



# Virusverwijdering door drinkwaterzuiveringsprocessen; de waarde van somatische fagen, F-specifieke fagen en adenovirussen

**BTO 2011.010**  
**Februari 2011**

# Virusverwijdering door drinkwaterzuiveringsprocessen: de waarde van somatische fagen, F-specifieke fagen en adenovirussen

**BTO 2011.010**  
**Februari 2011**

© 2009 KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.



# Colofon

**Titel**

Virusverwijdering door drinkwaterzuiveringsprocessen: de waarde van somatische fagen, F-specifieke fagen en adenovirussen

**Projectnummer**

B111633

**Projectmanager**

Niels Dammers

**Opdrachtgever**

CVO (College van Opdrachtgevers)

**Kwaliteitsborger**

Gertjan Medema

**Auteur**

Leo Heijnen

**Verzonden aan**

BTO-participanten

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar



# Voorwoord

De betrokken waterbedrijven, Dunea, Evides, Groningen, PWN, Waternet, WML en Watertransportmaatschappij WRK worden bedankt voor het faciliteren van het nemen van de monsters op de verschillende locaties.



# Samenvatting

Virussen vormen een belangrijke bedreiging voor de veiligheid van drinkwater. Voor het uitvoeren van de wettelijke Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD) door de waterbedrijven zijn gegevens verzameld over het voorkomen van virussen in het oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor de productie van drinkwater. Echter, de kennis over de effectiviteit van de toegepaste zuiveringsstappen om de virusconcentratie te reduceren is nog beperkt. Veel kennis is gebaseerd op onderzoek waarbij op laboratoriumschaal zuiveringsprocessen zijn nagebootst, er is maar weinig kennis over de effectiviteit van zuiveringsprocessen voor de reductie van de concentratie van virussen in operationele zuiveringen.

In dit onderzoek zijn drie parameters onderzocht op hun bruikbaarheid om de effectiviteit van zuiveringsprocessen voor de reductie van de concentratie van virussen te kunnen meten: de bacterievirussen F-specifieke RNA fagen en somatische colifagen en menspathogene adenovirussen type 40/41.

Om de effectiviteit van zuiveringsstappen te kunnen bepalen is het noodzakelijk om zeer gevoelige meetmethoden toe te passen. Dit is gedaan door de efficiënte hemoflow- en centricon-concentratiemethoden te gebruiken om de virussen uit grote volumes water te concentreren en vervolgens gevoelige detectiemethoden toe te passen om de virussen aan te tonen. Voor detectie van F-specifieke RNA fagen en somatische colifagen zijn kweektechnieken toegepast voor detectie van F-specifieke- en somatische colifagen. Voor detectie van adenovirussen 40/41 is de kwantitatieve PCR (Q-PCR) techniek gebruikt. Met Q-PCR wordt een kenmerkend fragment van het erfelijk materiaal (DNA) van adenovirussen 40/41 kunstmatig vermeerderd en aangetoond.

Om de bruikbaarheid van deze methoden te onderzoeken zijn met deze methoden metingen uitgevoerd bij negen productiebedrijven die oppervlaktewater gebruiken voor de productie van drinkwater. Bij deze productiebedrijven zijn monsters van het ruwe oppervlaktewater, en monsters die zijn genomen na de eerste zuiveringsstappen geanalyseerd.

Uit de analyse van het ruwe oppervlaktewater bleek dat de concentratie F-specifieke RNA-fagen te laag was (gemiddeld 79 PVE/l) om het mogelijk te maken om de effectiviteit van zuiveringsstappen te meten. De concentratie (infectieuze) somatische colifagen was aanmerkelijk hoger (gemiddeld  $1,96 \times 10^4$  PVE/l) en de concentratie, met PCR gedetecteerde humane adenovirussen was ook hoog (5,44 DNA kopieën/l). Het is opvallend dat een groot deel van de gedetecteerde adenovirussen na centrifugatie in de pellet terecht komen, een veel kleiner deel van de somatische colifagen komt na centrifugatie in de pellet terecht. Waarschijnlijk vormen adenovirussen aggregaten of binden ze vrij efficiënt aan deeltjes.

Op basis van een beperkt aantal metingen na verschillende zuiveringsstappen kan geconcludeerd worden dat somatische colifagen en adenovirussen bruikbaar zijn om de effectiviteit van zuiveringsstappen te bepalen. Er zijn indicaties dat de fagen zich in de zuivering anders gedragen dan de menspathogene adenovirussen. Uitgebreider onderzoek is nodig om beter inzicht te krijgen in het gedrag van deze virussen in zuiveringsprocessen. Door het kleine analysevolume van de Q-PCR methode die gebruikt is voor detectie van adenovirussen is de detectiegrens van deze methode hoger dan de detectiegrens van de kweekmethode voor detectie van somatische colifagen. Hierdoor is het met de somatische colifagen beter mogelijk om reductie van de virusconcentratie ten gevolge van zuiveringsprocessen te meten. Verdere optimalisatie van de methode waarmee het DNA uit



geconcentreerde monsters wordt geëxtraheerd zou de detectiegrens van de adenovirusmethode kunnen verlagen.

# Inhoud

<b>Voorwoord</b>	<b>1</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
<b>Inhoud</b>	<b>5</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>7</b>
<b>2 Methoden</b>	<b>9</b>
2.1 Monsterpunten	9
2.2 Monsterconcentratie	9
2.3 Bepaling van colifagen	11
2.3.1 Bepaling van somatische colifagen	11
2.3.2 Bepaling van F-specifieke (RNA-)colifagen	11
2.4 Extractie van DNA en Q-PCR voor adenovirussen	11
2.4.1 Extractie van DNA	11
2.4.2 Q-PCR voor adenovirussen	12
2.5 Detectiegrenzen van de methoden	13
<b>3 Resultaten</b>	<b>15</b>
3.1 Opbrengst van de hemoflow- en centricon concentratiemethoden	15
3.2 Colifagen en adenovirussen in het oppervlaktewater	15
3.3 Effectiviteit van de zuivering voor de reductie van de concentratie fagen en adenovirussen	19
3.3.1 WRK (Lekkanaal, Nieuwegein)	19
3.3.2 Waternet (Loenen)	20
3.3.3 WML (Maas bij Roosteren)	21
3.3.4 WML (Maas bij Heel)	22
3.3.5 PWN (Andijk)	23
3.3.6 Groningen (De Punt)	24
3.3.7 Evides (Biesbosch)	25
3.3.8 Evides (Ouddorp)	26
3.3.9 DZH (Afgedamde Maas)	27
3.4 De verhouding tussen somatische colifagen en adenovirussen	28
<b>4 Discussie</b>	<b>31</b>
4.1 Methoden	31
4.1.1 Detectiegrens van de methoden	31
4.1.2 Opbrengst	31
4.1.3 Virussen in de pellet na centrifugatie	31
4.2 Virusconcentraties in oppervlaktewater	32
4.2.1 F-specifieke fagen	32
4.2.2 Somatische colifagen	33
4.2.3 Adenovirussen	33

4.3	Effectiviteit van de zuivering voor de reductie van de concentratie fagen en adenovirussen	33
4.3.1	F-specifieke fagen, somatische colifagen en adenovirussen voor het bestuderen van de capaciteit van zuiveringsstappen	34
4.3.2	Het effect van zuiveringsprocessen op de concentraties adenovirussen en somatische fagen	35
<b>5</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>37</b>
5.1	De methoden	37
5.2	Effectiviteit van zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie adenovirussen en fagen	38
5.3	Aanbevelingen	38
<b>6</b>	<b>Literatuur</b>	<b>41</b>
I	F-specifieke fagen, somatische colifagen en adenovirussen in oppervlaktewater	1
II	Somatische colifagen en adenovirussen in de zuivering	1

# 1 Inleiding

Virussen vormen een belangrijke bedreiging voor de veiligheid van drinkwater. Door de grote genetische variatie ontstaan er steeds nieuwe virussen die zich in hoog tempo over de wereld kunnen verspreiden. Door het kleine formaat van veel virussen (20-80 nm) zijn de, in de waterzuivering toegepaste fysisch chemische verwijderingsmethoden, zoals filtratie en passage door de bodem, minder goed in staat om virussen te verwijderen. Virussen die ziekte kunnen veroorzaken bij mensen worden in grote aantallen door geïnfecteerde personen uitgescheiden. Deze virussen komen in het rioolwater en worden maar zeer beperkt verwijderd in rioolwaterzuiveringsinstallaties. Vandaar dat het oppervlaktewater wordt belast met een scala aan virussen (de Roda Husman et al., 2005, de Roda Husman et al., 2006, Taylor et al., 2001) en dat hoge concentraties in oppervlaktewater worden gevonden die bij de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater verwijderd moeten worden.

Ten behoeve van de uitvoering van de wettelijke Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD), zoals vastgelegd in de Inspectierichtlijn (Anoniem, 2005) zijn door de waterbedrijven gegevens verzameld over het voorkomen van Enterovirussen in ruwwater. Deze virussen worden gebruikt als indicator voor de aanwezigheid van virussen van fecale oorsprong. Daarnaast is voor de AMVD kwantitatieve informatie nodig over de effectiviteit van de zuiveringprocessen voor de reductie van de concentratie virussen. Echter, de kennis over de effectiviteit van de verschillende processtappen voor de reductie van de concentratie virussen uit oppervlaktewater is beperkt. Veel van de kennis is gebaseerd op experimenten waarbij op laboratorium- en proefinstallatieschaal de individuele zuiveringsstappen zijn nagebootst en de verwijdering van verschillende virussen is bestudeerd (Medema and Theunissen, 1996, Schijven, 2001). Er is slechts weinig onderzoek gedaan naar de effectiviteit van deze zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie virussen in operationele zuiveringen. In de jaren 80 zijn enige gegevens verzameld over de verwijdering van enterovirussen in verschillende zuiveringen (van Olphen et al., 1984) maar het bleek dat de concentraties te laag zijn om de effectiviteit van de zuiveringsstappen betrouwbaar te bepalen. Uitgebreider onderzoek naar de concentraties enterovirussen in ruw oppervlaktewater met celkweek (de Roda Husman et al., 2005, Theunissen et al., 1998) toonde aan dat de concentraties van deze enterovirussen in het oppervlaktewater bij de innamepunten van de waterbedrijven laag zijn (0,4-3 PVE/l). Ze zijn daarom minder geschikt om de effectiviteit van zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie virussen te kunnen meten.

Om te komen tot een betere schatting van de microbiologische veiligheid van drinkwater is het noodzakelijk om meer kennis te genereren over de effectiviteit van drinkwaterzuiveringsprocessen voor het reduceren van de concentratie virussen.

Doel van dit onderzoek was het vaststellen van de toepasbaarheid van drie verschillende virustypen voor het bepalen van de effectiviteit van verschillende zuiveringsstappen bij de drinkwaterbereiding: somatische colifagen, F-specifieke RNA fagen en adenovirussen 40/41.

In het kader van de AMVD worden momenteel metingen van bacterievirussen (F-specifieke RNA fagen en somatische colifagen) gebruikt voor het vaststellen van de effectiviteit van zuiveringsprocessen voor de reductie van de concentratie virussen. De resultaten die worden verkregen met deze bacterievirussen zijn variabel en er is behoefte om de resultaten te valideren door de resultaten te vergelijken met de resultaten die worden verkregen met menspathogene virussen. Bovendien hebben experimenten op laboratoriumschaal aangetoond dat er verschillen zijn in de effectiviteit van zuiveringsstappen voor het reduceren van virusconcentraties die behoren tot verschillende typen (Abbaszadegan et al., 2007, Abbaszadegan et al., 2008). Het is dus mogelijk dat de effectiviteit van zuiveringsstappen voor

het reduceren van fagen niet in alle situaties vergelijkbaar is met de effectiviteit voor het reduceren van de menspathogene virussen.

Voor deze validatie is gekozen voor het meten van humane adenovirussen., vanwege de hoge concentraties die in andere onderzoeken zijn aangetoond in oppervlaktewater (Albinana-Gimenez et al., 2009a, Albinana-Gimenez et al., 2009b), Voor kwantitatieve detectie van het DNA van adenovirus 40/41 wordt een Q-PCR methode gebruikt waarmee een kenmerkend DNA fragment van adenovirus 40/41 wordt vermenigvuldigd met een polymerase kettingreactie (PCR) en gedetecteerd tijdens de PCR-reactie (real-time) door gebruik te maken van synthetische fluorescente DNA-probes. Doordat er een verband is tussen de DNA-concentratie aan het begin van de PCR-reactie en het tijdstip waarop een detecteerbaar signaal wordt gevormd door de PCR-reactie is met deze methode kwantificatie van het adenovirus-DNA en daarmee ook adenovirusdeeltjes mogelijk. Deze Q-PCR methode is bij KWR ontwikkeld in het BTO onderzoek van 2006-2007. Zeer recent is ook het gebruik van adenovirussen voor het meten van de effectiviteit van de zuivering beschreven (Albinana-Gimenez et al., 2009a).

Het gebruik van somatische colifagen voor het monitoren van de effectiviteit van zuiveringsprocessen is eerder beschreven (Payment, 1991, Payment and Franco, 1993). Voor het aantonen van somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen worden standaard kweekmethoden toegepast waarmee infectieuze virusdeeltjes worden aangetoond.

Om het mogelijk te maken om nog virussen te meten na zuiveringsstappen is het noodzakelijk om zeer gevoelige methoden te gebruiken. Voor een hoge gevoeligheid is het noodzakelijk om grote volumes water te kunnen onderzoeken, hiervoor dient men goede concentreringsmethoden toe te passen waarmee het mogelijk is om de virussen, met hoge opbrengst, uit grote volumes te concentreren. Daarom is in dit onderzoek de hemoflow ultrafiltratie-methode (Veenendaal, 2007) gebruikt om een groot volume monster (ca. 50 l) sterk te concentreren tot een veel kleiner volume (ca. 0,5 l) en zijn vervolgens de deeltjes in dit concentraat nog verder geconcentreerd, tot een volume van ca. 5 ml, door toepassing van een centricon-ultrafiltratie methode (Veenendaal, 2007). Van deze concentratiemethoden is aangetoond dat bacteriofagen, bacteriën en protozoa met een hoge opbrengst, eenvoudig met een factor 1000 tot 10.000 geconcentreerd kunnen worden (Veenendaal, 2007).

De specifieke doelen van dit onderzoek waren:

1. Bepalen of de concentraties adenovirussen, F-specifieke RNA fagen en somatische colifagen in oppervlaktewater, dat wordt gebruikt voor de productie van drinkwater, voldoende hoog zijn om de effectiviteit van zuiveringsstappen voor reductie van de concentratie virussen te kunnen kwantificeren.
2. Onderzoeken of de effectiviteit van zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie virussen van adenovirussen vergelijkbaar is met de effectiviteit van deze zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie F-specifieke RNA fagen en somatische colifagen. Het ging daarbij om een eerste indruk op basis van analyse van een gering aantal monsters.

Om deze onderzoeksvragen te beantwoorden zijn de concentrerings- en analysemethoden toegepast bij negen verschillende productielocaties die oppervlaktewater gebruiken voor de productie van drinkwater. De methoden zijn daarbij toegepast op het ruwe oppervlaktewater om te onderzoeken welke concentraties bacteriofagen en adenovirussen de zuivering binnen gaan en na verschillende stappen in de zuivering om te onderzoeken of de concentratie virussen na de zuiveringsstappen afnemen en of deze afname in concentratie voor bacteriofagen en adenovirussen vergelijkbaar is.

## 2 Methoden

### 2.1 Monsterpunten

Voor dit onderzoek is, in de tweede helft van 2008 en het begin van 2009, bij 9 productielocaties onderzoek gedaan naar het voorkomen van somatische-, F-specifieke colifagen en adenovirussen in het ingenomen oppervlaktewater en na eerste stappen in de (voor)zuivering. Tabel 1 geeft een overzicht van de onderzochte locaties.

Tabel 1. De locaties waar water is onderzocht op de aanwezigheid van Somatische-, F-specifieke fagen en adenovirussen

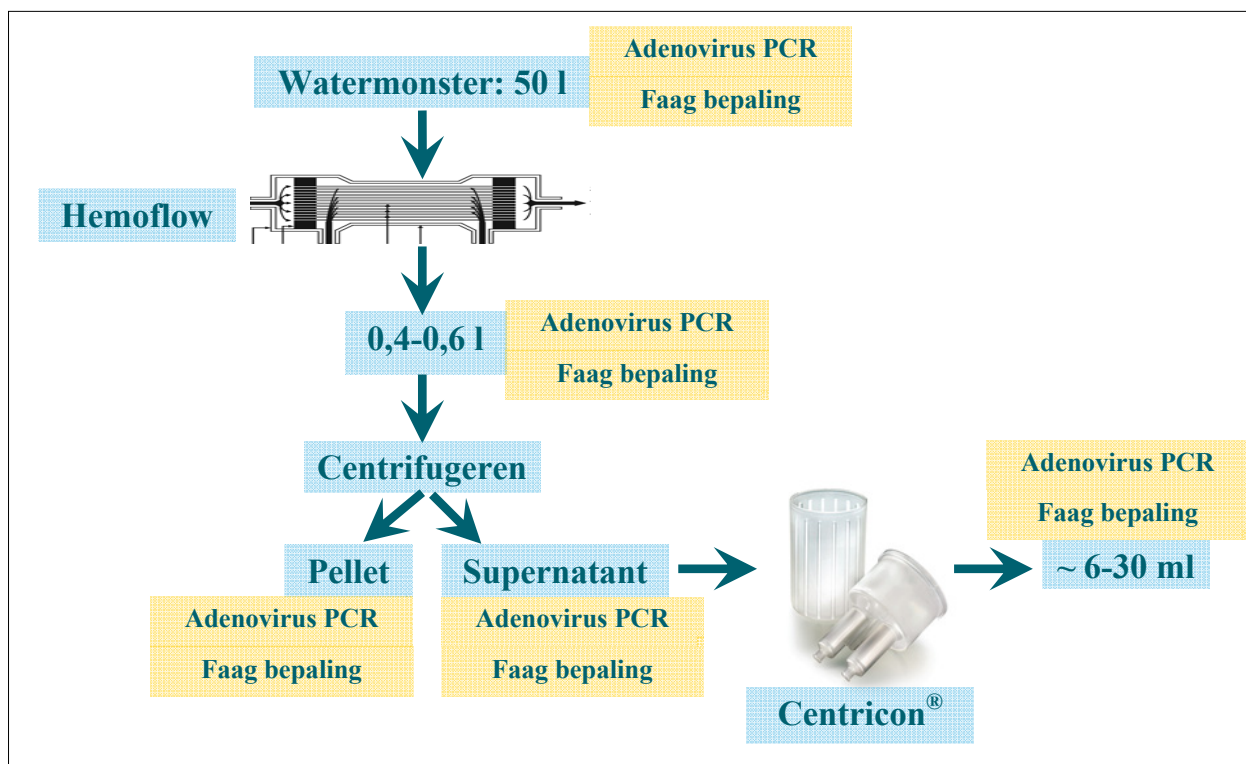
Productiebedrijf	Monsternummer	Monsterlocatie	Datum
WRK (Lekkanaal, Nieuwegein)	M090036	Inname Ruw (lekkanaal)	09 juli 2008
	M090037	Na sedimentatie	
	M090038	Na snelfilters	
Waternet (Loenen)	M082481	Inname Waterleidingkanaal	15 juli 2008
	M082482	Vóór filtratie	
	M082483	Na filtratie	
WML (Maas bij Roosteren)	M082868	Inname Maaswater	05 aug. 2008
	M082869	Ruwwater na bodempassage	
WML (Maas bij Heel)	M082870	Inname Maaswater	05 aug. 2008
	M082871	Boschmolen plas <sup>1</sup> (bekken)	
	M082872	Ruwwater na bodempassage	
	M082873	Na snelfiltratie	
PWN (Andijk)	M090139	Inname IJsselmeer	22 jan. 2009
	M090140	Inlaatkanaal (na bekken)	22 jan. 2009
	M084168	Na microzeven	08 okt. 2008
	M084169	Na flocculatie	08 okt. 2008
	M084170	Na zandfiltratie	08 okt. 2008
Groningen (De Punt)	M084324	Inname Drentsche Aa	15 okt. 2008
	M084325	Na bekken	
	M084326	Na sedimentatie	
	M084327	Na filtratie	
	M084328	Na langzame zandfiltratie	
Evides (Biesbosch)	M084654	Inname Maaswater (Keizersveer)	12 nov. 2008
	M084655	Spaarbekken Biesbosch	
Evides (Ouddorp)	M084656	Inname Haringvliet	12 nov. 2008
	M084657	Na microzeven	
	M084758	Na filtratie voorzuivering	
DZH (Andelse Maas)	M090072	Inname Brakel	13 jan. 2009
	M090073	Bergambacht na snelfiltratie	

<sup>1</sup>Om het effect van verblijf in het spaarbekken te meten was het de bedoeling geweest om het water van "De Lange Vlieter" te bemonsteren, door een misverstand is een monster van het water van de Boschmolen plas genomen en geanalyseerd.

### 2.2 Monsterconcentratie

Om de lage concentraties somatische-, F-specifieke colifagen en adenovirussen na zuiveringstappen te kunnen meten is een lage detectiegrens van belang. Daarom worden de virussen uit de watermonsters eerst geconcentreerd. Een schematisch overzicht van de verschillende stappen die zijn toegepast bij het concentreren van de monsters is weergegeven in figuur 1. Voor het concentreren is gebruik gemaakt van de eerder ontwikkelde hemoflow methode (Veenendaal, 2007). Bij deze hemoflow methode wordt cross-flow ultrafiltratie

gebruikt om deeltjes, waaronder de virusdeeltjes, uit het water te concentreren. Een monstervolume van ca. 50 l is in een eerste concentratiestap m.b.v. het Hemoflow polysulfone® filter (Fresenius) teruggebracht tot een volume van ca. 0,5 l. Om grotere deeltjes uit het geconcentreerde monster te verwijderen zijn de troebele monsters gecentrifugeerd. Daardoor komen de grotere deeltjes in de pellet terecht en wordt verdergegaan met het supernatant van de centrifugestap. De toegepaste snelheid van centrifugatie is bij deze stap te gering om vrije (niet aan deeltjes gebonden) virusdeeltjes te peletteren, vrije virusdeeltjes blijven dus in het supernatant. In dit stadium van het onderzoek is zowel de pellet als het supernatant geanalyseerd op virussen om te onderzoeken of na centrifugatie geen virusdeeltjes in de pellet terecht komen of dat virusdeeltjes toch in de pellet terecht komen doordat ze gebonden zijn aan deeltjes of in aggregaten voorkomen. De virusdeeltjes uit het supernatant zijn verder geconcentreerd door gebruik te maken van een Centricon® filter (Millipore). Deze Centricon® filters zijn voorzien van een ultrafiltratie membraan dat in staat is om o.a. de virusdeeltjes tegen te houden. Water en andere kleine moleculen worden middels centrifugatie door de membraan heengedraaid. Aansluitend wordt het filter omgekeerd en opnieuw gecentrifugeerd. Het water dat in de membraan is achtergebleven wordt door de centrifugatiekracht het filter uitgedraaid en neemt daarbij de deeltjes (waaronder de virusdeeltjes) mee. De Centricon® concentratiemethode zorgt ervoor dat het volume dat na de hemoflow is overgebleven (ca. 0,5 l) verder kan worden geconcentreerd tot een volume van ca. 6 ml zonder dat daarbij grote verliezen optreden (Veenendaal, 2007).



Figuur 1: schematisch overzicht van de monsterconcentratie stappen en de fracties die zijn gebruik voor de analyses

Zoals in figuur 1 is weergegeven zijn in dit onderzoek van de meeste monsters alle verschillende fracties geanalyseerd op de aanwezigheid van somatische en F-specifieke fagen en adenovirussen:

- Monster zonder concentratiestappen
- Monster na concentratie over hemoflow-filter

- De pellet na centrifugatie om te onderzoeken of de virussen of fagen aan deeltjes binden of aggregaten vormen en daardoor in de pellet terecht komen
- Het supernatant na centrifugatie
- Het supernatant na concentratie met Centricon®

## **2.3 Bepaling van colifagen**

Colifagen zijn virussen die in staat zijn om de bacteriesoort *Escherichia coli* (*E. coli*) te infecteren. De bepaling van fagen wordt uitgevoerd door een mengsel te maken van het monster met vers gekweekte *E. coli* gastheercellen en agar. Dit mengsel wordt uitgegoten in een petrischaal die, nadat de agar gestold is, wordt geïncubeerd. Tijdens de incubatie zullen de aanwezige colifagen de *E. coli* cellen infecteren. Op de plaats van een geïnfecteerde *E. coli* cel zal een heldere zone (plaque) ontstaan in het bacteriedek doordat de fagen zich vermeerderen in de *E. coli* cellen en daarbij lysis van de *E. coli* cellen veroorzaken. Door de ontstane plaques te tellen kan de concentratie infectieuze faagdeeltjes in het monster bepaald worden. Deze concentratie wordt uitgedrukt in plaque vormende eenheden (PVE) per liter.

### **2.3.1 Bepaling van somatische colifagen**

Infectie van somatische colifagen vindt plaats door binding van het virus aan de celwand van *E. coli*, het virus dringt vervolgens de *E. coli* cel binnen en zal zich daar vermeerderen. De bepaling van somatische colifagen heeft plaats gevonden door gebruik te maken de ISO standaardmethode ISO 10705-2 waarbij de *E. coli* stam WG5 als gastheer is gebruikt (Anonymous, 2000).

### **2.3.2 Bepaling van F-specifieke (RNA-)colifagen**

F-specifieke (RNA-)fagen zijn fagen die RNA als genetisch materiaal hebben en gebruik maken van de F-pili van om de bacteriecel binnen te dringen en een infectie te veroorzaken. De bepaling van F-specifieke colifagen is uitgevoerd volgens standaardmethode ISO 10705-1, waarbij *Salmonella typhimurium* (WG49) als gastheer is gebruikt (Anonymous, 1995, Havelaar et al., 1993, Mooijman et al., 2002). In deze *Salmonella* stam is een plasmide aangebracht met hierop de genetische informatie voor F-pili van *E. coli*. De incubatie van de geïnfecteerde WG49 cellen in de agar wordt uitgevoerd in aan- en afwezigheid van RNase (enzym dat RNA afbreekt) aan de agar. F-specifieke fagen die RNA als genetisch materiaal hebben zullen zich niet vermeerderen in aanwezigheid van RNase. Het verschil tussen de aantallen fagen die gevonden worden in afwezigheid van RNase (DNA- en RNA-fagen) en de aantallen in aanwezigheid van RNase (DNA-fagen) geeft het aantal F-specifieke RNA-fagen weer.

## **2.4 Extractie van DNA en Q-PCR voor adenovirussen**

### **2.4.1 Extractie van DNA**

Voor de analyse van watermonsters, die zijn verkregen door concentratie van een groot volume water, is het toepassen van een extractiemethode, waarmee DNA kan worden geëxtraheerd met hoge opbrengst en hoge zuiverheid van groot belang. Daarom is voor dit onderzoek gekozen voor het gebruik van de "FastDNA Kit for soil" (Qbiogene). Toepassing van deze methode in diverse andere projecten heeft aangetoond dat met deze methode DNA met hoge opbrengst kan worden geëxtraheerd. Er is daarbij ook aangetoond dat het DNA dat met deze



methode wordt geëxtraheerd slechts weinig stoffen bevat die remming van het, bij PCR gebruikte, Taq-polymerase enzym kunnen veroorzaken waardoor slechts zeer weinig vals-negatieve reacties ten gevolge van geremde PCR-reacties optreden.

Bij deze methode wordt 300 µl van elk (geconcentreerd) watermonster in een buisje gebracht met hierin lysis buffer en glasparels. Dit mengsel wordt zeer krachtig geschud (beat-beating) waardoor de deeltjes in het monster worden gehomogeniseerd en de celwanden en/of celmembranen van de organismen (protozoa, bacteriën) of het kapsel (virussen) door een combinatie van fysische kracht en chemische inwerking van de lysis buffer worden kapot gemaakt. Door dit proces wordt (o.a.) het DNA uit de virussen vrijgemaakt. Nadat eiwitten zijn geprecipiteerd en verwijderd wordt het DNA uit het lysaat gezuiverd door het DNA in de suspensie op basis van lading te laten binden aan zeer fijne silica-deeltjes. Het aan de silica deeltjes gebonden DNA wordt een aantal malen "gewassen" waarna een gezuiverd DNA-preparaat aan de silica deeltjes gebonden blijft. Ten slotte wordt het DNA van de silica losgemaakt door de deeltjes in een buffer met een andere zoutsterkte en pH te brengen waardoor de lading van de DNA-moleculen veranderd en deze loslaten van de silica. Silica en vloeistof worden van elkaar gescheiden waarna er een gezuiverde DNA suspensie (met een volume van 100 µl) wordt verkregen die bruikbaar is voor PCR-analyses. Van deze DNA suspensie wordt 10 µl gebruikt in één PCR reactie.

#### **2.4.2 Q-PCR voor adenovirussen**

- *De adenovirus Q-PCR methode*

Met de Q-PCR techniek is het mogelijk om een kenmerkend fragment van het DNA van het te detecteren virus in korte tijd tot grote hoeveelheden te vermenigvuldigen en te kwantificeren. Voor deze vermenigvuldiging worden korte synthetische DNA moleculen (primers) gebruikt. De samenstelling (DNA-sequentie) van deze primers is zodanig gekozen dat deze primers slechts binden aan het DNA van adenovirus type 40 en 41. Na binding van de primers aan het adenovirus-DNA, wordt een enzymatische kettingreactie in gang gezet die verloopt onder invloed van wisseling van temperatuur. Bij Q-PCR wordt de vorming van het vermenigvuldigde DNA fragment al tijdens de PCR reactie gemeten (Real-Time) door gebruik te maken van lichtgevende synthetische DNA-moleculen (probes) die pas licht gaan geven indien het PCR fragment gevormd wordt. Doordat er een relatie is tussen het tijdstip waarop detectie van het gevormde fragment mogelijk is (CT-waarde) en de concentratie van het DNA fragment aan het begin van de reactie is met deze techniek ook kwantificatie mogelijk. Verdunningen van een DNA suspensie met bekende hoeveelheden van een plasmide waarin het PCR-fragment van adenovirus type 41 gekloneerd is, zijn gebruikt voor het genereren van een ijklijn.

Voor detectie van adenovirussen wordt een Q-PCR methode gebruikt waarmee een deel van het fiber gen wordt geamplificeerd. Een eerder beschreven methode (Jothikumar et al., 2005) heeft de basis gevormd voor de ontwikkeling van deze nieuwe methode in het BTO programma van 2006-2007. Met deze PCR methode worden alleen de humaan pathogene typen (serotype 40 en 41) gedetecteerd, deze adenovirus-typen zijn in staat om gastro-enteritis te veroorzaken.

De primers die gebruikt worden bij deze methode hebben de volgende DNA-sequentie:

- JTVFFb: CTTTCTCTCTT(A/C)ATAGACGCCC
- JTVFRb: GAGGGGGCTA(G/C)AAAACAAAA

De probe die gebruikt wordt om real-time detectie mogelijk te maken heeft de volgende DNA-sequentie:

- JTVpr: FAM5'-CGGGCACTCTTCGCCTTCAAAGTGC-3'BHQ-1

- *Remming en opbrengst*

Tijdens de extractie van het DNA uit de geconcentreerde watermonsters is aan de lysisbuffer bij elk monster een “gestandaardiseerd” DNA fragment toegevoegd (interne-controle, IC). Dit toegevoegde fragment kan middels Q-PCR gelijktijdig met de adenovirus Q-PCR analyses worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Analyse van deze interne controle geeft inzicht in de opbrengst van de DNA-extractie procedure en de mogelijke aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen. De opbrengst van het IC-DNA wordt middels Q-PCR gemeten en deze opbrengst wordt vervolgens gebruikt om de adenovirus metingen te corrigeren (voor opbrengst en remming). In deze studie was de gemiddelde opbrengst van de IC 39% (range: 13-111%).

Van alle monsters is in duplo de adenovirus concentratie bepaald. Ook zijn 10-voudige verdunningen van het DNA geanalyseerd op de aanwezigheid van adenovirus.

## 2.5 Detectiegrenzen van de methoden

Vanwege de verschillende opwerkingsstappen worden er verschillende detectiegrenzen verkregen voor de verschillende methoden. Bovendien variëren de detectiegrenzen ook van monster tot monster doordat er enige variatie is tussen de monstervolumes na de hemoflow- of centrifugatie-stap. Echter, op basis van de volumes zoals die vermeld zijn in figuur 1 zijn de volgende detectiegrenzen te hanteren (Tabel 2).

Tabel 2. De detectiegrenzen van de toegepaste methoden

	Direct		Na hemoflow (bij volume: 400-600 ml)		Na centrifugatie (bij volume: 6-30 ml)		
	Geanalyseerd Volume (Max)	Detectie Grens (Min)	Geanalyseerd Volume (Max)	Detectie Grens (Min)	Geanalyseerd Volume (Max)	Detectie Grens (Min)	
<b>Somatische fagen F-specifieke fagen</b>	10 ml	100	1 l	1	50 l	0.02	PVE/1
<b>Adenovirussen</b>	30 µl	3.3E+04	2,5-3,8 ml	2,6E+02- 4,0E+02	50-250 ml	4-20	DNA kopieën/l



## 3 Resultaten

### 3.1 Opbrengst van de hemoflow- en centricon concentratiemethoden

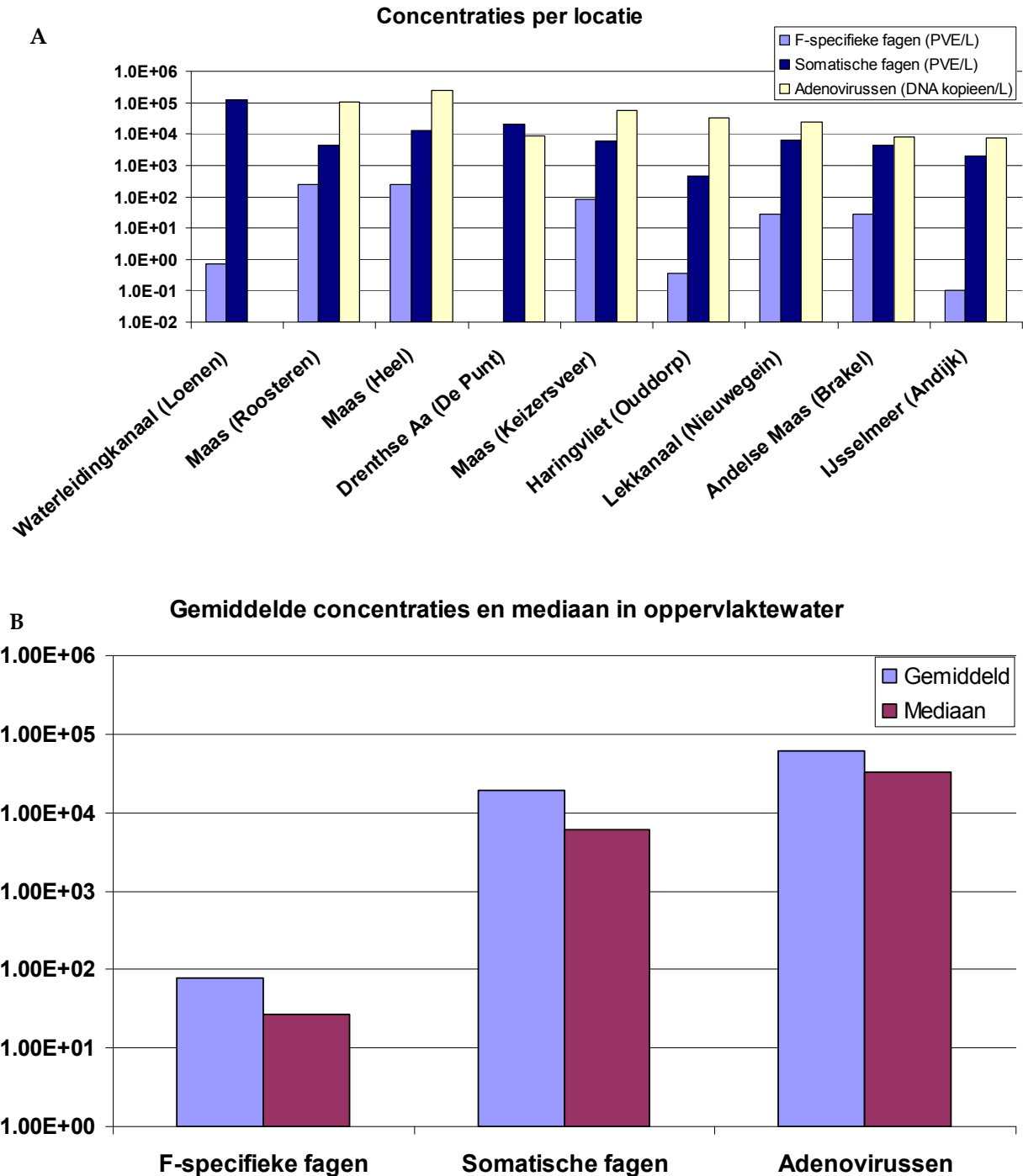
Uit eerder onderzoek (Veenendaal, 2007), is gebleken dat de opbrengst van fagen hoog is bij gebruik van de hemoflow- en centriconfilters. Ook in dit onderzoek zijn de opbrengsten van deze concentratiestappen onderzocht. Dit was mogelijk bij een aantal monsters, waarbij metingen zowel voor- als na de concentratiestap betrouwbaar mogelijk waren (doordat de concentratie hoog genoeg was). De concentraties F-specifieke RNA fagen was in alle monsters te laag om de opbrengsten van de concentratiestappen te kunnen meten. En, doordat met de adenovirus PCR methode een kleiner monstervolume wordt onderzocht, en daardoor de detectiegrens van deze methode hoger is, was het ook niet mogelijk om de opbrengsten van de concentratiestappen met de adenovirus PCR te bepalen. Daarom zijn de opbrengsten van de concentratiestappen bepaald met de resultaten van de metingen van somatische fagen (tabel 3). De opbrengst van de hemoflow- en centriconstap is in deze onderzochte monsters hoog en vergelijkbaar met de opbrengsten die eerder gevonden zijn (Veenendaal, 2007).

Tabel 3. De opbrengst van de verschillende concentratiestappen van somatische fagen voor een deel van de onderzochte monsters.

Nr.	Direct (PVE/l)	Na hemoflow (PVE/l)			Opbrengst Hemoflow	Na centricon (PVE/l)	Opbrengst Centricon	Opbrengst hemoflow + centricon
		supernatant	Pellet	Sup + pellet				
<b>Somatische fagen</b>								
M090036	9.7E+03	6.4E+03	<0,1	6.4E+03	62%	5.4E+03	84%	55%
M090072	6.7E+03	4.2E+03	<0,1	4.2E+03	63%	5.8E+03	138%	87%
M090073	2.2E+03	2.1E+03	<0,1	2.1E+03	95%	9.9E+02	47%	45%
M090139	---	1.5E+03	4.6E+02	2.0E+03	---	1.2E+03	60%	---
M090140	---	5.2E+02	9.6E+00	5.3E+02	---	4.6E+02	87%	---
Gemiddeld					73%	Gemiddeld	83%	62%

### 3.2 Colifagen en adenovirussen in het oppervlaktewater

De concentraties F-specifieke RNA-fagen, somatische colifagen en adenovirussen zijn onderzocht in monsters die zijn genomen in het oppervlaktewater dat dient als grondstof voor de productie van drinkwater bij negen verschillende productielocaties. Zoals weergegeven in figuur 1, zijn verschillende fracties zoals verkregen bij de verschillende concentratiestappen, afzonderlijk geanalyseerd. Na de concentratiestap met het hemoflow filter zijn de geconcentreerde oppervlaktewater monsters eerst gecentrifugeerd om de grotere deeltjes uit het concentraat te verwijderen. Bij deze fase zijn de pellet en het supernatant van de centrifugatiestap apart geanalyseerd, de som van deze beide meetwaarden vormt daarbij de concentratie van de virussen in het oppervlaktewater. De resultaten van deze metingen zijn samengevat in figuur 2A.



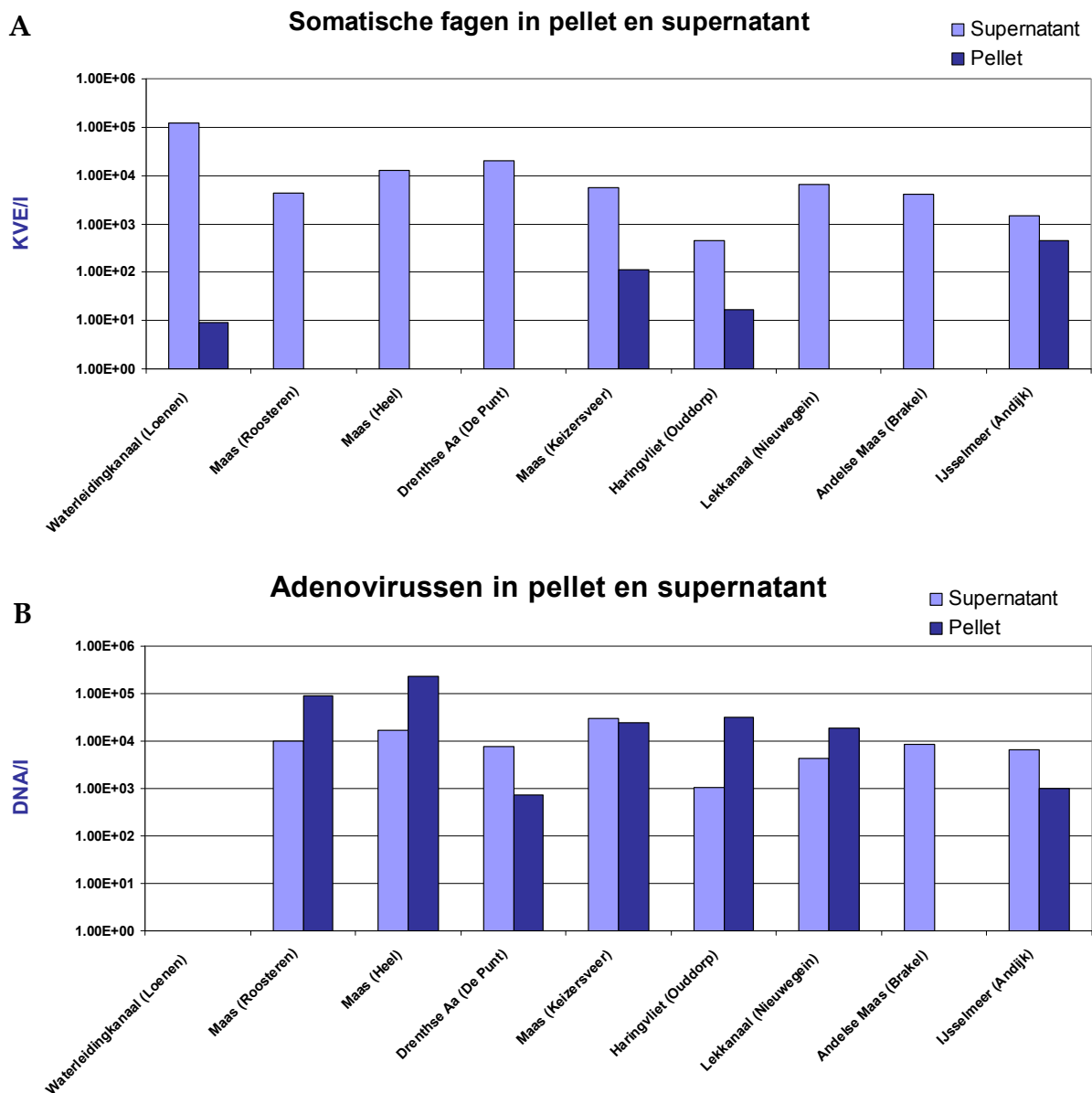
Figuur 2. Concentraties van F-specifieke-, somatische colifagen en adenovirussen in oppervlaktewater. Figuur A geeft de concentraties per locatie weer. Figuur B geeft de gemiddelde concentraties en de mediaan van de concentraties F-specifieke RNA fagen, Somatische colifagen en adenovirussen in alle oppervlaktewatermonsters weer. De concentraties F-specifieke RNA fagen en Somatische colifagen zijn weergegeven als PVE/l (plaque vormende eenheden), de concentraties adenovirussen als DNA kopieën/l.

Somatische colifagen zijn in al de onderzochte oppervlaktewatermonsters gedetecteerd, F-specifieke RNA fagen zijn op alle locaties waargenomen, behalve in de Drentsche Aa. Adenovirussen zijn op alle locaties aangetroffen, behalve in het Waterleidingkanaal.

Figuur 2B, waarin de gemiddelde concentraties en de mediaan van de concentraties zijn weergegeven, maakt duidelijk dat de concentraties infectieuze F-specifieke RNA fagen duidelijk lager zijn dan de concentraties infectieuze somatische fagen en de concentratie adenovirus-DNA. De concentraties adenovirus-DNA, zijn enigszins hoger dan de concentraties infectieuze somatische fagen.

Het is daarbij opvallend dat alleen in het water van het Waterleidingkanaal (Loenen) geen adenovirussen zijn aangetroffen terwijl in dit water de concentratie somatische fagen hoog is. De controles, die zijn uitgevoerd om de kwaliteit van de meting te waarborgen geven geen aanleiding te denken dat een technisch probleem aan de basis heeft gelegen van deze opmerkelijke meetwaarde. Mogelijk speelt de aard van de locatie (of het moment) met weinig tot geen fecale verontreiniging van humane oorsprong een rol.

Na centrifugatie zijn aparte analyses uitgevoerd voor pellet (gebonden virus) en supernatant (vrij virus). Hieruit bleek dat in veel monsters de somatische colifagen en vooral adenovirussen ook in de pellet terecht kwamen. In figuur 3 zijn, per oppervlaktewatermonster, de resultaten van de aparte analyses van pellet en supernatant weergegeven. Vanwege de lage concentraties F-specifieke RNA fagen in zowel pellets als supernatant zijn deze virussen in deze analyse verder buiten beschouwing gelaten.



Figuur 3. Verdeling van de concentraties van Somatische colifagen (A) en adenovirussen (B), afkomstig uit oppervlaktewatermonsters, over de pellet en het supernatant na de centrifugatiestap (na de hemoflow) bij het concentreren van de monsters.

De figuur maakt duidelijk dat van vier monsters een klein deel van de somatische fagen na centrifugatie terecht komt in de pellet (de gemiddelde concentratie is in het supernatant ca. 300X hoger). Voor de adenovirussen geldt daarentegen dat bij de meeste monsters (7), na centrifugatie, een groot deel van de adenovirussen terecht komt in de pellet (de gemiddelde concentratie is in de pellet ca. 5X hoger). Bij een aantal monsters is de concentratie adenovirussen die terecht komt in de pellet dus hoger dan de concentratie adenovirussen die terecht komt in het supernatant. Waarschijnlijk is dit het gevolg van binding van adenovirussen aan deeltjes in het monster, deeltjes die na centrifugatie in de pellet terecht komen en zorgen voor hoge concentraties adenovirussen in de pellet. Dit is van belang voor zowel de detectiemethoden als de verwijdering van Adenovirussen in de zuivering.

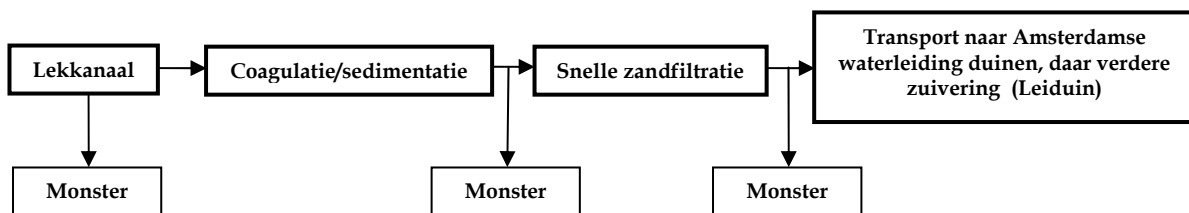
### 3.3 Effectiviteit van de zuivering voor de reductie van de concentratie fagen en adenovirussen

Bij verschillende productiebedrijven zijn metingen uitgevoerd van somatische colifagen, F-specifieke RNA-fagen en adenovirussen voor en na zuiveringsstappen. Dat geeft een indruk over de bruikbaarheid van deze parameters om de effectiviteit van de zuivering voor de reductie van de concentratie virussen te kunnen bestuderen en een eerste indicatie van de effectiviteit van de verschillende zuiveringsstappen. De metingen zijn per productiebedrijf eenmalig uitgevoerd, zodat over de effectiviteit van zuiveringsprocessen geen harde conclusies kunnen worden getrokken.

De concentraties F-specifieke RNA fagen die werden gemeten in het ruwe oppervlaktewater waren te laag om een reductie van de concentratie in de zuivering te kunnen waarnemen, de resultaten van deze faagmetingen zijn daarom in dit deel van het rapport verder buiten beschouwing gelaten. De resultaten van de metingen van somatische colifagen en adenovirussen zijn beschreven per productiebedrijf.

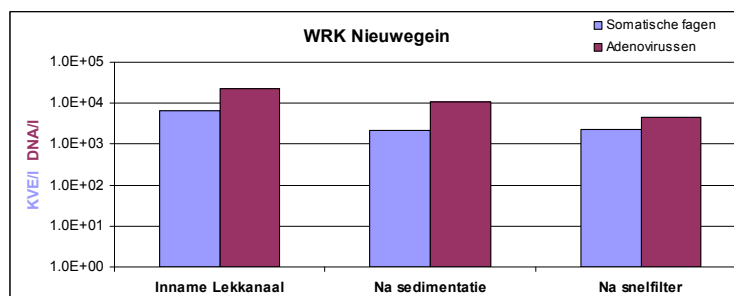
#### 3.3.1 WRK (Lekkanaal, Nieuwegein)

Bij de voorzuivering van de WRK in Nieuwegein (figuur 4) wordt water uit het Lekkanaal ingenomen. Aan dit water wordt ijzerchloride toegevoegd waardoor coagulatie van de in het water aanwezige deeltjes plaats vindt. Een groot deel van deze deeltjes zal door sedimentatie verwijderd worden. Een deel van de overgebleven deeltjes wordt vervolgens verwijderd door snelle zandfilters. Na toevoeging van Natronloog wordt het voorgezuiverde water getransporteerd naar de Amsterdamse waterleidingduinen waar het door duinpassage en door zuiveringsstappen bij productiebedrijf Leiduin verder gezuiverd wordt.



Figuur 4. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water uit het Lekkanaal bij Nieuwegein en een weergave van de monsterlocaties voor dit onderzoek.

De concentraties somatische fagen en adenovirussen zijn bepaald in het ruwe water van het Lekkanaal, in het water na sedimentatie en het water na snelfiltratie. Na de hemoflow concentratiestap zijn, na centrifugatie, zowel de pellet als het supernatant gebruikt voor de meting van adenovirus en somatische colifagen. Uit deze analyses blijkt dat zowel in de pellet als in het supernatant virusdeeltjes aanwezig zijn, de som van beide fracties is weergegeven in figuur 5.



Figuur 5. Schematische weergave van de concentraties somatische colifagen en adenovirussen zoals die zijn gemeten in de monsters van de voorzuivering in Nieuwegein.

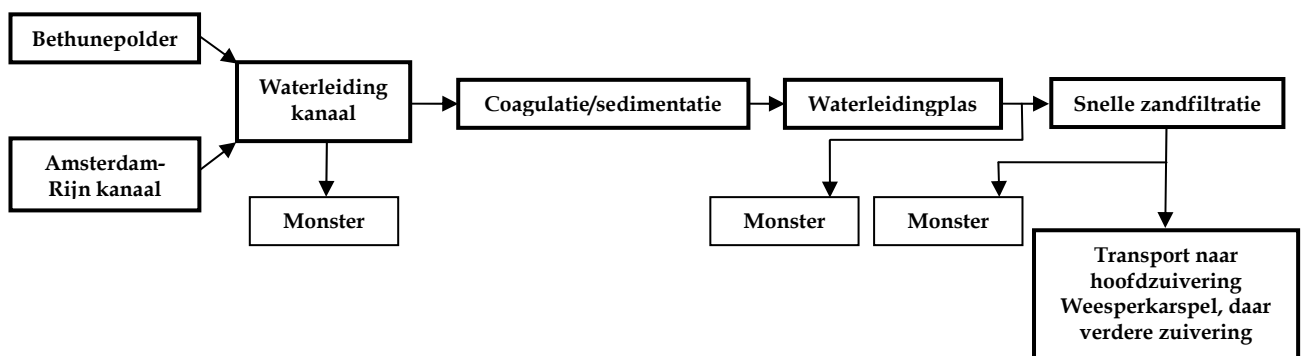


Uit de metingen blijkt dat:

1. Adenovirussen en somatische fagen in hoge concentraties voorkomen in het Lekkanaal.
2. Na coagulatie/sedimentatie zijn de concentraties van beide virustypen nog steeds hoog.
3. Na snelfiltratie zijn de concentraties adenovirussen en somatische fagen niet afgenomen.
4. De totale reductie van de concentratie door coagulatie gevolgd door snelfiltratie is 0,5 log voor somatische fagen en 0,7 log voor adenovirussen. De drie monsters waarop de berekening van de reductie is gebaseerd zijn niet afkomstig uit een zogenaamde "fliessende Welle".

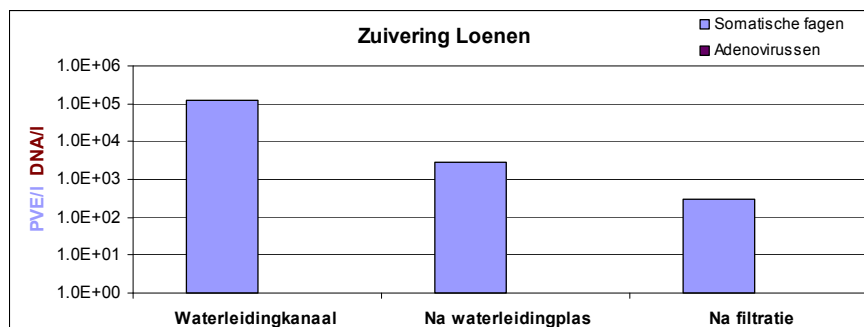
### 3.3.2 Waternet (Loenen)

Bij de voorzuivering in Loenen (figuur 6) wordt water ingenomen vanuit de Bethunepolder via het Waterleidingkanaal (en soms het Amsterdam-Rijnkanaal). Aan dit water wordt ijzerchloride toegevoegd waardoor coagulatie plaats vindt. Na bezinking van de deeltjes wordt het water aangezuurd en komt het in de Waterleidingplas, waar de gemiddelde verblijftijd ca. 100 dagen is. Aansluitend wordt het water gefilterd door snelle zandfiltratie en wordt het water getransporteerd naar de hoofdzuivering van Weesperkarspel waar het water verder gezuiverd wordt.



Figuur 6. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water in de voorzuivering in Loenen en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek.

De concentraties somatische fagen en adenovirussen zijn bepaald (figuur 7) in het ruwe water van het Waterleidingkanaal, na coagulatie/sedimentatie en de Waterleidingplas en na de snelle zandfilters. Zoals eerder vermeld (2.1) zijn in het Waterleidingkanaal geen adenovirussen gedetecteerd. Er werden ook geen adenovirussen gedetecteerd in de monsters na de Waterleidingplas. Somatische colifagen werden, met afnemende concentraties, gedetecteerd in het waterleidingkanaal, na de waterleidingplas en ook nog na de snelle zandfilters.



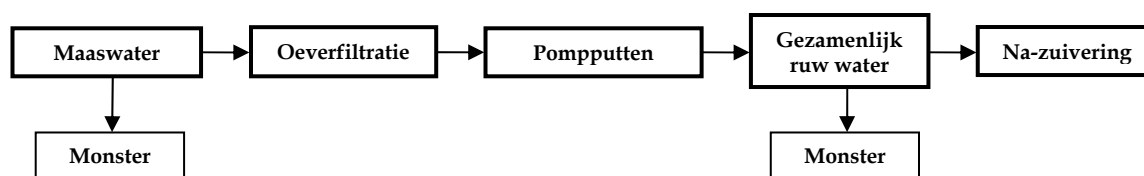
Figuur 7. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond na de verschillende zuiveringsstappen bij de voorzuivering in Loenen.

Uit de metingen van somatische colifagen en adenovirussen blijkt dat:

1. Er geen adenovirussen detecteerbaar zijn in het Waterleidingkanaal en na de zuiveringsstappen (Waterleidingplas en snelle zandfiltratie)
2. Somatische colifagen in hoge concentraties voorkomen in het Waterleidingkanaal
3. De concentraties somatische colifagen lager zijn in het water van de Waterleidingplas en nog lager na de snelle zandfilters
4. De totale reductie van de concentratie somatische fagen is 2,6 log waarvan een reductie van 1,6 log tussen het ruwe water en het water na coagulatie/sedimentatie en na verblijf in de Waterleidingplas en een reductie van 1,0 log na het proces van snelle zandfiltratie. De drie monsters waarop de berekening van de reductie is gebaseerd zijn niet afkomstig uit een zogenaamde "fliessende Welle".

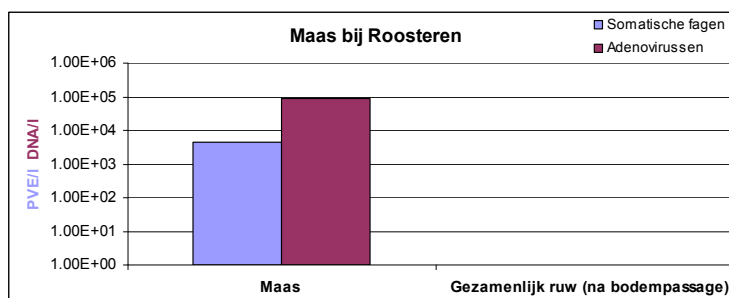
### 3.3.3 WML (Maas bij Roosteren)

Bij de winning in Roosteren (figuur 8) wordt Maaswater voorgezuiverd via oeverfiltratie en daarna verder gezuiverd.



Figuur 8. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water van de Maas bij Roosteren en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek.

De concentraties somatische colifagen en adenovirussen zijn bepaald in het Maaswater en, na oeverfiltratie, in het gezamenlijk ruw water (figuur 9).



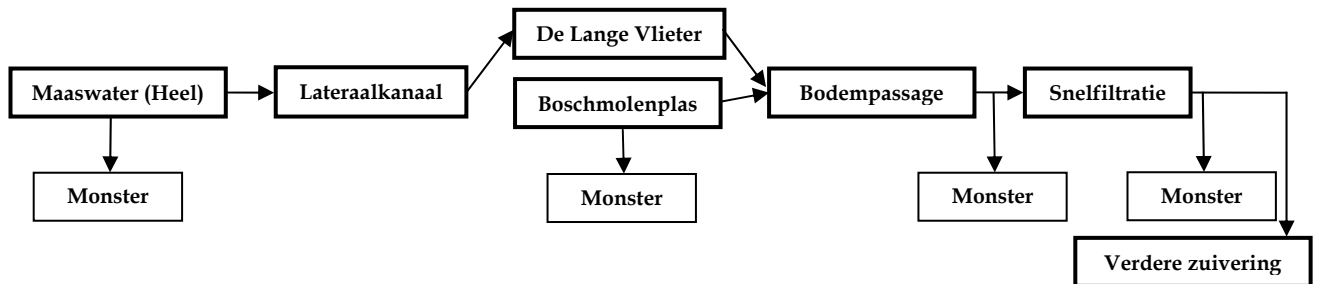
Figuur 9. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in het Maaswater in Roosteren en na bodempassage.

Uit de metingen van somatische colifagen en adenovirussen blijkt dat:

- De concentratie adenovirussen in het ruwe Maaswater hoog is en hoger dan de concentratie somatische colifagen.
- Zowel adenovirussen als somatische colifagen na oeverfiltratie niet meer aantoonbaar zijn.
- De verhouding tussen Maaswater en grondwater is variabel zodat niet direct de effectiviteit van oeverfiltratie bepaald kan worden maar. Indien in de gemeten situatie 100% Maaswater via de oever wordt gefiltreerd zou de effectiviteit minimaal 3.6 log voor somatische colifagen en minimaal 5 log voor adenovirussen bedragen. De twee monsters waarop de berekening van de reductie is gebaseerd zijn niet afkomstig uit een zogenaamde "fliessende Welle".

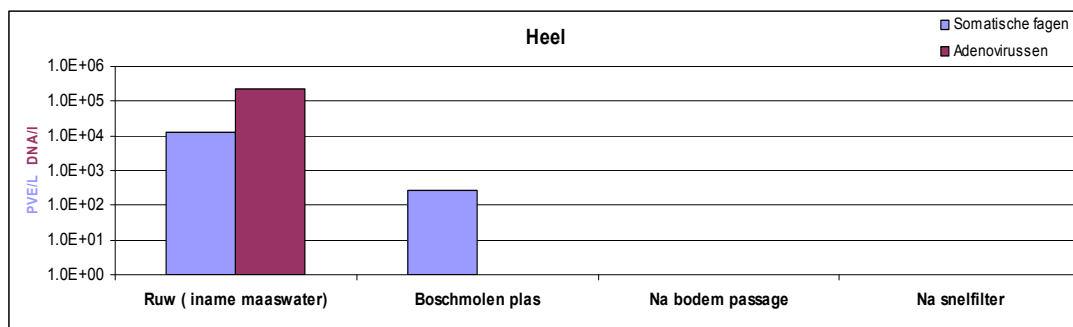
### 3.3.4 WML (Maas bij Heel)

Het ruwe Maaswater wordt door WML bij Heel ingenomen uit het Lateraalkanaal (bij Beegden) en via een analysebekken opgeslagen in grindplas "De Lange Vlieter" met een gemiddelde verblijftijd van 1,5 jaar. Als calamiteitsvoorziening kan de inname uit het Lateraalkanaal worden gestopt en water uit de naast De Lange Vlieter gelegen Boschmolenplas worden ingenomen. Na bodempassage en snelfiltratie wordt het water verder gezuiverd tot drinkwater.



Figuur 10. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water van de Maas bij Heel en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek.

De concentratie somatische colifagen en adenovirussen is bepaald in het ruwe Maaswater, in het water van de Boschmolen plas<sup>1</sup> en na bodempassage en na snelfiltratie.



Figuur 11. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in het Maaswater bij Heel en na de eerste zuiveringstappen.

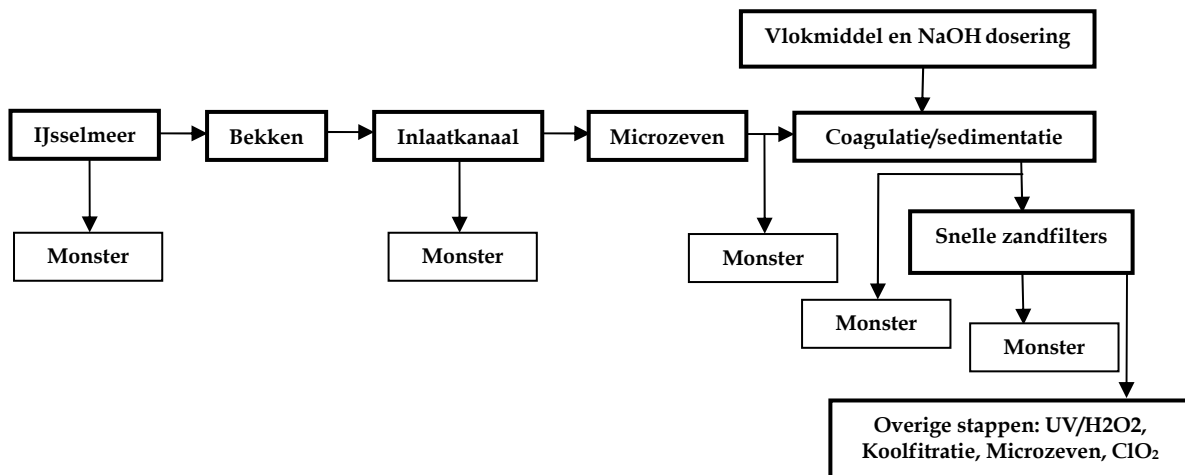
Uit de metingen blijkt dat:

1. De concentraties somatische fagen hoog zijn in het Maaswater. De concentraties adenovirussen zijn nog hoger.
2. In de Boschmolenplas worden wel somatische fagen maar geen adenovirussen aangetroffen.
3. Na bodempassage zijn geen somatische fagen en adenovirussen meer detecteerbaar.
4. De reductie van de concentratie somatische fagen is groter dan 4,1 log en voor adenovirussen meer dan 5,4 log na verblijf in het spaarbekken (de Lange Vlieter) gevolgd door bodempassage. De twee monsters waarop de berekening van de reductie is gebaseerd zijn niet afkomstig uit een zogenaamde "fliessende Welle".

<sup>1</sup> NB. Om het effect van verblijf in het spaarbekken te meten was het de bedoeling geweest om het water van "De Lange Vlieter" te bemonsteren, door een misverstand is een monster van het water van de Boschmolen plas genomen en geanalyseerd.

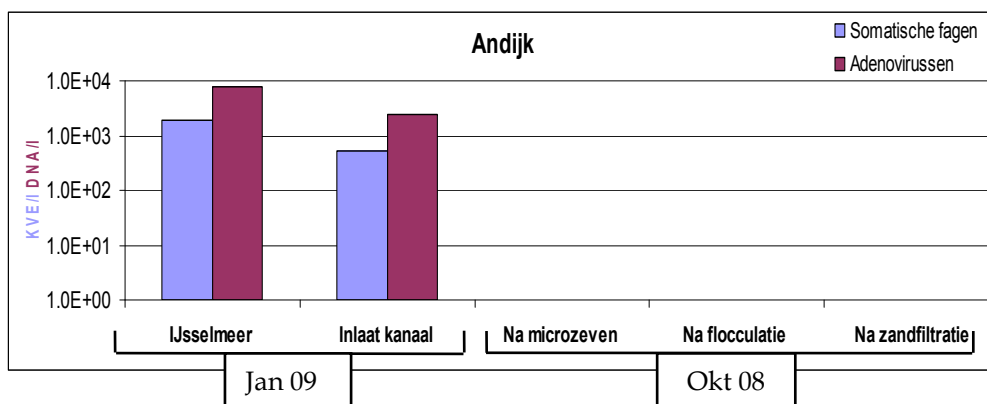
### 3.3.5 PWN (Andijk)

Bij de productielocatie Andijk (figuur 12) wordt water uit het IJsselmeer ingenomen. Dit water verblijft, na toevoeging van natronloog, ongeveer 40 dagen in een mengbekken. Na het bekken wordt het water via het inlaatkanaal getransporteerd naar ruwwatermicrozeven om grove deeltjes te verwijderen. Na de microzeven komt het water in mengbakken, waar vlokmiddel en natronloog wordt toegevoegd. De vlokken worden van het water gescheiden in flocculatoren en vervolgens worden kleinere deeltjes uit het water gehaald door snelle zandfiltratie. Tenslotte worden additionele desinfectie- en oxidatie- (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en zuiveringsstappen (koolfiltratie, microzeven, chloordioxide) toegepast alvorens het water wordt gedistribueerd.



Figuur 12. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water van het IJsselmeer bij Andijk en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek .

Somatische colifagen en adenovirussen werden gemeten in het IJsselmeerwater, in het water van het inlaatkanaal, na de microzeven, na coagulatie/sedimentatie en na de snelle zandfilters. Echter, tijdens het opwerken van de monsters (in oktober 2008) traden er technische problemen op met het hemoflow systeem waardoor het IJsselmeer monster en het monster van het inlaatkanaal verloren zijn gegaan. Deze beide monsters zijn in januari 2009 opnieuw geanalyseerd, maar toen was het niet mogelijk om ook de andere monsters in de reeks opnieuw te analyseren. Hierdoor is, op basis van de monsters van januari 2009, alleen de afname van somatische colifagen en adenovirussen te bepalen ten gevolge van het verblijf in het bekken. In de monsters van oktober werden geen somatische colifagen of adenovirussen aangetoond.



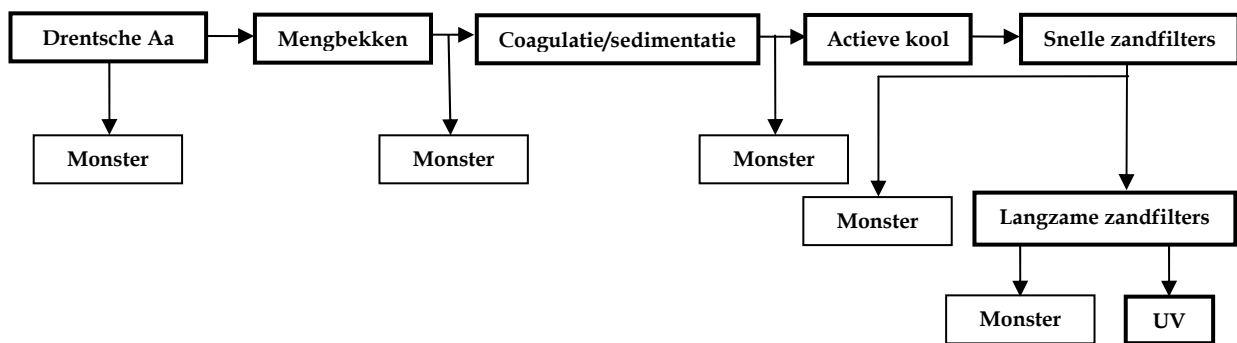
Figuur 13. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in het IJsselmeerwater bij Andijk en na de eerste zuiveringstappen.

Uit de metingen blijkt:

1. Adenovirussen en somatische fagen in januari worden aangetoond in het IJsselmeer en in het inlaatkanaal. De concentratie adenovirussen is hoger dan de concentratie somatische colifagen.
2. Er worden in oktober geen adenovirussen en somatische fagen gedetecteerd in de monsters die zijn genomen na de microzeven, na flocculatie en na zandfiltratie.
3. De reductie van de concentratie virussen die wordt waargenomen t.g.v. het verblijf in het mengbekken bedraagt 0,6 log voor somatische fagen en 0,5 log voor adenovirussen.

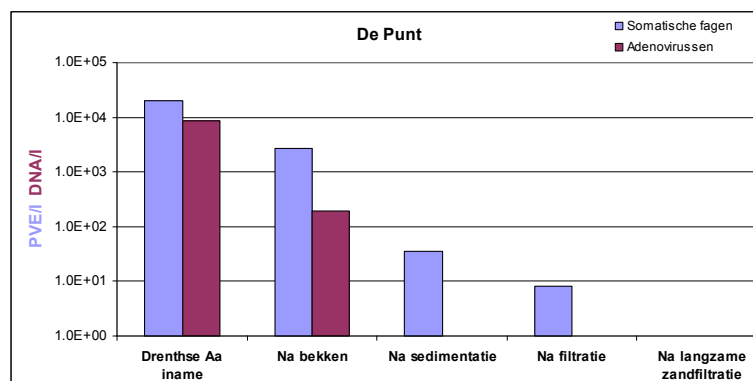
### 3.3.6 Groningen (De Punt)

Bij de productielocatie "De Punt" (figuur 14) wordt zowel rivierwater als grondwater gebruikt voor de productie van drinkwater. Rivierwater wordt onttrokken uit de Drentsche Aa, dit water verblijft ca. 60 dagen in een mengbekken en wordt vervolgens gezuiverd via coagulatie/sedimentatie. Na actieve koolfiltratie en snelle zandfiltratie wordt het water nog gezuiverd door toepassing van langzame zandfiltratie. Ten slotte vindt desinfectie plaats door toepassing van UV.



Figuur 14. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water van de Drentsche Aa bij de Punt (Groningen) en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek.

De virusconcentraties zijn gemeten in de Drentsche Aa, in het water na het mengbekken, na coagulatie/sedimentatie, na actieve kool en snelle zandfiltratie en na langzame zandfiltratie. Een samenvatting van de resultaten van deze metingen is weergegeven in figuur 15.



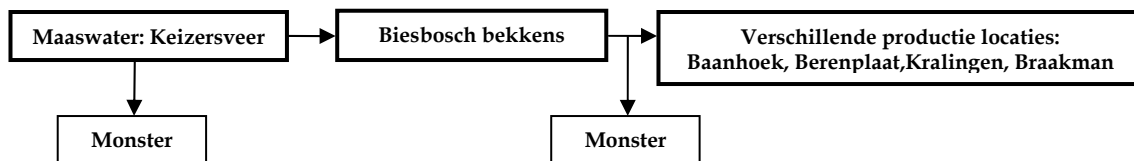
Figuur 15. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in het van de Drentsche Aa bij De Punt en na de verschillende zuiveringsstappen bij productiebedrijf De Punt.

Uit de metingen blijkt dat:

1. De concentraties somatische fagen en adenovirussen hoog zijn in de Drentsche Aa
2. Na verblijf in het bekken zijn somatische fagen en adenovirussen nog steeds meetbaar. De concentratie adenovirussen is meer afgenomen (1,6 log) dan de concentratie somatische fagen (0,9 log).
3. Na coagulatie/sedimentatie is de concentratie adenovirussen gedaald tot beneden de detectiegrens van de methode (een reductie van >2 log). Somatische colifagen zijn nog steeds meetbaar (een reductie van 1,9 log).
4. Na de snelle zandfilters zijn de somatische colifagen nog meetbaar, de concentratie is opnieuw afgenomen (reductie van 0,6 log).
5. Na langzame zandfiltratie zijn ook geen somatische colifagen meer meetbaar (een reductie van >0,9 log).

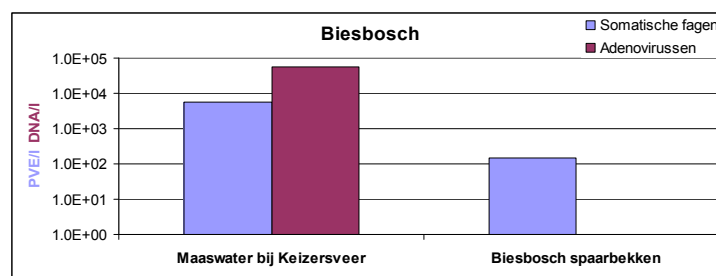
### 3.3.7 Evides (Biesbosch)

Oppervlaktewater uit de Maas vormt de grondstof voor een groot deel van het drinkwater dat wordt geproduceerd door Evides. Het Maaswater wordt ingenomen en vervolgens getransporteerd (figuur 16) naar de drie spaarbekkens in de Brabantse Biesbosch. Na een gemiddelde verblijftijd in deze bekkens van ca. 150 dagen wordt het water verder getransporteerd naar vier verschillende productielocaties (Baanhoek, Berenplaat, Kralingen en Braakman) waar het water verder wordt gezuiverd.



Figuur 16. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen Maaswater bij Keizersveer en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek.

De concentraties somatische colifagen en adenovirussen zijn gemeten in het Maaswater (Keizersveer) en in het water na de Biesboschbekkens, de resultaten zijn samengevat in figuur 17.



Figuur 17. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in het Maaswater bij Keizersveer en na de Biesbosch spaarbekkens.

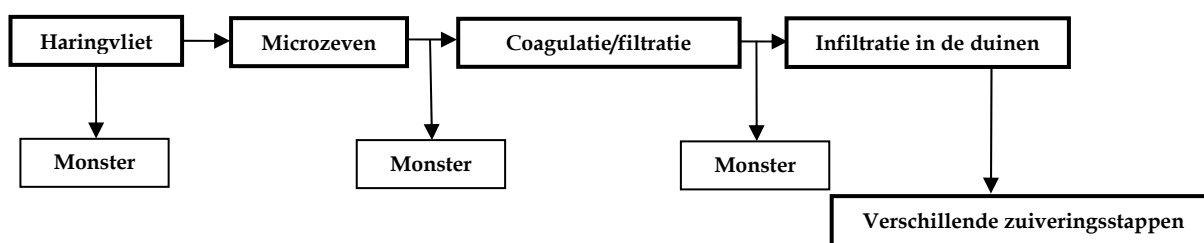
Uit de metingen blijkt dat:

1. De concentraties somatische fagen en adenovirussen hoog zijn in het Maaswater. Net als in Limburg zijn de concentraties Adenovirussen hoger dan somatische colifagen.
2. Na de Biesboschbekkens worden geen adenovirussen meer aangetoond maar nog wel somatische fagen.

3. Op basis van deze eenmalige metingen zou de reductie van de concentratie somatische fagen door verblijf in het spaarbekken 1,6 log zijn en de reductie van de concentratie adenovirussen >4,7 log.
  - Overigens zijn er bij een eerdere meting in 1996 wel adenovirussen in het Biesboschwater aangetoond.

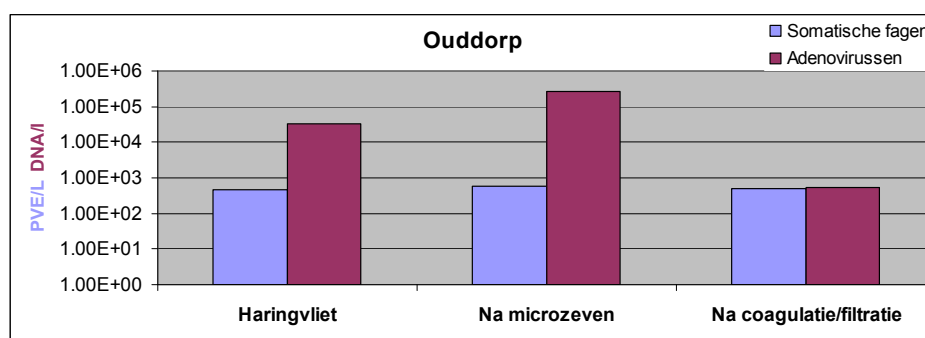
### 3.3.8 Evides (Ouddorp)

Bij pompstation Ouddorp wordt water uit het Haringvliet en natuurlijk grondwater uit de duinen als grondstof voor de productie van drinkwater gebruikt. Het ingenomen water uit het Haringvliet wordt eerst voorgezuiverd om de hoeveelheid slib te verminderen. De mosselen worden uit het water verwijderd en vervolgens passeert het water microzeven waarmee het grootste deel van het slib en de algen wordt verwijderd. Daarna vindt coagulatie/filtratie plaats en wordt het voorgezuiverde water in de duinen geïnfiltrerd. Na duinpassage wordt het water opgepompt en, via verschillende stappen, verder gezuiverd.



Figuur 18. Schematisch overzicht van de voor-zuiveringsstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water van het Haringvliet bij Ouddorp en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek.

De concentratie somatische colifagen en adenovirussen zijn bepaald in het ruwe water (Haringvliet), na de microzeven en na de coagulatie/filtratie-stap. De resultaten van deze metingen zijn samengevat in figuur 19.



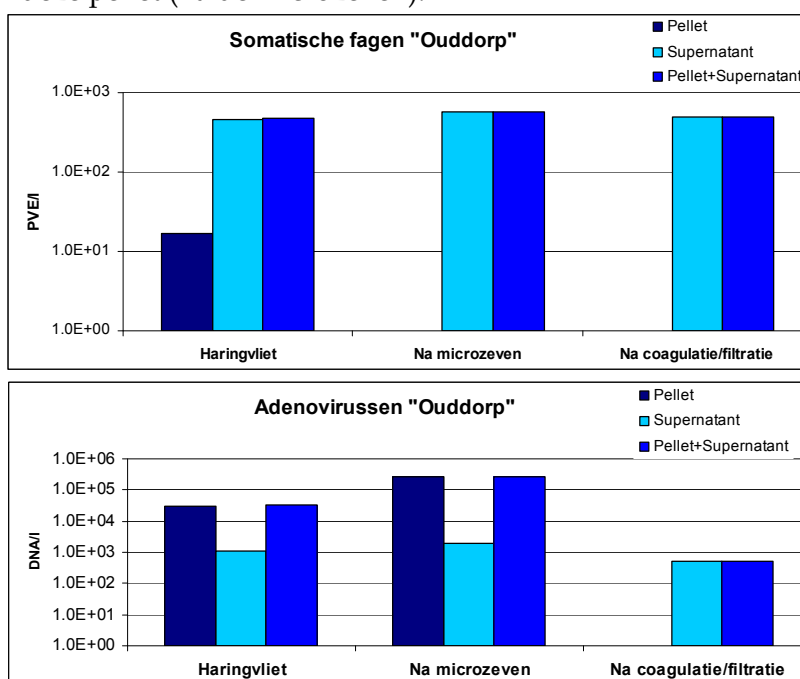
Figuur 19. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in het Haringvliet bij Ouddorp en na de verschillende (voor-)zuiveringsstappen.

Uit de metingen blijkt dat:

1. In het water van het Haringvliet de concentraties somatische colifagen en adenovirussen hoog zijn. De concentratie adenovirussen is beduidend hoger dan de concentratie somatische colifagen.
2. De microzeven hebben geen invloed op de concentratie somatische colifagen, de concentratie adenovirussen lijkt toe te nemen door filtratie met microzeven.
3. Coagulatie/filtratie heeft in deze zuivering geen invloed op de concentratie somatische colifagen maar zorgt wel voor afname van de concentratie adenovirussen.

- Microzeven zorgen in deze zuivering niet voor een reductie van de concentratie somatische fagen en adenovirussen. Het coagulatiefiltratieproces heeft wel invloed op de concentratie adenovirussen (een reductie van 2,7 log).

De metingen van de adenovirussen laten een toename zien van de gemeten adenovirus concentraties in het monster na de microzeven. Door de coagulatiefiltratie stap neemt de concentratie adenovirussen vervolgens weer af. De toename van de concentratie adenovirussen na de microzeven is verrassend, het is namelijk niet mogelijk dat deze (humane) adenovirussen zich in het milieu vermeerderen. Het is daarbij ook opvallend dat vrijwel alle gedetecteerde adenovirussen, in zowel het Haringvliet water als het water na de microzeven, worden aangetoond in de pellet (figuur 20). Somatische colifagen werden in lage concentraties in de pellet van het geconcentreerde Haringvlietwater aangetoond, na de microzeven werden geen somatische colifagen meer in de pellet aangetoond. Kennelijk gedragen adenovirussen zich anders dan somatische colifagen in deze geconcentreerde watermonsters. Mogelijk binden adenovirussen aan deeltjes in het water. Mogelijk dat deze aggregaten grotere variatie in de metingen kunnen veroorzaken wat de schijnbare adenovirus toename na de microzeven kan verklaren. De adenovirus toename manifesteert zich ook uitsluitend in het pellet en niet in het supernatant (figuur 20). Een andere verklaring zou kunnen zijn dat ophoping van gebonden adenovirussen op de microzeven optreedt. Mogelijk dat vervolgens een deel van deze deeltjes (met hieraan adenovirussen) de microzeven passeren, deze deeltjes zullen tijdens de centrifugestap in de pellet terecht kunnen komen en zorgen voor hoge concentraties adenovirussen in deze pellet (na de microzeven).



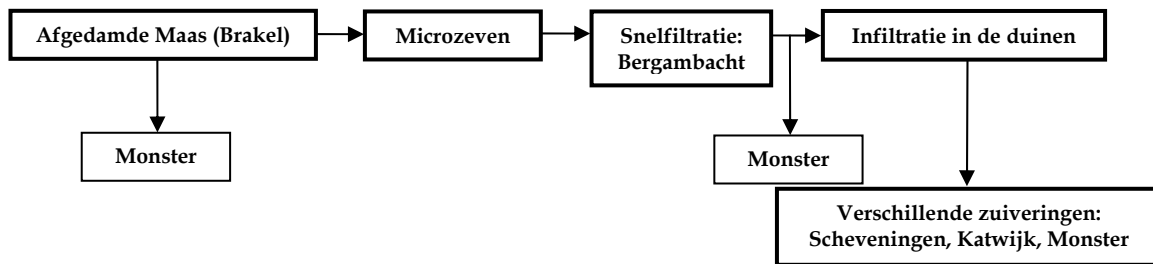
Figuur 20. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in de pellet en in het supernatant na de centrifugestap in de toegepaste opwerkprocedure van de monsters.

### 3.3.9 DZH (Afgedamde Maas)

Rivierwater, dat wordt ingenomen uit de Afgedamde Maas bij Brakel, wordt door DZH als grondstof voor de productie van drinkwater gebruikt (figuur 21). Er is weinig stroming in deze zijarm van de Maas waardoor het water hier lang verblijft (gemiddeld ca. 2 maanden) en slibdeeltjes bezinken. Na inname wordt het water eerst gefiltreerd met microzeven en vervolgens getransporteerd naar Bergambacht. In Bergambacht passeert het water snelfilters waarna het naar de duinen (tussen Monster en Katwijk) wordt gepompt. In de duinen

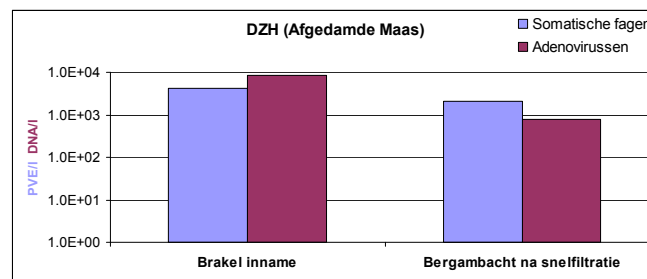


ondergaat het water duinpassage, na de duinpassage vinden bij drie verschillende zuiveringen (Scheveningen, Katwijk en Monster) nog diverse zuiveringsstappen plaats.



Figuur 21. Schematisch overzicht van de zuiveringstappen zoals die worden toegepast op het ingenomen water van de afgedamde Maas bij Brakel en een weergave van de monsterlocaties die gebruikt zijn voor dit onderzoek.

Voor de analyse van somatische colifagen en adenovirussen zijn er monsters genomen van het ruwe water uit de Afgedamde Maas en na de snelfiltratie in Bergambacht. De analysesresultaten zijn samengevat in figuur 22.



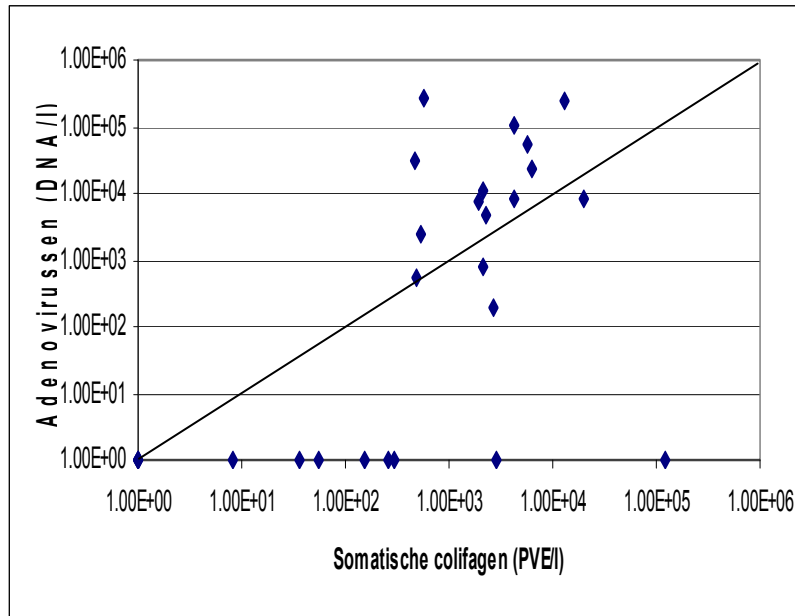
Figuur 22. De concentraties adenovirussen en somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in het ruwe water van de afgedamde Maas bij Brakel en na de snelfiltratiestap bij Bergambacht.

Uit de metingen blijkt dat:

1. In het ruwe water van de Afgedamde Maas hoge concentraties somatische fagen en adenovirussen aantoonbaar zijn.
2. Somatische colifagen en adenovirussen nog steeds aantoonbaar zijn na snelfiltratie
3. Deze eenmalige metingen laten een reductie van de concentratie somatische colifagen zien van 0,3 log, en een reductie van de concentratie adenovirussen van 1,0 log tussen het ruwe Maaswater en het water na microzeven en snelfiltratie.

### 3.4 De verhouding tussen somatische colifagen en adenovirussen

Om te onderzoeken hoe de concentraties somatische colifagen en adenovirussen zich verhouden tot elkaar in alle (29) onderzochte monsters zijn de concentraties (de som van pellet+supernatant) van deze virussen in figuur 23 tegen elkaar uitgezet.



Figuur 23. Het verband tussen de concentraties adenovirussen en de concentraties somatische colifagen zoals die zijn aangetoond in 29 onderzochte watermonsters. De monsters waarin geen adenovirussen zijn aangetroffen zijn weergegeven op de x-as, de monsters waarin geen somatische colifagen zijn aangetroffen zijn weergegeven op de y-as. De lijn geeft de situatie weer waarbij de concentraties van de beide virussen gelijk zijn.

Uit de concentraties somatische colifagen (aangetoond met de kweekmethode, detectie van infectieuze virusdeeltjes) en adenovirussen (aangetoond met Q-PCR, detectie van virusdeeltjes) in de 29 onderzochte monsters kan het volgende gezegd worden:

- In 6 monsters zijn geen somatische colifagen maar ook geen adenovirussen aangetoond.
- In 8 monsters zijn wel somatische colifagen aangetoond maar geen adenovirussen. Twee van deze monsters zijn afkomstig van de voorzuivering in Loenen (zie 2.3.2) met hoge concentraties somatische colifagen. De andere 6 monsters bevatten vrij lage concentraties somatische colifagen, mogelijk zijn in deze monsters ook de adenovirus concentraties laag en vallen daardoor beneden de (hogere) detectiegrens van de adenovirus-methode.
- In 15 monsters zijn zowel somatische colifagen als adenovirussen aangetoond. In de meeste (11) van deze monsters zijn de concentraties adenovirusdeeltjes (gemeten met Q-PCR) hoger dan de concentraties infectieuze somatische colifagen (gemeten met kweekmethoden). In één monster was de concentratie adenovirussen vergelijkbaar met de concentratie somatische colifagen en in drie monsters was de concentratie somatische colifagen hoger dan de concentratie adenovirussen. Gemiddeld zijn de concentraties adenovirussen in deze (15) monsters een factor 40 hoger dan de concentraties somatische colifagen.



# 4 Discussie

## 4.1 Methoden

### 4.1.1 Detectiegrens van de methoden

Met de kweekmethode die voor somatische- en F-specifieke fagen wordt gebruikt is het mogelijk om een vrij groot volume (ca. 10 ml) van het water-concentraat te onderzoeken op de aanwezigheid van infectieuze faagdeeltjes. Bij het toepassen van PCR methoden voor de detectie van adenovirussen wordt eerst DNA geëxtraheerd uit een klein volume (0,3 ml) van een geconcentreerd watermonster en vervolgens wordt een PCR-reactie uitgevoerd op een klein deel (10%) van het DNA-extract. Hoewel het in principe mogelijk is om met de PCR methode één DNA molecuul (afkomstig van één virusdeeltje) te detecteren maakt dit kleine analysevolume de detectiegrens van de adenovirus PCR methode (4-20 DNA kopieën/l) aanmerkelijk hoger (~factor 200-1000) dan de detectiegrens van de methode voor detectie van somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen (0.02 PVE/l).

Door de hogere detectiegrens van de methode voor detectie van adenovirussen was het voor de meeste monsters niet mogelijk om betrouwbare adenovirus-metingen uit te voeren in het water dat alleen met de hemoflow methode was geconcentreerd maar was het noodzakelijk om de hemoflow-concentratiestap te laten volgen door een concentratiestap met de centricon methode (figuur 1).

Overigens heeft de opbrengst van de concentratiestappen (hemoflow en centricon) invloed op de detectiegrens van de kweekmethoden voor fagen en ook de PCR-methode voor adenovirussen. In deze studie is de opbrengst van somatische fagen slechts op een beperkt aantal monsters bepaald, er is echter weinig bekend over de opbrengst van adenovirussen en F-specifieke fagen. Het is onduidelijk of de opbrengst van F-specifieke fagen en adenovirussen sterk zal afwijken van de opbrengst van somatische colifagen. Mogelijk dat de efficiëntere hechting van adenovirussen aan deeltjes invloed zal hebben op de opbrengst van deze virussen. Aanvullend onderzoek zal nodig zijn om dit verder uit te zoeken.

### 4.1.2 Opbrengst

De bepaling van de opbrengst van de concentratiestappen (hemoflow, centricon) is mogelijk in monsters waarin de concentraties fagen voor- en na deze concentratiestappen hoog genoeg zijn. Dit gold voor een beperkt aantal monsters en alleen voor somatische colifagen. De opbrengst was hoog (minimaal 62% voor alleen de hemoflow en minimaal 47% voor hemoflow gevolgd door centricon) en vergelijkbaar met eerder gerapporteerde recoveries (Veenendaal, 2007).

Doordat de concentraties adenovirussen en F-specifieke fagen te laag waren in monsters die geen concentratiestap hadden ondergaan was het niet mogelijk om de opbrengst van deze virussen te bepalen.

Voor het betrouwbaar bepalen van de opbrengst van F-RNA fagen en adenovirussen met deze concentratiemethoden is het noodzakelijk om monsters te analyseren waaraan deze virussen zijn toegevoegd (spike-monsters). Door in vervolgonderzoek regelmatig spike-monsters te analyseren kan een beter beeld verkregen worden van de opbrengst van deze virussen.

### 4.1.3 Virussen in de pellet na centrifugatie

Na het toepassen van de hemoflow-methode voor het concentreren van deeltjes uit de watermonsters (figuur 1) wordt centrifugatie toegepast om de grotere deeltjes uit het geconcentreerde monster te pelletteren en verder te gaan met de vrij gesuspendeerde virussen in het supernatant. Bij analyse van het pellet-materiaal blijkt dat hierin hoge concentraties

adenovirussen worden aangetoond. In een aantal monsters is het aantal virusdeeltjes in de pellet zelfs hoger dan in het supernatant. In de wetenschappelijke literatuur is dit niet eerder beschreven. Het is niet mogelijk dat individuele virusdeeltjes bij deze centrifugestap naar beneden worden gedraaid en daarbij in de pellet terecht komen. De dichtheid van de virusdeeltjes, de toegepaste centrifugatie-kracht en -tijd zijn daarvoor te gering. Mogelijk dat adenovirusdeeltjes complexen vormen die onder invloed van de centrifugatiekrachten in de pellet terecht komen. Het aggregeren van adenovirussen tot complexen van een grote aantallen is eerder beschreven (Galdiero, 1979). In deze laboratorium studie vond de vorming van virusaggregaten plaats onder omstandigheden waarbij de pH laag was ( $< 5$ ) en de virusconcentraties zeer hoog ( $> 1E+11$  deeltjes/ml). De pH waarden en adenovirusconcentraties in de geconcentreerde monsters wijken hiervan zeer sterk af en hierdoor is niet te verwachten dat aggregatie van de virussen een grote rol speelt.

Het is ook mogelijk dat binding van adenovirussen aan deeltjes een belangrijke rol speelt bij het grote aantal adenovirussen dat na centrifugatie in het pellet terecht komen. Hechting van adenovirussen aan deeltjes in het water zou ook gevolgen kunnen hebben voor de verwijdering van adenovirussen door zuiveringsprocessen, bijvoorbeeld bij UV-desinfectie.

De concentraties somatische colifagen en F-specifieke fagen die worden aangetoond in de pellet zijn veel lager en vormen slechts een klein deel van de totale hoeveelheid fagen die in een monster aanwezig zijn. Dit geeft aan dat fagen zich anders gedragen dan adenovirussen. Fagen vormen waarschijnlijk in mindere mate aggregaten of binden minder efficiënt aan deeltjes. Bij binding aan deeltjes is het mogelijk dat lading van het oppervlak van de adenovirussen een rol speelt. De lading van het oppervlak van virusdeeltjes wordt bepaald door het iso-electrisch punt (IEP, de pH waarbij het deeltje geen lading bezit) van de oppervlakte-eiwitten van de virusdeeltjes. De beschikbare informatie over IEP's van virusdeeltjes is beperkt. Uit een onderzoek waarbij de IEP's van verschillende virussen met elkaar vergeleken zijn (Michen and Graule, 2010) blijkt dat het IEP van één type adenovirus bepaald is (Humaan adenovirus type-5). Het IEP (4,5) van dit adenovirus blijkt niet sterk af te wijken van de IEP's van een groot aantal verschillende fagen zodat niet te verwachten valt dat de lading van dit adenovirus sterk afwijkt van fagen. Op basis hiervan is niet te verwachten is dat verschil in lading een belangrijke rol speelt in de verschillen in binding aan deeltjes.

Het is ook niet uit te sluiten dat binding aan deeltjes of aggregatie ook voor somatische colifagen een grotere rol speelt dan de metingen laten zien. Het is mogelijk dat meerdere colifagen die aan deeltjes gebonden zijn of aggregaten van meerdere colifagen niet herkend kunnen worden als meerdere fagen doordat deze bij de gebruikte bepalingmethode slechts één plaque zullen vormen.

## **4.2 Virusconcentraties in oppervlaktewater**

De concentratie somatische colifagen, F-specifieke fagen en adenovirussen zijn bepaald in oppervlaktewater dat afkomstig is van de innamepunten van 9 verschillende zuiveringen die dit oppervlaktewater als grondstof gebruiken. De resultaten worden per virustype bediscussieerd.

### **4.2.1 F-specifieke fagen**

F-specifieke RNA fagen worden in vrijwel alle onderzochte oppervlaktewatermonsters aangetoond, behalve in de Drentsche Aa. De concentraties F-specifieke fagen zijn in alle monsters laag (gem. 79 PVE/l). Deze waarden zijn hoger dan eerdere metingen die zijn uitgevoerd in het IJsselmeerwater bij Andijk maar lager dan eerdere metingen in de Rijn bij Lobith (de Roda Husman et al., 2005), de Maas bij Keizersveer (de Roda Husman et al., 2006), de Maas bij Eijsden (Hoogenboezem, 2007) en metingen die zijn gedaan van een collectie van verschillende oppervlaktewatermonsters (Havelaar et al., 1993).

#### **4.2.2 Somatische colifagen**

Somatische colifagen zijn in dit onderzoek in alle onderzochte oppervlaktewatermonsters aangetoond. De concentraties somatische colifagen zijn beduidend hoger dan de concentraties F-specifieke RNA fagen (gemiddeld een factor van ~250). De concentraties somatische colifagen die zijn aangetoond in het Maaswater bij Keizersveer zijn vergelijkbaar met de concentraties die in eerder onderzoek zijn aangetroffen in dit water (de Roda Husman et al., 2006). Ook de concentratie somatische colifagen die is aangetoond in het IJsselmeerwater bij Andijk is vergelijkbaar met de concentratie die in eerder onderzoek is aangetroffen in dit water (de Roda Husman et al., 2005).

#### **4.2.3 Adenovirussen**

Adenovirussen worden in vrijwel alle ruw water monsters aangetoond. Alleen in het monster dat afkomstig is van het Waterleidingkanaal bij Loenen worden geen adenovirussen aangetoond. Met de gebruikte Q-PCR methode worden specifiek de adenovirussen gedetecteerd die behoren tot de humaan-fecale typen (40 en 41). Wellicht is in het water van het Waterleidingkanaal, ten tijde van de monsternamen, het besmettingsniveau met humaan-fecaal materiaal zeer laag zodat geen adenovirus type 40 en 41 kon worden aangetoond. Concentraties adenovirussen zijn in het ruwe oppervlaktewater (enigszins) hoger dan de concentraties somatische colifagen en beduidend hoger dan F-specifieke RNA fagen (gemiddeld ~ factor 700 hoger).

In eerder onderzoek (Hoogenboezem, 2007) is eveneens Q-PCR toegepast voor het detecteren van adenovirussen in het water van de rivier de Maas bij Eijsden, hierbij werden adenovirussen aangetoond in alle (12) monsters die gedurende een periode van een jaar waren onderzocht. De concentraties die in dat onderzoek werden gevonden waren lager dan de concentraties in dit onderzoek. Het is onduidelijk wat hiervoor de reden is, de toegepaste concentrerings- en Q-PCR-methode verschilt van de methoden die in dit onderzoek zijn toegepast. Bij onderzoek in Spanje, waar de adenovirus concentraties in oppervlaktewater zijn bepaald op plaatsen waar de waterbedrijven oppervlaktewater innemen voor de productie van drinkwater, werden adenovirussen aangetoond in alle (n=9) onderzochte monsters (Albinana-Gimenez et al., 2009a). De concentraties waren vergelijkbaar met de in deze studie gevonden concentraties (gemiddeld: 1,2E+04 DNA kopieën/l). Bij een eerder Amerikaans onderzoek werden in oppervlaktewater veel lagere concentraties adenovirussen (slechts 1-3 per 100 l) gerapporteerd (Chapron et al., 2000, Mena and Gerba, 2009). Het is zeer waarschijnlijk dat verschillen in de gebruikte detectiemethoden verantwoordelijk zijn voor de grote concentratieverschillen die bij deze studies gevonden worden. Bij de Amerikaanse studie (Chapron et al., 2000) is een combinatie van celkweek met PCR technieken gebruikt voor detectie. Met deze methode worden slechts de virusdeeltjes gemeten die in staat zijn om een bepaalde cellijn (BGMK) te infecteren. In deze studie en in het Spaanse onderzoek is Q-PCR gebruikt (Albinana-Gimenez et al., 2009a) waarmee het mogelijk is om zowel infectieuze als niet-infectieuze adenovirusdeeltjes te meten.

### **4.3 Effectiviteit van de zuivering voor de reductie van de concentratie fagen en adenovirussen**

Het doel van dit onderzoek was om na te gaan in hoeverre de methoden voor het meten van F-specifieke fagen, somatische colifagen en adenovirussen bruikbaar zijn voor het bepalen van de effectiviteit van zuiveringsstappen voor het reduceren van de concentratie virussen bij de drinkwaterbereiding. Daarvoor zijn de concentraties van deze virussen bepaald in oppervlaktewater, dat wordt ingenomen voor de productie van drinkwater, op verschillende locaties en zijn metingen gedaan na verschillende zuiveringsstappen. Deze (per locatie) eenmalige metingen geven aan dat deze methoden toepasbaar zijn voor het meten van de effectiviteit van verschillende zuiveringsstappen voor de reductie van virussen. Door het

selecteren van productiebedrijven waarbij verschillende zuiveringsprocessen worden toegepast wordt een eerste indruk verkregen over de effectiviteit van de volgende zuiveringsstappen:

- Verblijf in een spaarbekken
- Bodempassage
- Coagulatie/sedimentatie

De resultaten zijn gebaseerd op eenmalige metingen en geven daarom slechts een eerste indicatie van de effectiviteit van zuiveringsstappen voor de reductie van virussen. Uitgebreider onderzoek zal noodzakelijk zijn om een goed inzicht te krijgen.

#### **4.3.1 F-specifieke fagen, somatische colifagen en adenovirussen voor het bestuderen van de capaciteit van zuiveringsstappen**

##### *F-specifieke RNA fagen*

De concentraties F-specifieke fagen die natuurlijk voorkomen in het oppervlaktewater zijn laag. Door deze lage concentraties zijn F-specifieke fagen niet geschikt om de capaciteit van zuiveringsstappen te bepalen.

##### *Somatische fagen*

De concentraties somatische colifagen zijn in het oppervlaktewater hoog genoeg om de effectiviteit van zuiveringsprocessen op de concentratie virussen in de zuivering te kunnen meten. Met een gemiddelde concentratie somatische fagen van  $1.96E+04$  PVE/l en een detectiegrens van  $2.0E-02$  PVE/l is het (gemiddeld) mogelijk om een reductie van ca 6 log van deze fagen te kunnen meten.

##### *Adenovirussen*

De concentraties adenovirussen zijn hoger dan de concentraties somatische colifagen. Door de hogere detectiegrens van de adenovirus PCR methode is het met deze methode minder goed mogelijk om de effectiviteit van zuiveringsprocessen op de concentratie virussen te kunnen meten. Met gemiddelde adenovirus concentraties van  $5,44E+04$  DNA kopieën/l in het oppervlakte water en een detectiegrens van tussen 4 en 20 DNA kopieën/l is het (gemiddeld) mogelijk om een reductie van ca. 4 log van deze virussen te kunnen meten.

De ontwikkeling van alternatieve methoden voor het extraheren en concentreren van DNA uit (geconcentreerde) watermonsters zullen het mogelijk maken om een groter volume water te onderzoeken op de aanwezigheid van adenovirussen en daarmee de detectiegrens van deze methode te verlagen. Momenteel zijn nog geen geschikte methoden beschikbaar.

##### *Algemeen: meting van infectieuze virusdeeltjes en metingen van virus-DNA met Q-PCR*

Met de faagbepaling worden de virusdeeltjes gedetecteerd die in staat zijn om het celtypen dat wordt gebruikt bij de detectiemethode te infecteren. Met de adenovirusmethode worden specifieke DNA-sequenties die in de virusdeeltjes aanwezig zijn gedetecteerd, hiermee wordt geen informatie verkregen over de infectiviteit van de gedetecteerde deeltjes. Voor de interpretatie van de resultaten van de adenovirus- en faagmetingen die zijn uitgevoerd dient er rekening gehouden te worden met de verschillende technieken die zijn toegepast voor de metingen (Q-PCR voor adenovirussen en kweektechnieken voor fagen). Bij het gebruik van deze methoden voor het bestuderen van zuiveringsprocessen zal het met kweekmethoden (zoals gebruikt voor de somatische colifagen) mogelijk zijn om informatie te krijgen over een reductie van de concentratie t.g.v. verwijderings-processen maar ook over het effect van inactivatie-processen (o.a. UV, Chloor,  $ClO_2$ , Ozon). Bij het toepassen van PCR-methoden voor het bestuderen van zuiveringsprocessen zullen de resultaten bij verwijderingsprocessen goed interpreteerbaar zijn, bij het bestuderen van inactivatie-processen dient men voorzichtig te zijn met de interpretatie van de resultaten. In gevallen waar virusdeeltjes geïnactiveerd worden

door het toegepaste proces kan het voorkomen dat het DNA nog steeds kan worden aangetoond.

#### **4.3.2 Het effect van zuiveringsprocessen op de concentraties adenovirussen en somatische fagen**

Bij een aantal zuiveringen is het effect van verschillende zuiveringsprocessen op de concentraties somatische fagen en adenovirussen onderzocht. Hoewel er, per zuivering, slechts eenmalige metingen zijn uitgevoerd en er geen definitieve conclusies kunnen worden getrokken over de effectiviteit van de onderzochte zuiveringsprocessen geven de resultaten wel de mogelijkheid om het gedrag van beide parameters bij verschillende zuiveringsprocessen met elkaar te vergelijken.

##### **Bekkenverblijf**

Het effect van verblijf in een bekken op de infectiviteit van somatische colifagen en de aanwezigheid van adenovirussen is onderzocht voor het bekken bij Andijk, het mengbekken bij "De Punt" en de Biesbosch bekkens. De metingen geven de indicatie dat het effect van het verblijf in een bekken op de concentratie adenovirussen vergelijkbaar is met het effect op de concentratie somatische fagen. Mogelijk heeft het verblijf in een bekken een groter effect op de concentratie adenovirussen (de metingen bij "De Punt" en het Biesbosch bekken geven hier aanwijzingen voor). Mogelijk zorgt de grotere mate van binding van adenovirussen aan deeltjes voor een reductie van de adenovirussenconcentratie door bezinking van deze deeltjes in het bekken.

Uitgebreider onderzoek moet uitwijzen of de verschillen tussen adenovirussen en somatische colifagen die in dit beperkte aantal monsters worden waargenomen significant zijn.

##### **Oeverfiltratie**

De invloed van bodempassage op de reductie van de concentratie somatische colifagen en adenovirussen wordt zichtbaar gemaakt bij metingen bij Roosteren waarbij de virusconcentraties zijn gemeten in het Maaswater en na oeverfiltratie en bij de zuivering van Heel waar eveneens metingen zijn uitgevoerd na bodempassage. De metingen geven aan dat de virusconcentratie na bodempassage aanzienlijk lager zijn, dit suggereert dat bodempassage een efficiënte barrière is voor virussen. Dat is zowel zichtbaar met somatische colifagen als adenovirussen. Bodempassage is eerder beschreven (Gilbert et al., 1976, Hijnen et al., 2005, Schijven, 2001, Schijven and Hassanizadeh, 2002) als goede methode voor de verwijdering van verschillende virussoorten. Er zijn echter nog geen gegevens uit andere studies beschikbaar over de verwijdering van adenovirussen door bodempassage.

Dit beperkt aantal monsters geeft aan dat adenovirussen en somatische colifagen bruikbaar zijn voor het meten van de effectiviteit van oeverfiltratie als proces voor reductie van de virusconcentratie.

##### **Coagulatie/sedimentatie/filtratie**

Het effect van coagulatie/sedimentatie of coagulatie/filtratie processen op de concentratie somatische colifagen en adenovirussen is onderzocht bij de zuivering van de WRK in Nieuwegein en bij de productielocaties "De Punt" en "Ouddorp". Het effect van coagulatie op de concentratie somatische fagen en adenovirussen, zoals waargenomen in deze beperkte set monsters, verschilt per zuivering en de metingen suggereren dat adenovirussen efficiënter worden verwijderd dan somatische colifagen. Mogelijk dat verschillen in de samenstelling van het water, verschillen in het coagulatie proces in combinatie met verschillende eigenschappen van de virusdeeltjes en de hechting van (adeno)virussen aan deeltjes zorgt voor de verschillen in verwijdering van deze virussen. In een studie waarbij het effect van coagulatie onder laboratoriumcondities is bestudeerd (Abbaszadegan et al., 2007) bleek ook dat verwijdering



van adenovirussen door coagulatie processen efficiënter verloopt dan de verwijdering van de colifaag phi-X174.

Zeer recent zijn de resultaten van een studie gepubliceerd naar verwijdering van adenovirussen bij drie drinkwaterzuiveringen in Spanje (Albinana-Gimenez et al., 2009a). Coagulatie/filtratie werd ook toegepast in één van deze Spaanse zuiveringen, de verwijderingscapaciteit van deze stap was in die zuivering (2,0 log) vergelijkbaar met de capaciteit van de coagulatie-stap in de zuiveringen van "De Punt" en "Ouddorp".

## 5 Conclusies en aanbevelingen

Op basis van het in dit rapport beschreven onderzoek kunnen conclusies getrokken worden over de toepasbaarheid van de bacteriofaag- en adenovirusmethoden voor de beschrijving van de effectiviteit van drinkwaterzuiveringsprocessen voor het reduceren van de concentratie virussen.

### 5.1 De methoden

#### *Concentratie met hemoflow en centricon*

- Door toepassing van de hemoflow-methode gevolgd door de centricon-methode is het mogelijk om deeltjes uit grote volumes water sterk te concentreren waardoor de concentratie van verschillende soorten virussen gevoelig gemeten kunnen worden.
- Bij een aantal monsters is de opbrengst van somatische colifagen na concentratie met de hemoflow- en de centriconmethode bepaald. De opbrengst bij deze monsters is hoog.
- Bij toepassing van deze methode is het noodzakelijk om bij (een deel van) de monsters een parallel monster te nemen en te analyseren na toevoeging van de virussen (spiken) om de opbrengst van de concentratiestappen te bepalen.

#### *F-specifieke RNA fagen*

- De concentraties F-specifieke RNA fagen in oppervlaktewater bij innamepunten zijn relatief laag. Hierdoor is deze parameter niet geschikt om de effectiviteit van zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie virussen te bepalen.

#### *Somatische colifagen*

- De concentraties somatische colifagen zijn in het oppervlaktewater hoog: gemiddeld  $1,96 \times 10^4$  PVE/l. Hierdoor is deze parameter geschikt om de effectiviteit van de eerste stappen in de zuivering voor de reductie van virussen te bepalen. Op basis van de (gemiddelde) concentraties somatische colifagen die worden aangetoond in het oppervlaktewater en de detectiegrens van de methode kan geconcludeerd worden dat het mogelijk is om in de praktijk een reductie van ca. 6 log aan te tonen.

#### *Adenovirussen*

- Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van de polymerase ketting reactie (PCR) om adenovirus-DNA moleculen kwantitatief aan te tonen.
  - o Deze methode heeft, doordat een kleiner volume kan worden geanalyseerd, een hogere detectiegrens dan de kweekmethoden voor fagen.
  - o Met deze methode wordt geen informatie verkregen over de infectiviteit van het virus.
- De concentraties adenovirussen zijn in het oppervlaktewater hoog: gemiddeld  $5,44 \times 10^4$  DNA kopien/l.
  - o Hierdoor is deze parameter geschikt om de effectiviteit van de eerste stappen in de zuivering voor de reductie van virussen te bepalen, in totaal is het mogelijk om een reductie van ca. 4 log aan te tonen.
- Door verbetering van methoden die gebruikt worden voor extractie van DNA uit geconcentreerde watermonsters is het mogelijk om de detectiegrens te verlagen.
- Doordat adenovirussen binden aan deeltjes komt een groot deel van deze virussen na centrifugatie in de pellet terecht.

- Om een goed beeld te krijgen van de concentratie adenovirussen in een monster is het dus noodzakelijk om zowel de pellet als het supernatant te analyseren.
- De binding aan deeltjes (mits niet geïntroduceerd door de concentreringsmethode) zal mogelijk ook effect hebben op de verwijdering van adenovirussen in de drinkwaterzuivering.

## **5.2 Effectiviteit van zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie adenovirussen en fagen**

Hoewel nog slechts een beperkt aantal metingen van somatische colifagen en adenovirussen is uitgevoerd bij een aantal zuiveringen geven deze metingen een eerste indicatie over:

- de bruikbaarheid van deze parameters voor het meten van de effectiviteit van zuiveringsprocessen;
- de vergelijkbaarheid van de effectiviteit van zuiveringsprocessen voor de reductie van somatische colifagen (model-bacterievirus) en de reductie van adenovirussen (menspathogeen virus);
- de verschillen in de effectiviteit van verschillende zuiveringsprocessen voor de reductie van de concentratie virussen.

De metingen laten zien dat somatische colifagen en adenovirussen zich bij de meeste zuiveringsprocessen vergelijkbaar gedragen. Een beperkt aantal metingen suggereert dat de concentratie adenovirussen bij een aantal zuiveringsprocessen (verblijf in een spaarbekken en coagulatie/sedimentatie) effectiever gereduceerd wordt dan de concentratie somatische colifagen. De hechting van adenovirussen aan deeltjes die is geconstateerd kan hier de oorzaak van zijn. Dit zou betekenen dat bij het gebruik van somatische colifagen als model voor virusverwijdering mogelijk een conservatieve schatting van de effectiviteit van de processtap wordt verkregen.

## **5.3 Aanbevelingen**

- De resultaten van dit onderzoek geven aan dat somatische colifagen en adenovirussen, in combinatie met de hemoflow- en centricon-concentratiemethoden, geschikt zijn voor het bepalen van de effectiviteit van verschillende stappen in de zuivering voor de reductie van de concentratie virussen. Door het kleine volume dat voor de adenovirus-PCR-methode in behandeling genomen kan worden is de detectiegrens van deze methode vrij hoog. De ontwikkeling van methoden voor de extractie van DNA uit grotere volumes zal het mogelijk maken om lagere adenovirus concentraties te meten en zal daarmee de mogelijkheid om deze methode toe te passen voor het meten "in de zuivering" verbeteren.
- De omvang van de bij de verschillende zuiveringen uitgevoerde meetserie is te klein om conclusies te trekken over de effectiviteit van de individuele zuiveringsstappen voor het reduceren van de concentraties virussen. Uitgebreider onderzoek waarbij meer watermonsters per zuivering worden onderzocht zal beter inzicht geven in de effectiviteit van verschillende zuiveringsprocessen voor de verwijdering van deze virussen.
- De analyses die zijn uitgevoerd in dit onderzoek suggereren dat er, bij verschillende zuiveringsstappen, verschillen zijn tussen de reductie van de concentratie adenovirussen en de reductie van de concentratie somatische colifagen. Hierbij lijken adenovirussen in een aantal situaties beter te worden verwijderd dan somatische colifagen, mogelijk door de hechting aan deeltjes. Uitgebreider onderzoek zal meer inzicht geven in deze mogelijke verschillen en de rol van hechting aan deeltjes.
- De somatische colifagen komen als de meest geschikte parameter naar voren om de effectiviteit van zuiveringsprocessen voor de reductie van virussen in de drinkwaterpraktijk te bepalen: de concentraties zijn hoog en de detectiegrens van de methode is laag, zodat een grote reductie van de concentratie (ca. 6 log) aantoonbaar is. De methode bepaalt de aanwezigheid van infectieuze virusdeeltjes en is relatief eenvoudig en

goedkoop. Daarnaast zijn de adenovirussen geschikt om te bepalen of de somatische colifagen representatief zijn voor humane virussen als het gaat om het meten van de effectiviteit van drinkwaterzuiveringsprocessen voor het reduceren van de concentratie virussen.



## 6 Literatuur

- Abbaszadegan, M., Mayer, B.K., Ryu, H. and Nwachuku, N., 2007. Efficacy of removal of CCL viruses under enhanced coagulation conditions. *Environ Sci Technol* 41 (3), 971-977.
- Abbaszadegan, M., Monteiro, P., Nwachuku, N., Alum, A. and Ryu, H., 2008. Removal of adenovirus, calicivirus, and bacteriophages by conventional drinking water treatment. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 43 (2), 171-177.
- Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L. and Girones, R., 2009a. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res* 43 (7), 2011-2019.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J.M., Courtois, S. and Girones, R., 2009b. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods* 158 (1-2), 104-109.
- Anoniem, 2005. Inspectierichtlijn "Analyse microbiologische veiligheid drinkwater". VROM-Inspectie Artikelcode 5318.
- Anonymous, 1995. ISO 10705-1: Water quality -- Detection and enumeration of bacteriophages -- Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages ISO standard.
- Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water quality -- Detection and enumeration of bacteriophages -- Part 2: Enumeration of somatic coliphages. ISO standard.
- Chapron, C.D., Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Frades, C.N. and Margolin, A.B., 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 66 (6), 2520-2525.
- de Roda Husman, A.M., Penders, E.J.M., Krom, A.P., Bakker, G.L. and Hoogenboezem, W., 2005. Viruses in the Rhine and source waters for drinking water production. RIWA Report 330200.
- de Roda Husman, A.M., Ketelaars, H.A.M., Lodder, W.J., Medema, G.J. and Schets, F.M., 2006. De microbiologische kwaliteit van het ingenomen en afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001. RIVM rapport 330250002
- Galdiero, F., 1979. Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment. *Arch Virol* 59 (1-2), 99-105.
- Gilbert, R.G., Rice, R.C., Bouwer, H., Gerba, C.P., Wallis, C. and Melnick, J.L., 1976. Wastewater renovation and reuse: virus removal by soil filtration. *Science* 192 (4243), 1004-1005.
- Havelaar, A.H., van Olphen, M. and Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 59 (9), 2956-2962.
- Hijnen, W.A., Brouwer-Hanzens, A.J., Charles, K.J. and Medema, G.J., 2005. Transport of MS2 phage, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum*, and *Giardia intestinalis* in a gravel and a sandy soil. *Environ Sci Technol* 39 (20), 7860-7868.
- Hoogenboezem, W., 2007. Onderzoek naar het voorkomen van virussen in het Maaswater bij Eijsden 2004 - 2005. Rapport RIWA-Maas/Meuze.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Hill, V.R., Lu, X., Sobsey, M.D. and Erdman, D.D., 2005. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl Environ Microbiol* 71 (6), 3131-3136.
- Medema, G.J. and Theunissen, J.J.H., 1996. Eliminatie van virussen, *Cryptosporidium* en *Giardia* door drinkwaterzuiveringsprocessen. RIVM rapport (289202016).
- Mena, K.D. and Gerba, C.P., 2009. Waterborne adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol* 198, 133-167.
- Michen, B. and Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol*.
- Mooijman, K.A., Bahar, M., Muniesa, M. and Havelaar, A.H., 2002. Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages. *J Virol Methods* 103 (2), 129-136.
- Payment, P., 1991. Fate of human enteric viruses, coliphages, and *Clostridium perfringens* during drinking-water treatment. *Can J Microbiol* 37 (2), 154-157.
- Payment, P. and Franco, E., 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol* 59 (8), 2418-2424.

- Schijven, J.F., 2001. Virus Removal from Groundwater by Soil Passage. Modeling, Field and Laboratory Experiments. PHD-Thesis "Delft University of Technology" ISBN 90-646-4046-7.
- Schijven, J.F. and Hassanizadeh, S.M., 2002. Virus removal by soil passage at field scale and groundwater protection of sandy aquifers. *Water Sci Technol* 46 (3), 123-129.
- Taylor, M.B., Cox, N., Vrey, M.A. and Grabow, W.O., 2001. The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Res* 35 (11), 2653-2660.
- Theunissen, J.J.H., Nobel, P.J., van de Heide, R., de Bruin, H.A.M., van Veenendaal, D., Lodder, W.J., Schijven, J.F., Medema, G.J. and Van der Kooij, D., 1998. Enterovirusconcentraties bij innamepunten van oppervlaktewater voor de bereiding van drinkwater. RIVM rapport 28920213.
- van Olphen, M., Kapsenberg, J.G., van de Baan, E. and Kroon, W.A., 1984. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 47 (5), 927-932.
- Veenendaal, H.R.B.-H., A. J., 2007. Een methode voor het concentreren van grote volumes water. BTO rapport BTO 2007.051.

# I F-specifieke fagen, somatische colifagen en adenovirussen in oppervlaktewater

Datum	Locatie	KWR monsternummer	F-specifieke RNA fagen			Somatische coli fagen			Adenovirussen		
			Supernatant (pve/l)	Pellet (pve/l)	Supernatant+Pellet (pve/l)	Supernatant (pve / l)	Pellet (pve / l)	Supernatant+Pellet (pve/l)	Supernatant (DNA kopieën/l)	Pellet (DNA kopieën/l)	Supernatant+Pellet (DNA kopieën/l)
7/9/2008	Waterleidingkanaal (Loenen)	M-082481	7.00E-01	NA	7.00E-01	1.20E+05	8.90E+00	1.20E+05	NA	NA	NA
7/15/2008	Maas (Roosteren)	M-082868	3.40E+00	2.40E+02	2.43E+02	4.30E+03	NA	4.30E+03	1.00E+04	9.20E+04	1.02E+05
8/5/2008	Maas (Heel)	M-082870	2.48E+02	NA	2.48E+02	1.30E+04	NA	1.30E+04	1.71E+04	2.36E+05	2.53E+05
8/5/2008	Drentsche Aa (De Punt)	M-084324	NA	NA	NA	2.00E+04	NA	2.00E+04	7.76E+03	7.34E+02	8.49E+03
10/15/2008	Maas (Keizersveer)	M-084654	5.10E+01	3.20E+01	8.30E+01	5.70E+03	1.10E+02	5.81E+03	3.06E+04	2.40E+04	5.46E+04
11/12/2008	Haringvliet (Ouddorp)	M-084656	3.70E-01	NA	3.70E-01	4.52E+02	1.70E+01	4.69E+02	1.05E+03	3.10E+04	3.21E+04
11/12/2008	Lekkanaal (Nieuwegein)	M-090036	2.70E+01	NA	2.70E+01	6.40E+03	NA	6.40E+03	4.33E+03	1.90E+04	2.33E+04
1/6/2009	Andelse Maas (Brakel)	M-090072	2.70E+01	NA	2.70E+01	4.20E+03	NA	4.20E+03	8.33E+03	NA	8.33E+03
1/13/2009	IJsselmeer (Andijk)	M-090139	1.00E-01	NA	1.00E-01	1.50E+03	4.60E+02	1.96E+03	6.67E+03	1.00E+03	7.67E+03

Supernatant: bovenstaande vloeistof na centrifugatie, met daarin gesuspendeerde virussen

Pellet: neergeslagen deeltjes na centrifugatie; met daarin aan deeltjes gehechte virussen

PVE/l: plaque vormende eenheden per liter

NA: niet aantoonbaar





# II Somatische colifagen en adenovirussen in de zuivering

Datum	Locatie	monsternr.	Somatische coli fagen			Adenovirussen		
			Supernatant (pve/l)	Pellet (pve/l)	Pel.+Sup. (pve/l)	Supernatant (DNA kopieën/l)	Pellet (DNA kop./l)	Pel.+Sup. (DNA kop./l)
<b>Zuivering: WRK Nieuwegein</b>								
1/6/2009	Inname Lekkanaal	M-090036	6.40E+03	NA	6.40E+03	4.33E+03	1.90E+04	2.33E+04
1/6/2009	Na sedimentatie	M-090037	2.10E+03	4.00E+02	2.10E+03	4.90E+02	1.00E+04	1.05E+04
1/6/2009	Na sneelfilter	M-090038	2.30E+03	NA	2.30E+03	4.67E+03	NA	4.67E+03
<b>Zuivering: Loenen</b>								
7/15/2008	Waterleidingkanaal	M-082481	1.20E+05	8.90E+00	1.20E+05	NA	NA	NA
7/15/2008	Na waterleidingplas	M-082482	2.90E+03	4.80E-01	2.90E+03	NA	NA	NA
7/15/2008	Na filtratie	M-082483	3.00E+02	NA	3.00E+02	NA	NA	NA
<b>Zuivering: Roosteren</b>								
8/5/2008	Inname Maaswater	M-082868	4.30E+03	NA	4.30E+03	1.00E+04	9.20E+04	1.02E+05
8/5/2008	Gezamenlijk ruw (na bodempassage)	M-082869	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Zuivering: Heel</b>								
8/5/2008	Inname Maaswater	M-082870	1.30E+04	NA	1.30E+04	1.71E+04	2.36E+05	2.53E+05
8/5/2008	Bosmolen plas	M-082871	2.63E+02	NA	2.63E+02	NA	NA	NA
8/5/2008	Na bodem passage	M-082872	NA	NA	1.00E+00	NA	NA	NA
8/5/2008	Na sneelfilter	M-082873	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Zuivering: Andijk</b>								
10/8/2008	Inname IJsselmeer	M-084166	Hemoflow probleem, herhaald 1/22/2009			Hemoflow probleem, herhaald 1/22/2009		
10/8/2008	Inlaat kanaal	M-084167	5.40E+01	7.30E-01	5.47E+01	NA	NA	NA
1/22/2009	Inname IJsselmeer	M-090139	1.50E+03	4.60E+02	1.96E+03	6.67E+03	1.00E+03	7.67E+03
1/22/2009	Inlaat kanaal	M-090140	5.18E+02	9.60E+00	5.28E+02	1.02E+03	1.40E+03	2.42E+03
10/8/2008	Na microzeven	M-084170	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10/8/2008	Na flocculatie	M-084169	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10/8/2008	Na zandfiltratie	M-084168	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Zuivering: De punt</b>								
10/15/2008	Inname Drentsche Aa	M-084324	2.00E+04	NA	2.00E+04	7.76E+03	7.34E+02	8.49E+03
10/15/2008	Na bekken	M-084325	2.70E+03	NA	2.70E+03	1.96E+02	NA	1.96E+02
10/15/2008	Na sedimentatie	M-084326	3.56E+01	NA	3.56E+01	NA	NA	NA
10/15/2008	Na filtratie	M-084328	8.20E+00	NA	8.20E+00	NA	NA	NA
10/15/2008	Na langzame zandfiltratie	M-084327	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Spaarbekken: Biesbosch</b>								
11/12/2008	Maaswater bij Keizersveer	M-084654	5.70E+03	1.10E+02	5.81E+03	3.06E+04	2.40E+04	5.46E+04
11/12/2008	Biesbosch spaarbekken	M-084655	1.51E+02	NA	1.51E+02	NA	NA	NA
<b>Zuivering: Ouddorp</b>								
11/12/2008	Inname Haringvliet	M-084656	4.52E+02	1.70E+01	4.69E+02	1.05E+03	3.10E+04	3.21E+04
11/12/2008	Na microzeven	M-084657	5.67E+02	NA	5.67E+02	1.93E+03	2.70E+05	2.72E+05
11/12/2008	Na coagulatie/filtratie	M-084658	4.87E+02	NA	4.87E+02	5.23E+02	NA	5.23E+02
<b>Zuivering: Brakel</b>								
1/13/2009	Inname afgedamde Maas (Brakel)	M-090072	4.20E+03	NA	4.20E+03	8.33E+03	NA	8.33E+03
1/13/2009	Bergambacht na sneelfiltratie	M-090073	2.10E+03	NA	2.10E+03	7.83E+02	NA	7.83E+02

Supernatant: bovenstaande vloeistof na centrifugatie, met daarin gesuspendeerde virussen

Pellet: neergeslagen deeltjes na centrifugatie; met daarin aan deeltjes gehechte virussen

Pve/l: plaque vormende eenheden per liter

NA: niet aantoonbaar

