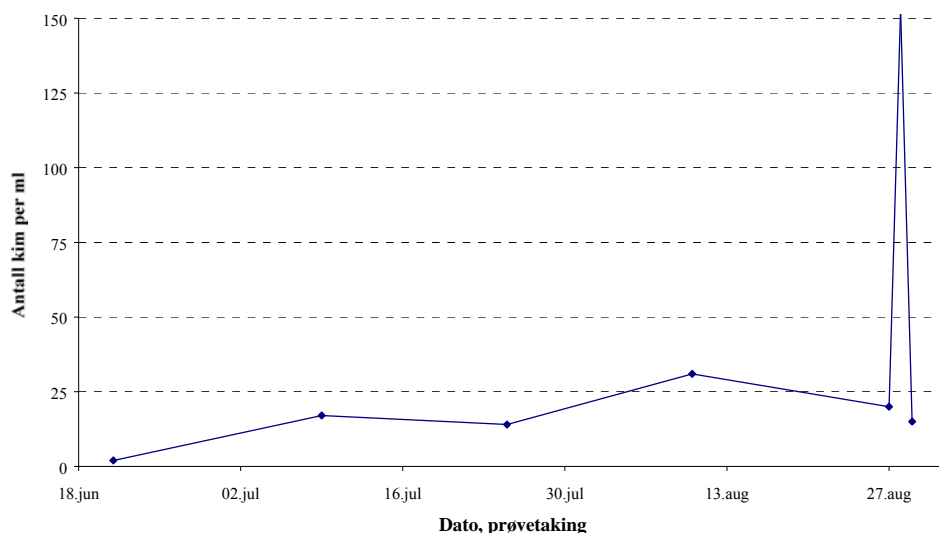
Tabell 2. Kjemiske analyser av drikkevann og membranfiltrert slamvann.

Prøvetype		Karbon, DOC mg/l C	Fosfor µg/l P	Nitrogen µg/l N
Drikkevann	10.08.	3,9		
Drikkevann	27.08.	3,9	7	385
Drikkevann	29.08.	3,7		
Filtrert slamvann	27.06.	2,5	13	375
Kons. slamvann	28.08.	3,3	23	480
Uttynnet slamvann	28.08.	3,9	10	365

Konsentrasjonen av løst organisk karbon (DOC) var stabil i prøvene tatt fra drikkevannet. I filtrert slamvann fra 1. spyling var konsentrasjonen av DOC vesentlig lavere enn i drikkevannet. Også i konsentrert slamvann fra siste spyling var innholdet noe lavere sammenlignet med drikkevann. Dette kan ha sammenheng med at lett omsettbare fraksjoner blir metabolisert av mikroorganismer og bindes til biomasse. Utlekking av fosfor er påviselig, særlig i konsentrert slamvann. Konsentrasjonen av nitrogen var svært lik både i drikkevann, slamvann fra første spyling, og uttynnet slamvann ved siste spyling. Bare i konsentrert slamvann fra andre spyling ble det målt en klart høyere konsentrasjon. Dette kan tyde på at også noe nitrogen frigis fra begroingen, og at det kan være større utlekking i aktiv biomasse.

5.1.3 Heterotrofe bakterier (kimtall)

Resultatene fra kimtallsanalyser som ble utført for å belyse utviklingen i perioden etter første spyling er vist i figur 3.



Figur 3. Utviklingen i kimtall mellom og like etter siste spyling.

Det ble tatt en prøve den 21.06.01 for å avklare hvilket kim-nivå som kunne forventes på stedet hvor spylingen var lokalisert. Bare 2 kim/ml ble funnet. I mellomperioden var kimtallet meget moderat, med en svak økning utover i perioden. Det ble tatt en prøve til analyse etter at spylingen var avsluttet og vannet viste et klar utseende. Denne prøven viste et innhold av kim på 153/ml. Dagen etter spyling ble det tatt en ny prøve som viste 15 kim/ml. Resultatene indikerte en rask stabilisering av kimtall etter spylingen, og at det dagen etter var normale kimtall i drikkevannet.

5.1.4 Søking etter "pinpoint"-bakterier i drikkevann og i slam fra spylingen

Tidligere undersøkelser (delrapport 201731) har vist at denne bakterien er en saktevoksende *Pseudomonas sp.* som danner små karakteristiske kolonier på kimtallsagar. Det ble foretatt spesiell søking etter karakteristiske kolonier ved kimtallsbestemmelsene. Utsåing av spyleslam på dyrkningsagar ble også utført. Kun sporadiske funn ble gjort på pinpoint-lignende kolonier.

En stamme ble isolert fra koloni fra vannprøve tatt den 27. august og en annen fra spyleslammet tatt den 28. august. Bakteriene ble dyrket i flytende R2A-medium, med etterfølgende utstrykning på standard R2A-agarmedium, for isolering av rene stammer. Isolatet fra drikkevann vokste raskt i R2A-buljong. Bakterien var en bevegelig stavbakterie med celler som ofte ble observert parvis, men også korte kjeder med 4-5 celler i hver. Celler ble observert i klaser som i litt eldre kultur utviklet fnokker av bakterier. Morfologisk var dette bakterier som er karakteristisk for Pseudomonader.

Isolatet fra slamvannet ble dyrket etter samme fremgangsmåte og vokste meget godt på R2A-buljong. Dette isolatet var også en bevegelig stavbakterie, men var kortere i forhold til bredde (lengde var ca. 1½ bredde). Cellene hold seg i suspensjon og holdt mediet turbid over flere dager. Det ble ikke dannet ansamlinger av celler slik at evnen til å danne fnokker var liten. Med hensyn til vekstform og fnokkdannelse var denne bakterien forskjellig fra den forrige.

Bestemmelse med identifikasjonssystemet API 20 NE for å undersøke substratbehovet og eventuelt bestemmelse, i det minste til slekt, viste at få substrat ble utnyttet. Begge bakterieisolatene var oksidase positive, og dannet syre fra glukose og assimilerte gluconat. Isolatet fra vannprøve tatt den 27. august assimilerte malate og mannose i tillegg, men isolatet fra slamvannet assimilerte N-acetyl-glukosamin. Disse vekstfaktorene var ikke tilstrekkelig til å gi en nærmere identifikasjon av isolatene.

5.1.5 AOC

Potensialet for bakterievekst, f. eks. uttrykt som kimtall, er assosiert til tilgjengelig assimilert organisk karbon (AOC) i drikkevann. AOC-analysene av behandlet vann tatt fra vannverket ved Oset og vann fra ledningen ved Lysehagan gir en status av konsentrasjonsnivået i tidsperioden for spylingsepisodene.

Fullstendige rapporter for hver AOC-test er vist i vedlegg. Det ble valgt å benytte både *Ps. fluorescens* (P17) og *Spirillum* (NOX) i denne undersøkelsen. P17 kan utnytte et bredt spekter av organiske stoffer og nytte både nitrat og ammonium som N-kilde. NOX er i stand til å utnytte bl.a. oksalat og er ofte inkludert i denne type test. Oksalsyre blir dannet ved ozonering av drikkevann. P17 viste størst variasjon i de undersøkte prøvene. Analysen i viste at for P17 var AOC økt med en faktor på 3 fra Oset til Lyshagan.

Lett assimilert stoff i vannet er målt til å være vesentlig høyere ute på nettet enn det er i vannet når det forlater vannverket. NOX viste vesentlig mindre respons for næringsgrunnlaget, eller ikke i stand til å utnytte det til å bygge opp cellebiomasse.

Tabell 3 . AOC i drikkevann og i membranfiltrert slamvann fra spyling.

Lokalitet	AOC µg/L <i>Ps. fluorescens</i> (P17)	AOC µg/L <i>Spirillum</i> (NOX)	Samlet AOC
Behandlet vann fra Oset	35	67	102
Drikkevann fra Lysehagan	119	94	213
Filtrert spylevann fra Lysehagan 27.06.	230	137	367
Filtr. vann (kons. slam) Lyshag. 28.08	513	113	626
Filtr. vann (uttyn. slam) Lyshag. 28.08	89	67	156

Tabell 3 viser de enkelte resultater som ble oppnådd i drikkevann og filtrert vann fra spyleslam, med de to testorganismene.

Resultatene fra vann av spyleslam viste at det kan avgis betydelig med AOC. I spylevannet fra spylingen i august var det særlig P17 som utnyttet AOC i vannet, men NOX viste relativt mindre respons. Resultatet fra uttynnet slamvann indikerer at AOC avtar raskt og at AOC er assosiert til den mest konsentrerte slamfraksjonen under spylingen. Det filtrerte vannet fra uttynnet slam viste AOC i samme konsentrasjonsområde som det som ble målt i drikkevann fra Lysehagan i juni.

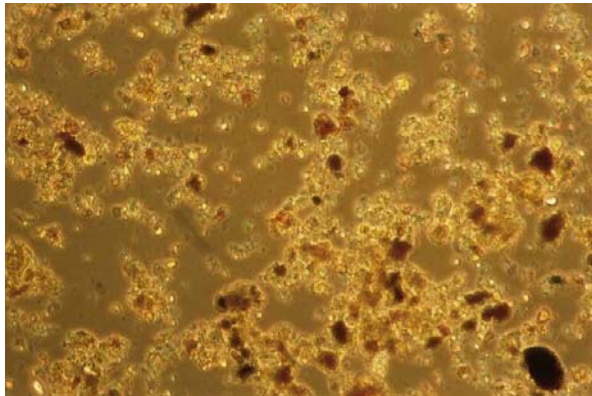
Disse resultatene bekrefter at utlekking av AOC fra begroingslam i drikkevannsledninger kan være betydelig, og gi grunnlag for økt vekst av bakterier som resulterer i uønsket høye kimtall i vannet hos abonnent. Det ble påvist svært høye kimtall i slammet, men da analysen ble utført med for liten fortykning av slamprøvene under utsåingen kan verdiene ikke oppgis med akseptabel nøyaktighet.

5.1.6 Mikroskopi av spyleslam

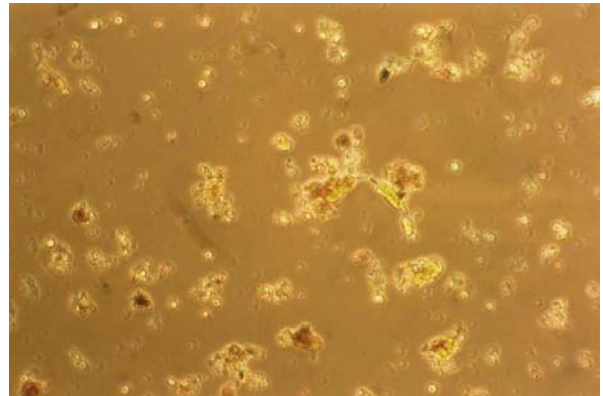
Spyleslammet ble også undersøkt ved bruk av mikroskop og partikkelstrukturen og bakterievekst er presentert ved de bilder som er vist på neste side. Slam fra spylingen i juni viste kompakt struktur, bestående av rustbrune partikler med varierende størrelse. De største partiklene sedimenterte raskt, og viste typisk karakter av gammelt slam. Det ble observert filamentfrakturer av hylsebakterier, som sannsynligvis var fra *Leptothrix spp.*, med typisk avsetning av jernoksider. Også fragmenter av tråder fra vekst av *Gallionella*, som ble klart synlig etter behandling med syrereagens. Utbredelsen av *Gallionella* gir indikasjoner på at det foregår en korrosjon av rørmaterialet, som er gamle jernrør.

Bilde 1 og 2 viser grunnstrukturen i slammet før og etter avfarging (oppløsning av utfelt jern). Det ble observert betydelig utbredelse av små partikler (1-2 µm) som antas å være korte stavbakterier. Behandlingen med syrereagens førte til at grunnstrukturen i fnokkene ble betydelig mer synlig under observasjon i mikroskopet, og som er illustrert spesielt i bilde 6. I det fingranulerte materialet (toppslam) ble også observert partikler som er ført inn med råvannet, som f. eks. skall fra kiselalger.

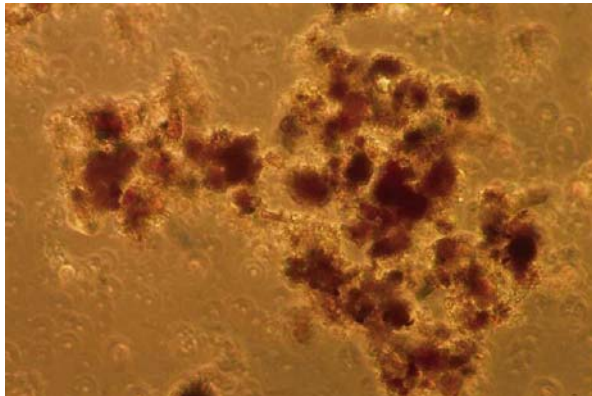
Spyleslammet fra 28.08.01 (andre spyling) ga et klart inntrykk av å være et "ferskere" slam. I fnokkstrukturen var utbredelsen av filamentøse bakterier stor, og særlig trådfragmenter fra *Gallionella*. Disse trådene var "innbakt" i fnokkene, og med sin karakteristiske avleiring av jernoksider var dette det dominerende materialet. Bildene 4 og 6 viser tydelig trådstrukturen etter at det er foretatt syrebehandling av preparatet.



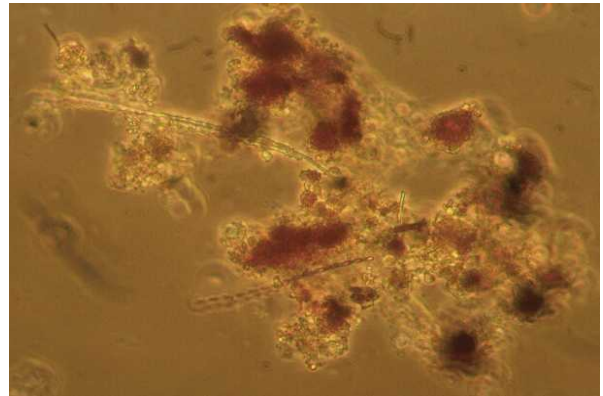
Bilde 1. Fra spyleslam 27.06.01 Typisk fnokkstruktur



Bilde 2. Fra samme prøve som er syrebehandlet for å få løst opp utfelt jern og mangan.



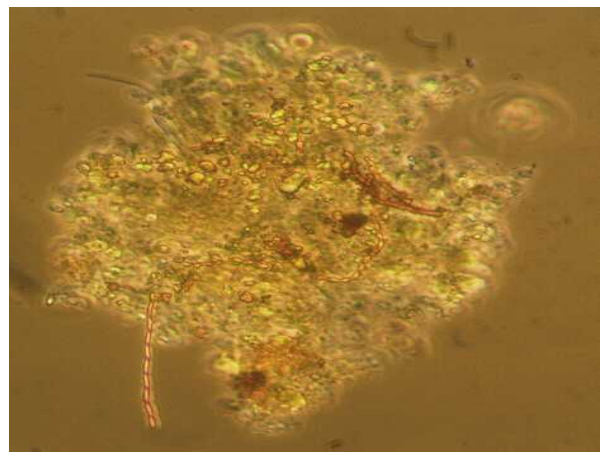
Bilde 3. Fra kons. spyleslam 28.08.01 Dominerende fnokkstruktur med kraftig utfelling av jernoksid.



Bilde 4. Samme materiale som b.3, men behandlet med syre for synliggjøre *Gallionella* tråder



Bilde 5. Fra kons. spyleslam 28.08.01 med kraftig utfelling av jern rundt *Gallionella* tråder



Bilde 6. Samme materiale som b.3, men behandlet med syre for synliggjøre *Gallionella* tråder

6. Litteratur

1. Pacepavicius G., Lau Y. L., Liu D., Okamura H., Aoyama I.
Environmental Toxicology and Water Quality, Vol. 12 (1997)
2. LeChevallier Mark W, et. al. 1993
Development of a Rapid Assimilable Organic Carbon Method for Water
Appl. and Environmental Microbiology, Vol. 59 No. 5 pp. 1526-1531.
3. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation,
Identification, Applications. Chapter 40. The genus *Gallionella* by Hans H. Hanert

7. Vedlegg

Assimilerbart organisk stoff (AOC) i drikkevann NIVA metode for AOC

Norsk institutt for vannforskning
Postboks 173 Kjelsås
N- 0411 Oslo, Norge
Tel: (47) 22 18 51 00
Fax: (47) 22 18 52 00

Test lokalitet: Oslos drikkevann **Prosjekt:** 201732
Kunde: Vann og Avløpsetaten (VAV)
Prøve mottatt: 21.06.2001
Lagringsbet.: Transport med bil, hentet av NIVAs representant.
Prøvetaking: Prøven tatt av NIVA på preparerte glassflasker levert fra testlaboratoriet
Test periode: 21.06.- 28.06. 2001

Test betingelser:

Utstyr: 1000 mL pyrex flasker med teflon skrukork. Forbehandling: Standard vask. Skyllt med destillert vann. Flaskeåpning dekket med Al-folie og varmebehandlet ved 580 °C. 3 flasker ble benyttet for hvert testvann.

Inokulum: *Pseudomonas fluorescens* (P17) (ATCC 49642), Tetthet; $5,4 \cdot 10^7$ /mL
Spirillum (NOX) (ATCC 49643) Tetthet; $1,9 \cdot 10^7$ /mL
 Dyrket i 15 døgn i AOC-medium (500 µg acetat-C/L) før bruk.
 Utsåing: Spredeplate-teknikk på R2A agar medium.

Inkubasjon: Temperatur: 19,5 - 19,8 °C . Varighet: 7 døgn.

pH: Start: 7,16 Slutt: 7,4

Referanse: Destillert vann, (+ makrosalter) test konsentrasjon; 100 µg C/L, som Natriumacetat
 Empirisk verdi: (P-17) $4,1 \times 10^6$ /µg C/l. (NOX) $1,2 \times 10^7$ /µg C/l.

Preparering av testprøve: 200 mL prøve, fordelt i 3 flasker ble benyttet i testen. Varmebehandlet ved 60 °C i 30 minutter og avkjølt i vannbad til 20 °C. Inokulert med 100 µL fra respektive bakteriekulturer. Plassert i klimarom på ristebord for kontinuerlig risting av flaskene.

Resultater:

Behandlet drikkevann, Oset

Testorganismer	<i>Ps. fluorescens</i> (P17)	<i>Spirillum</i> (NOX)	Samlet AOC
Antall/mL (snitt)	145167	802222	
AOC Utbytte-faktor	4100CPU/µg	12000 CFU/µg	
AOC µg/L (acetat C ekv./L)	35	67	102
Rel. Standard avvik %	8	15	

Drikkevann fra Lysehagan

Testorganismer	<i>Ps. fluorescens</i> (P17)	<i>Spirillum</i> (NOX)	Samlet AOC
Antall/mL (snitt)	486444	1133444	
AOC Utbytte-faktor	4100CPU/µg	12000 CFU/µg	
AOC µg/L (acetat C ekv./L)	119	94	213
Rel. Standard avvik %	68	34	

Oslo, 20. oktober 2001

Testet av Åse Bakketun

Kvalitetsikring Harry Efraimsen
Sign.

Norsk
institutt
for
vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
N- 0411 Oslo, Norge
Tel: (47) 22 18 51 00
Fax: (47) 22 18 52 00

Assimilerbart organisk stoff (AOC) i drikkevann NIVA metode for AOC

Test lokalitet: Lysehagan. Membranfiltrert spyleslam **Prosjekt:** 201732
Kunde: Vann og Avløpsetaten (VAV)
Prøve mottatt: 27.06.2001
Lagringsbet.: Transport med bil, hentet av NIVAs representant.
Prøvetaking: Prøven tatt av NIVA på preparerte glassflasker levert fra testlaboratoriet
Test periode: 27.06.- 4.07. 2001

Test betingelser:

Utstyr: 1000 mL pyrex flasker med teflon skrukork. Forbehandling: Standard vask. Skylt med destillert vann. Flaskeåpning dekket med Al-folie og varmebehandlet ved 580 °C. 3 flasker ble benyttet for hvert testvann.

Inokulum: *Pseudomonas fluorescens* (P17) (ATCC 49642), Tetthet; $5,4 \cdot 10^7$ /mL
Spirillum (NOX) (ATCC 49643) Tetthet; $1,9 \cdot 10^7$ /mL

Dyrket i 21 døgn i AOC-medium (500 µg acetat-C/L) før bruk.
Utsåing: Spredplate-teknikk på R2A agar medium.

Inkubasjon: Temperatur: 19,5 - 19,8 °C . Varighet: 7 døgn.

pH: Start: 7,20 Slutt: 7,4

Referanse: Destillert vann, (+ makrosalter) test konsentrasjon; 100 µg C/L, som Natriumacetat
Empirisk verdi: (P-17) $4,1 \cdot 10^6$ /µg C/l. (NOX) $1,2 \cdot 10^7$ /µg C/l.

Preparering av testprøve: 200 mL prøve, fordelt i 3 flasker ble benyttet i testen. Varmebehandlet ved 60 °C i 30 minutter og avkjølt i vannbad til 20 °C. Inokulert med 100 µL fra respektive bakteriekulturer.
Plassert i klimarom på ristebord for kontinuerlig risting av flaskene.

Resultater:

Membranfiltrert spyleslam fra Lysehagan

Testorganismer	<i>Ps. fluorescens</i> (P17)	<i>Spirillum</i> (NOX)	Samlet AOC
Antall/mL (snitt)	944556	1645556	
AOC Utbytte-faktor	4100CPU/µg	12000 CFU/µg	
AOC µg/L (acetat C ekv./L)	230	137	367
Rel. Standard avvik %	16	9	

Oslo, 20. oktober 2001

Testet av Åse Bakketun

Kvalitetsikring Harry Efraimsen
Sign.

Norsk
institutt
for
vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
N- 0411 Oslo, Norge
Tel: (47) 22 18 51 00
Fax: (47) 22 18 52 00

Assimilerbart organisk stoff (AOC) i drikkevann NIVA metode for AOC

Test lokalitet: Lysehagan. Membranfiltrert spyleslam **Prosjekt:** 201732
Kunde: Vann og Avløpsetaten (VAV)
Prøve mottatt: 28.08.2001
Lagringsbet.: Transport med bil, hentet av NIVAs representant.
Prøvetaking: Prøven tatt av NIVA på preparerte glassflasker levert fra testlaboratoriet
Test periode: 29.08.- 5.09. 2001

Test betingelser:

Utstyr: 1000 mL pyrex flasker med teflon skrukork. Forbehandling: Standard vask. Skyllt med destillert vann. Flaskeåpning dekket med Al-folie og varmebehandlet ved 580 °C. 3 flasker ble benyttet for hvert testvann.

Inokulum: *Pseudomonas fluorescens* (P17) (ATCC 49642), Tetthet; $5,4 \cdot 10^7$ /mL
Spirillum (NOX) (ATCC 49643) Tetthet; $1,9 \cdot 10^7$ /mL
 Dyrket i 22 døgn i AOC-medium (500 µg acetat-C/L) før bruk.
 Utsåing: Spredeplate-teknikk på R2A agar medium.

Inkubasjon: Temperatur: 19,5 - 19,8 °C . Varighet: 7 døgn.

pH: Start: 7,10 Slutt: 7,2

Referanse: Destillert vann, (+ makrosalter) test konsentrasjon; 100 µg C/L, som Natriumacetat
 Empirisk verdi: (P-17) $4,1 \times 10^6$ /µg C/l. (NOX) $1,2 \times 10^7$ /µg C/l.

Preparering av testprøve: 200 mL prøve, fordelt i 3 flasker ble benyttet i testen. Varmebehandlet ved 60 °C i 30 minutter og avkjølt i vannbad til 20 °C. Inokulert med 100 µL fra respektive bakteriekulturer.
 Plassert i klimarom på ristebord for kontinuerlig risting av flaskene.

Resultater:

Membranfiltrert vann fra konsentrert spyleslam fra Lysehagan

Testorganismer	<i>Ps. fluorescens</i> (P17)	<i>Spirillum</i> (NOX)	Samlet AOC
Antall/mL (snitt)	2104000	1354000	
AOC Utbytte-faktor	4100CPU/µg	12000 CFU/µg	
AOC µg/L (acetat C ekv./L)	513	113	626
Rel. Standard avvik %	15	9	

Membranfiltrert vann fra uttynnet spyleslam fra Lysehagan

Testorganismer	<i>Ps. fluorescens</i> (P17)	<i>Spirillum</i> (NOX)	Samlet AOC
Antall/mL (snitt)	364444	805556	
AOC Utbytte-faktor	4100CPU/µg	12000 CFU/µg	
AOC µg/L (acetat C ekv./L)	89	67	156
Rel. Standard avvik %	23	13	

Oslo, 20. oktober 2001

Testet av Åse Bakketun

Kvalitetsikring Harry Efraimsen
Sign.