

BTO 2016.047 | Juni 2016

## **BTO** rapport

Slimmer Meten: effect van 12-24 uur wachttijd na spuien op microbiële verontreiniging in drinkwaterleidingen



# BTO

## Slimmer Meten: effect van 12-24 uur wachttijd na spuien op microbiële verontreiniging in drinkwaterleidingen

BTO 2016.047 | Juni 2016

### Opdrachtnummer

400554-014

### Projectmanager

Luc Hornstra

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Hygiëne en veiligheid

### Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

### Auteurs

Nikki van Bel, Luc Hornstra

### Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is openbaar.

**Jaar van publicatie**  
2016

#### Meer informatie

dr. ir. Nikki van Bel  
T 030-6069516  
E [Nikki.van.Bel@kwrwater.nl](mailto:Nikki.van.Bel@kwrwater.nl)

#### Keywords

Hygiëncode, Spuien, E. coli, enterococcen, MS2,

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)

**KWR**

Watercycle  
Research  
Institute

BTO 2016.047 | Juni 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, 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.



## BTO Managementsamenvatting

### *Voorgeschreven wachttijd na spuien in pilot distributienet leidt niet tot aantoonbaar hogere 'pakkans' van fecale verontreiniging*

**Auteur(s)** dr. Nikki van Bel, dr. Luc Hornstra, prof. dr. Gertjan Medema

In de Hygiëncode Drinkwater is momenteel opgenomen dat bij werkzaamheden pas 12 tot 24 uur na het spuien een watermonster mag worden genomen. Dit onderzoek laat zien dat in een pilot distributienet de tijdsduur tussen spuien en monsternamen geen rol speelt in het verhogen van de 'pakkans' van microbiële verontreiniging. Daarom verdient het aanbeveling de wachttijd te verkorten tot 1 uur, zodat de leiding na werkzaamheden eerder kan worden vrijgegeven. De hoogste 'pakkans' hangt wel samen met de afstand van doseerpunt tot monsternamen, wat verschilt per verontreinigingsbron en spuiregime. Spuien volgens de praktijkrichtlijn verwijderd in het pilot distributienet 2,6 - 4,2 log van de microbiële verontreiniging. Dit geldt voor zowel *E. coli* en *enterococci* bacteriën als MS2 bacteriofagen. Langzamer spuien met minder volumeverversing geeft een lagere log verwijdering: 1,7 - 2,7 log. Spuien verwijderd een groot deel, maar niet alle verontreiniging. In het geval van risico-ingrepen wordt aanbevolen aanvullende beheersmaatregelen te overwegen.



*Pilot distributienet waarin de experimenten zijn uitgevoerd. Links het spuiat, gevolgd door de pomp met daarachter 20 meter leidingen die een distributienet simuleren.*

**Belang:** effectiviteit 12-24 uur wachttijd na spuien op 'pakkans' fecale verontreiniging

In de Hygiëncode is momenteel voorgeschreven dat een eerste monsternamen na werkzaamheden plaats

dient te vinden 12 tot 24 uur na het spuien. Deze wachttijd is niet gebaseerd op gegevens, maar op de aanname dat micro-organismen die eventueel aan de biofilm zijn gehecht enige tijd nodig hebben om na

het spuien weer in het water te suspenderen, voordat een meting kan plaatsvinden. Door deze wachttijd is er langere tijd onzekerheid over de veiligheid van het drinkwater en duurt het langer voordat een leiding kan worden vrijgegeven. Het is belangrijk om te weten of de voorgeschreven 12 tot 24 uur wachttijd inderdaad resulteert in de grootste 'pakkans', of dat wellicht een ander tijdstip na spuien een betrouwbaarder beeld geeft van de mate van eventuele fecale verontreiniging in het distributienet. Daarvoor is inzicht nodig in de verspreiding van een microbiologische verontreiniging en waar en wanneer monsternamen het beste kan plaatsvinden.

#### Aanpak: testen van verschillende verontreinigings-scenario's en spuiregimes in een pilot distributienet

In een pilot distributienet zijn verschillende soorten verontreinigingen en spuiregimes getest. De microbiële verontreiniging bestond uit de wettelijke parameters *E. coli* en *enterococci* en uit MS2 als indicator voor virussen. Na dosering van de micro-organismen aan het pilot distributienet, is er gespuid conform de Praktijkrichtlijn. Daarna is op verschillende momenten na spuien, tussen 5 minuten en 24 uur na spuien, en op verschillende afstanden van het doseerpunt, tussen de 1 en 20 meter, een watermonster genomen. Na afloop van het experiment is ook de biofilm in het pilot distributienet bemonsterd en geanalyseerd.

In dit onderzoek is waterverbruik tijdens de 12-24 uur wachttijd, zoals dat in de praktijk plaatsvindt, nog niet gesimuleerd. Alle experimenten zijn uitgevoerd in een stilstaande leiding.

#### Resultaten: geen grotere 'pakkans' door 12 tot 24 uur wachttijd tussen spuien en monsternamen

In tegenstelling tot de voorschriften in de Hygiëncode, lijkt de 12 tot 24 uur wachttijd tussen spuien en monsternamen geen effect te hebben op de gemeten concentraties van de verontreinigingen.

De invloed van de afstand tussen doseerpunt en monsternamen hangt af van het spuiregime en de soort verontreiniging. Bij optimaal spuien en verontreiniging in de vorm van water, is er geen verschil tussen de verschillende afstandspunten. Als te kort is gespuid worden de hoogste concentraties bij het verste monsterpunt aangetroffen. Bij toediening van de verontreiniging in de vorm van zand en water, bevinden de hoogste concentraties zich bij de dichtstbijzijnde monsternamenpunten.

Uit het onderzoek blijkt ook dat de uitgevoerde spuiregimes, conform de praktijkrichtlijn, 2,6 tot 4,2 log van de toegediende micro-organismen verwijdert. Dit komt overeen met het grootste deel, maar niet met de gehele verontreiniging.

#### Implementatie: aanbeveling wachttijd te verkorten tot 1 uur zodat leiding eerder wordt vrijgegeven

Op basis van de resultaten lijkt de 12 tot 24 uur wachttijd zoals beschreven in de hygiëncode niet noodzakelijk. Vasthouden aan die code maakt de tijd tot vrijgave van de leiding daarmee onnodig lang. Daarom verdient het de aanbeveling de wachttijd te verkorten tot 1 uur.

Spuien verwijdert een groot deel, maar niet alle fecale verontreiniging. Aanbevolen wordt in ieder geval voldoende te spuien, en bij risico-ingrepen aanvullende beheersmaatregelen te overwegen.

Voor meer inzicht in het gedrag van microbiële verontreiniging in een drinkwaterleiding, is onderzoek naar hechting aan en loslaten van de biofilm nodig.

#### Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *Slimmer Meten: effect van 12-24 uur wachttijd na spuien op microbiële verontreiniging in drinkwaterleidingen* (BTO 2016.047).

# Inhoud

<b>Inhoud</b>	<b>4</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>5</b>
1.1 Aanleiding	5
1.2 Doelstellingen	5
1.3 Experimentele opzet	5
<b>2 Materiaal en Methodes</b>	<b>7</b>
2.1 Proefopstelling distributiesysteem	7
2.2 Stromingsprofielen in het pilot distributienet	9
2.3 Biofilmvorming	9
2.4 Uitvoering van spui-experimenten	9
2.5 Monsternamen	9
2.6 Micro-organismen	10
2.7 Bereiding van micro-organismen	10
2.8 Analyse van de micro-organismen	10
2.9 Bepalen van afsterving	11
2.10 Dataverwerking	11
2.11 Uitgevoerde experimenten	12
<b>3 Resultaten</b>	<b>13</b>
3.1 Pilot A en B	13
3.2 Experiment 1 tot 4	14
<b>4 Conclusie en Discussie</b>	<b>26</b>
4.1 De invloed van afstand tot doseerpunt en de tijd na spuien op de 'pakkans' van micro-organismen in de waterfase	26
4.2 Experimentele verbeteringen	26
4.3 Log verwijderingen door spuien	27
4.4 Vergelijking met praktijk	27
<b>5 Aanbevelingen</b>	<b>28</b>
<b>6 Referenties</b>	<b>29</b>
<b>Bijlage I</b>	<b>30</b>
• Pilot A	30
• Pilot B	30
• Experiment 1	31
• Experiment 2	35
• Experiment 3	39
• Experiment 4	43

# 1 Inleiding

## 1.1 Aanleiding

Momenteel is voorgeschreven in de Hygiëncode Distributie dat een eerste monsternamen plaats dient te vinden 12 tot 24 uur na het spuien. Om te bepalen of het water in het distributienet na een ingreep of calamiteit weer microbiologisch betrouwbaar is, wordt na de aangegeven wachttijd een monster genomen dat wordt onderzocht op de aanwezigheid van kweekbare *E. coli*, *Enterococci* en KG22. Voor deze voorgeschreven 12 tot 24 uur wachttijd is geen deugdelijk onderbouwde wetenschappelijke basis, maar dit lijkt vanuit de historie gegroeid. De gedachtengang hierachter is dat, mocht er een verontreiniging aanwezig zijn in het distributienet, deze een bepaalde tijd nodig heeft om zich in het net te verspreiden. Direct na spuien zou de pakkans lager zijn, er is tijd nodig voor micro-organismen die zich aan biofilm of sediment hebben gehecht om weer te suspenderen. Na de 12 tot 24 uur wachttijd zou deze verspreiding en resuspensie plaats hebben kunnen vinden, en kan de verontreiniging beter worden waargenomen.

De huidige praktijk van waterkwaliteitsbeoordeling bij werkzaamheden aan het distributienet betekent dat burgers in het risicogebied een preventief kookadvies krijgen. Vaak kan de gerepareerde sectie geïsoleerd blijven en betreft dat een beperkt aantal afnemers, maar soms kan dit niet en wordt een groot aantal burgers gevraagd drinkwater te koken. De wachttijd voor monsternamen verlengt de onzekerheid over de betrouwbaarheid gedurende 12 -24 uur. Met een kookadvies worden niet alle consumenten in een risicogebied beschermd. Bekend is dat het kookadvies ongeveer 80 procent van de mensen bereikt. De overige 20 procent loopt daarmee een risico. Een kortere wachttijd betekent dat snel en gericht kan worden ingegrepen in die enkele gevallen dat de sectie van het distributienet besmet is geraakt. Naast het onvolledige bereik van een kookadvies, betekent een kookadvies ook ongemak voor burgers en veel vragen bij burgers en bedrijven en instellingen die drinkwater gebruiken en of drinkwater voor bepaalde toepassingen gebruikt kan worden. Ook betekent de huidige wachttijd dat de straat een dag langer open ligt, om te wachten op de monsternamen. Als de pakkans van een verontreiniging tijdens ingrepen inderdaad het hoogst is na 12 - 24 uur is de wachttijd gerechtvaardigd, maar daar is nu geen onderbouwing voor.

## 1.2 Doelstellingen

Het doel van dit project betreft het vaststellen of de voorgeschreven 12 tot 24 uur wachttijd inderdaad resulteert in de grootste "pakkans", of dat wellicht een ander monstertijdstip na spuien een betrouwbaarder resultaat geeft van het optreden van een fecale verontreiniging in het distributienet na een ingreep. Dit inzicht willen we krijgen door zowel het transport- en hechtgedrag als de overleving van *E. coli*, *Enterococci* en MS2 als modelorganismen voor microbiële verontreiniging in het distributienet te bepalen in een pilot distributiesysteem. Op deze wijze wordt inzicht verkregen in hoe een microbiologische verontreiniging zich in het distributienet kan verspreiden, en op welk moment en op welke plaats het beste een monster kan worden genomen. Tevens kunnen met deze pilotopstelling verschillende stromingsprofielen en het effect van verbruikers op de microbiologische verontreiniging worden getest.

## 1.3 Experimentele opzet

Voor hechting van bacteriën aan het wandoppervlakte is de aanwezigheid van een biofilm een belangrijke factor ((Paris et al. 2009, Hornstra 2015) . Micro-organismen hechten met grote voorkeur aan de gekoloniseerde delen van het wandoppervlakte, en in veel mindere mate aan niet

gekoloniseerde delen. Daarom worden alle experimenten uitgevoerd in een systeem met een reproduceerbare, kunstmatig gekweekte biofilm.

Als microbiologische verontreiniging is gekozen voor de organismen *E. coli*, *Enterococcon* en MS2. In leidingwater gekweekte *E. coli* en *Enterococcon* (in plaats van in rijk medium) sterven maar heel langzaam af onder leidingwatercondities, en zullen daarom naar verwachting nauwelijks afsterven in de 24 uur na doseren. In een controle experiment worden *E. coli*, *Enterococcon* en MS2 geïncubeerd in een fles in gelijk water als in het distributiesysteem, om de afsterving te bepalen. De microbiologische verontreiniging wordt als watermonster of grondmonster in het distributiesysteem gebracht.

Het effect van verschillende spuiscenario's zal worden geanalyseerd. Eerst wordt er volgens de richtlijn gespuid. Daarna zal er ook gespuid worden met lagere snelheden en minder volumeverversingen aangezien in de praktijk spui criteria niet altijd gehaald worden. De verwachting is dat dit een rol zal spelen bij de detectie/waarneming van fecale verontreinigingen.

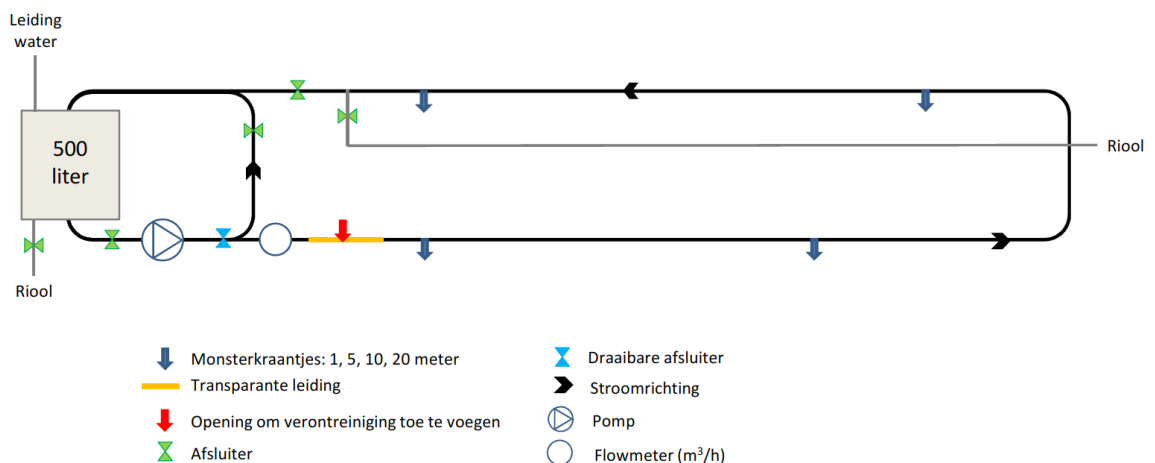


## 2 Materiaal en Methodes

### 2.1 Proefopstelling distributiesysteem

In de proefhal van KWR is een pilot distributienet gebouwd (Figuur 1). Het pilot distributienet bestaat uit een groot watervat waarop een pomp is aangesloten waarmee het systeem gespuid wordt (Figuur 2). Na de pomp zit een draaibare afsluiter, waarmee kan worden voorkomen dat water met verontreiniging kan terugstromen naar de pomp en het spuivat. Achter de afsluiter bevindt zich een flowmeter gevolgd door 20-meter leidingen. De eerste meter bestaat uit een transparante leiding zodat het gedrag van de gedoseerde verontreiniging (water of grond) in de proefopstelling kan worden bekeken. Dit segment is afgedekt met aluminiumfolie tijdens en tussen de experimenten (

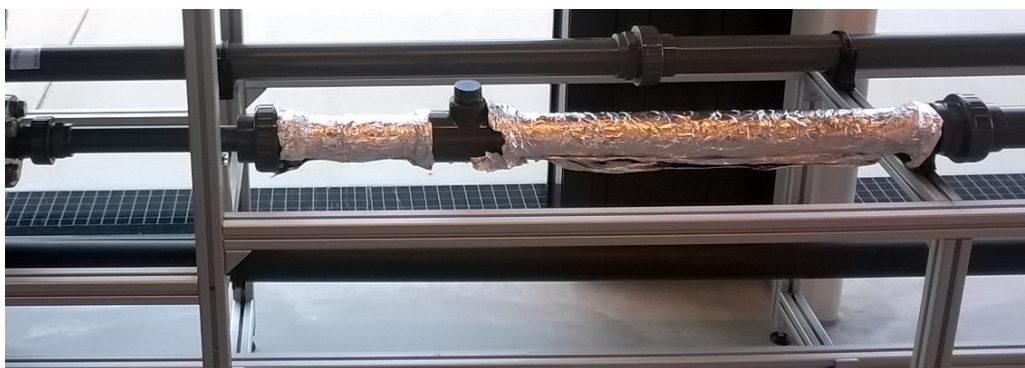
Figuur 3) om algengroei tegen te gaan. In het transparante deel is tevens een doseeropening geplaatst om verontreiniging in de vorm van water en zand in het systeem te brengen. Op 1, 5, 10 en 20 meter van het doseerpunt bevinden zich monsterkraantjes en na het laatste monsterkraantje bevindt zich de afvoer naar het riool. Deze afvoer is afgesloten met een afsluiter en wordt alleen tijdens spuien en na afloop van het experiment geopend



FIGUUR 1. SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN DE PROEFOPSTELLING



FIGUUR 2. PROEFOPSTELLING IN DE PROEFHAL. LINKS HET SPIUVAT, GEVOLGD DOOR DE SPIUPOMP EN DE 20-METER LANGE LEIDING



FIGUUR 3. TRANSPARANT DEEL MET DOSEEROPENING. TIJDENS EN TUSSEN EXPERIMENTEN IS DIT DEEL AFGEDEKT OM ALGENGROEI TE VOORKOMEN.

Voor de experimenten is er een reproduceerbare, artificiële biofilm gekweekt in het deel van de leidingen dat zich tussen de draibare afsluiter en de afsluiter naar het riool bevindt. Omdat het moeilijk is om de biofilm van een vorig experiment goed te verwijderen, is het distributiesysteem zo gebouwd dat de gehele leidingsectie snel en goedkoop kan worden vervangen door nieuw materiaal. In elk experiment wordt daarom begonnen met schone leidingen waarin vervolgens een biofilm wordt gekweekt.

De proefopstelling heeft de volgende eigenschappen:

- Materiaal: PVC-U
- Lengte: 20 meter
- Monsterkranen op: 1, 5, 10 en 20 meter
- Diameter inwendig: 55,4 mm
- Inhoud: 48,2 liter

## 2.2 Stromingsprofielen in het pilot distributienet

Voor verschillende stroomsnelheden in de proefopstelling is het Reynold's getal berekend om te kunnen bepalen wat het stromingsprofiel is bij de gebruikte snelheden (Tabel 1). Bij stromingssnelheden tot 0.03 m/s is de stroming laminair, bij een stromingssnelheid vanaf 0.07 m/s is er sprake van turbulente stroming.

TABEL 1. REYNOLD'S GETALLEN BIJ VERSCHILLENDE STROOMSNELHEDEN

Stromingssnelheid (m/s)	Reynold's getal	Stroming
0.001	58	Laminair
0.01	579	Laminair
0.02	1158	Laminair
0.03	1737	Laminair
0.04	2315	Overgang
0.05	2894	Overgang
0.06	3474	Overgang
0.07	4052	Turbulent
0.08	4630	Turbulent
0.09	5210	Turbulent
0.1	5788	Turbulent
1	57886	Turbulent
1.27	73516	Turbulent
1.5	86829	Turbulent

## 2.3 Biofilmvorming

Voor elk experiment wordt een nieuwe, reproduceerbare biofilm gevormd door 10 µg C/liter acetaat als koolstofbron aan het drinkwater in het distributiesysteem toe te voegen (van der Kooij et al. 1995). Gedurende twee weken staat het water stil in de leiding en wordt er een biofilm gevormd. De mate van biofilmvorming wordt na 2 weken bepaald aan de hand van de biologische activiteit (ATP) en het koloniegetal bij 22°C (KG22). Na twee weken worden op het water ATP en KG22 analyses uitgevoerd en aan het eind van het gehele experiment wordt het ATP gehalte en KG22 getal in de biofilm bepaald. Gebaseerd op de literatuur wordt de gekweekte biofilm als representatief beschouwd (in de zin dat ze voldoende hechtingsplaatsen biedt) als de KG22 waardes na twee weken hoger zijn dan 10<sup>4</sup> kve/cm<sup>2</sup> in de biofilm en 10<sup>4</sup> kve/ml in het water zijn (USEPA 2008).

## 2.4 Uitvoering van spui-experimenten

Na twee weken biofilmgroei wordt het water met acetaat weggespoeld met 500 liter schoon drinkwater. Het startpunt van de experimenten is een lege proefopstelling waarin zich een biofilm bevindt. De verontreiniging wordt samen met het water of zand toegevoegd via de opening in het transparante deel. Na 1 uur wordt er gespuid volgens het aangegeven regime, meteen na het spuien worden de afsluiters dicht gezet en staat het water in de leiding stil. Op verschillende tijdstippen wordt op 1, 5, 10 en 20 meter afstand van het doseerpunt een watermonster genomen. Na 24 uur worden de afsluiters geopend om de proefopstelling leeg te laten lopen. Hierna wordt de biofilm bemonsterd op 1, 10 en 20 meter.

## 2.5 Monstername

Per monstername wordt er 400 ml water uit het systeem gehaald. Dit wordt aangevuld met vers drinkwater vanuit het spuivat. Door het nemen van een watermonster van 0,4 liter verplaatst het water in de leiding zich met 16.6 cm. Bij een tapsnelheid van 1 liter per minuut zal de

stroomsnelheid tijdens de monsternames 0.007 m/s bedragen. De stroming in het systeem blijft laminair. Bij bemonstering van 4 monsterpunten in de volgorde 1-meterpunt, 5-meterpunt, 10-meterpunt, 20-meterpunt verplaatst het water zich als gevolg van de monsternames van één tijdstip met 66.2 cm. Bij vijf monsternames (5 min, 60 min, 2 uur, 6 uur, 24 uur) wordt er in totaal 8 liter (16.6%) van het water bemonsterd.

24 uur na spuien is de biofilm op de buiswand bemonsterd. Een afgemeten deel van de buiswand is bemonsterd met meerdere wattenstaafjes welke zijn samengevoegd in steriel leidingwater. De biofilm is losgetrild van de wattenstaafje door vier Lage Energie Sonificatie (LES) behandelingen, bestaande uit 2 minuten trillen bij een frequentie van 40 kHz. Op deze biofilmsuspensie zijn de analyses uitgevoerd.

## 2.6 Micro-organismen

Als microbiële verontreiniging is er gekozen voor *Escherichia coli* WR1, MS2 en *Enterococcus faecium* WR63. *E. coli* en *Enterococci* zijn indicator bacteriën en de wettelijke parameters waarop het drinkwater moet worden getest na calamiteiten of werkzaamheden. Als modelorganisme voor virussen is ook de bacteriofaag MS2 getest.

Om een grote log verwijdering aan te kunnen tonen, zijn zo hoog mogelijke concentraties micro-organismen toegediend aan het pilot distributienet:  $2 \times 10^5$  kve/ml *E. coli*,  $2 \times 10^4$  kve/ml *Enterococci* en  $2 \times 10^6$  pve/ml MS2 fagen.

Aangezien deze concentraties per experiment verschillen, zijn alle getoonde resultaten in dit rapport genormaliseerd naar een gelijke dosering van  $2 \times 10^4$  kve/ml.

## 2.7 Bereiding van micro-organismen

*E. coli* WR1 en *Enterococci* WR63 zijn opgekweekt in mineraal medium bij 22°C. Door de bacteriën op te kweken in een arm medium zijn deze minder gevoelig voor afsterving onder leidingwatercondities, en zullen daarom naar verwachting nauwelijks afsterven in de 24 uur na doseren. De groei is meerdere malen per week bepaald op Lab Lemco Agar (LLA). Na het bereiken van het maximale koloniegetal zijn de entflessen tot gebruik bewaard bij 4°C. Kort voor de start van elk experiment is het koloniegetal van de entfles bepaald op specifiek medium: Laurylsulfaat-agar (LSA) voor *E. coli* en Slanetz en Bartley agar (S&B) voor de *Enterococci*. Uit deze metingen bleek dat ook in de *Enterococci* entfles *E. coli* aanwezig was. We verwachten hier echter geen effect van in de experimenten, behalve dat het aantal gedoseerde *E. coli* bacteriën hoger werd. Daarom zijn ze wel gebruikt.

F-specifieke RNA-fagen (MS2- ATCC#15597-B1) zijn verkregen via GAP EnviroMicrobial Services.

## 2.8 Analyse van de micro-organismen

*E. coli* werd aangetoond door middel van de NEN-EN-ISO 9308-1 norm op LSA kweekplaten. *Enterococci* zijn volgens de NEN-EN-ISO 7899-2 norm gekweekt op S&B kweekplaten. MS2 fagen werden aangetoond door middel van de NEN-ISO 10705-1 norm op Tryptone-gist extract-glucose agar (TYGA). Hiervoor zijn de watermonsters eerst geconcentreerd met behulp van centricon buizen. Voor alle watermonsters is een verdunningsreeks ingezet met spatel en/of filtratie methode en geïncubeerd bij 36°C. Bij *E. coli* is een voorincubatie op 25°C toegepast. Van elk monster werd de meest telbare verdunning gebruikt.

Het koloniegetal bij 22°C is gemeten op Plate Count-agar (PCA) en incubatie bij 22°C, volgens de NEN-EN-ISO 6222 norm. Van alle monsters is een verdunningsreeks ingezet om vervolgens de meest telbare verdunning te gebruiken.

Adenosinetriphosfaat-(ATP)-gehalte werd aangetoond met behulp van een luminometer. De ATP-meting is gebaseerd op de reactie van luciferine met luciferase die optreedt in aanwezigheid van vrij ATP. Hierbij wordt licht geproduceerd dat wordt gemeten en weergegeven in Relatieve Licht Eenheden (RLE). Vervolgens wordt aan de hand van een vaste omrekeningsfactor het ATP-gehalte in het monster omgezet naar ng ATP/l.

Voor de biofilmmonsters zijn concentraties gecorrigeerd voor het bemonsterde oppervlakte.

### 2.9 Bepalen van afsterving

Zowel *E. coli* als *Enterococci* zijn opgekweekt in arm mineraal medium en zullen naar verwachting nauwelijks afsterven in de 24 uur dat de verontreiniging zich in drinkwater in het pilot distributienet bevindt. Om hiervoor te controleren worden in een controle experiment, tegelijk met het echte experiment, in een fles met hetzelfde drinkwater de drie micro-organismen geïncubeerd. Na 24 uur wordt de afsterving bepaald.

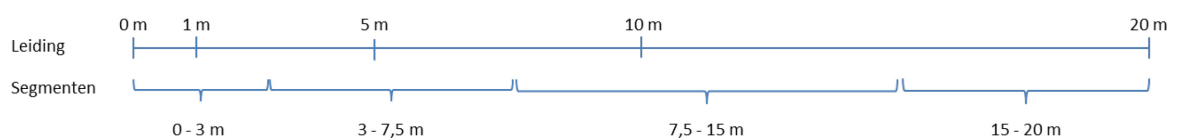
### 2.10 Dataverwerking

De *E. coli* en MS2 resultaten in dit rapport zijn de gemiddelde aantallen zoals die op 3, respectievelijk 2, kweekplaten per monster zijn geteld. Hierbij is de standaarddeviatie gegeven. Voor de *Enterococci*, en in een aantal gevallen voor *E. coli* en MS2, waren de aantallen dusdanig laag dat van deze monsters grotere volumes in enkelvoud zijn gefiltreerd. Hiervan is geen standaarddeviatie berekend. De resultaten worden weergegeven als aantal kve of pve per ml zonder standaarddeviatie.

Om de effectiviteit van de verschillende spuiregimes te kunnen vergelijken, zijn er biomassabalansen gemaakt van het aantal aanwezige micro-organismen in het hele pilot distributienet. Hiervoor zijn de aantallen micro-organismen zoals die op de verschillende monsternamenpunten zijn gemeten geëxtrapoleerd naar de hele proefopstelling. Hierdoor is het mogelijk om log verwijderingen te berekenen en spuiregimes en de mate van verwijdering van de verschillende micro-organismen met elkaar te vergelijken.

Voor de biomassabalans van het water zijn de koloniegetallen van de monsternamenpunten op 1, 5, 10 en 20 meter gebruikt. Deze waarden zijn gebruikt als gemiddelde waarde van het leidingstuk dat om het monsterpunt heen ligt. De leiding is hiervoor in 4 segmenten verdeeld (Figuur 4). Het totaal aantal aanwezige micro-organismen in de waterfase (in kve of pve) is de som van onderstaande getallen:

- kve/ml op 1 meter x 3 meter (afstand 0-3 meter) x 2410 (volume in ml per meter leiding)
- kve/ml op 5 meter x 4.5 meter (afstand 3-7.5 meter) x 2410
- kve/ml op 10 meter x 7.5 meter (afstand 7.5-15 meter) x 2410
- kve/ml op 20 meter x 5 meter (afstand 15-20 meter) x 2410

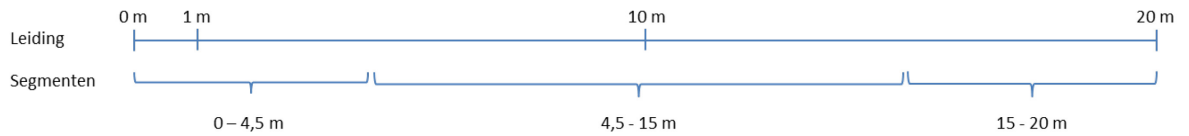


FIGUUR 4. VERDELING VAN DE LEIDING IN SEGMENTEN VOOR HET BEREKENEN VAN DE BIOMASSABALANS VAN DE WATERFASE

Voor de biomassabalans van de biofilm zijn de koloniegetallen van de monsternames op 1, 10 en 20 meter gebruikt. De leiding is daarom in 3 segmenten verdeeld (Figuur 4). Het aantal aanwezige micro-organismen in de biofilm (in kve of pve) is de som van onderstaande getallen:



- $\text{kve/cm}^2$  op 1 meter x 4.5 meter (afstand 0-4.5 meter) x 1740 ( $\text{cm}^2$  buiswand per meter leiding)
- $\text{kve/cm}^2$  op 10 meter x 10.5 meter (afstand 4.5-15 meter) x 1740
- $\text{kve/cm}^2$  op 20 meter x 5 meter (afstand 15-20 meter) x 1740



FIGUUR 5. VERDELING VAN DE LEIDING IN SEGMENTEN VOOR HET BEREKENEN VAN DE BIOMASSABALANS VAN DE BIOFILMFASE

### 2.11 Uitgevoerde experimenten

In totaal zijn er 6 experimenten uitgevoerd in de proefopstelling. Hiervan waren de eerste twee experimenten pilotstudies waarbij alleen *E. coli* bacteriën als verontreiniging aan het distributienet zijn toegevoegd (Tabel 2).

TABEL 2. UITGEVOERDE EXPERIMENTEN IN DE PROEFOPSTELLING

	Verontreiniging (Water/Zand)	Biofilm	Spuisnelheid	Spuivolumes	Sputijd
Pilot A	Water (alleen <i>E. coli</i> )	Nee	1,27 m/s	3,1	50 sec
Pilot B	Water (alleen <i>E. coli</i> )	Ja	1,27 m/s	2,5	40 sec
1	Water + micro-organismen	Ja	1,27 m/s	2,5	40 sec
2	Water + micro-organismen	Ja	1,27 m/s	2,5	40 sec
3	Zand + Water + micro-organismen	Ja	1,27 m/s	2,5	40 sec
4	Water + micro-organismen	Ja	0,45 m/s	0,9	40 sec

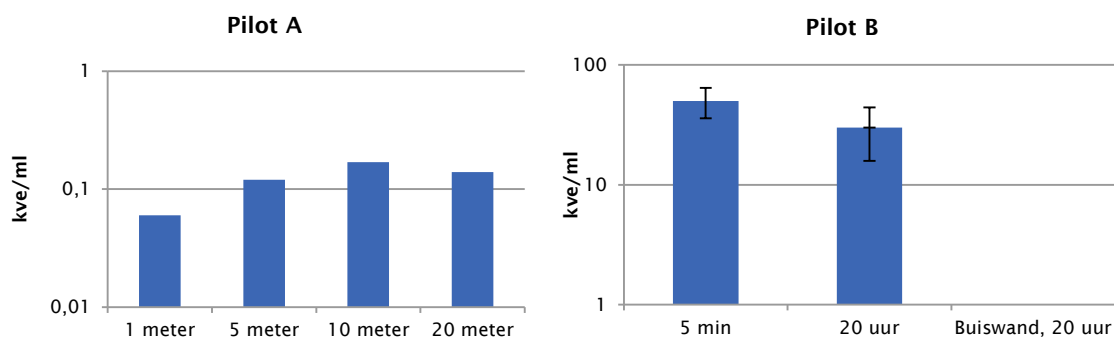
## 3 Resultaten

### 3.1 Pilot A en B

In de eerste twee pilotexperimenten is getest wat het effect is van de aanwezigheid van een biofilm en welke koloniegetallen verwacht kunnen worden tijdens de grotere experimenten. Hiervoor is als verontreiniging *E. coli* toegediend en is een beperkt aantal monsters genomen (Tabel 2).

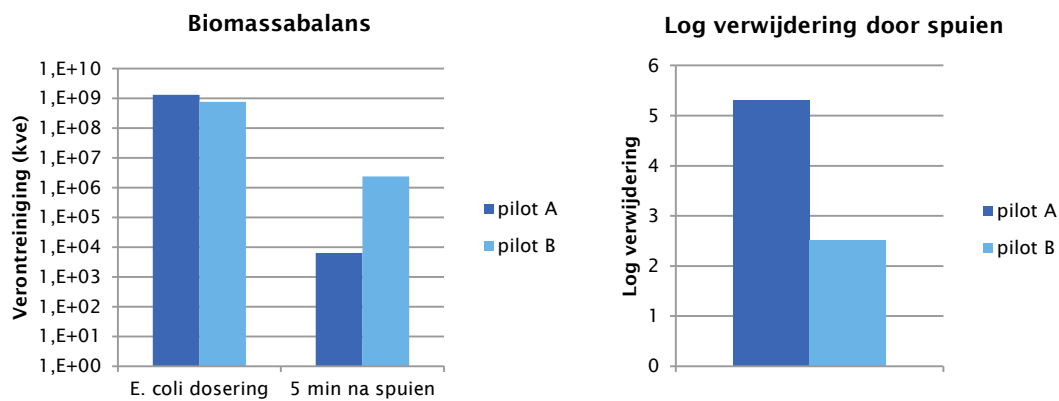
In beide experimenten is gespuid met 1.27 m/s, in pilot A met 3.1 volumes en in pilot B met 2.5 volumes. In pilot A is 5 minuten na spuien op 4 afstandspunten een watermonster genomen. In pilot B zijn op het 20-meter punt monsters genomen na 5 minuten en 20 uur. Na 20 uur is er ook een biofilmmonster genomen. De resultaten staan weergegeven in Figuur 6 en in Bijlage I (Tabel 3, Tabel 5).

In afwezigheid van een biofilm (pilot A) worden *E. coli* bacteriën in het water gevonden op alle afstandspunten. De aantallen zijn laag, maar laten wel zien dat spuien niet alle verontreiniging verwijdert. Omdat het hier gaat om erg lage aantallen maakt dit de onderlinge verschillen tussen de afstandspunten (0.06 vs. 0.17 kve/ml) minder betrouwbaar. In aanwezigheid van een biofilm (pilot B) zijn er 5 minuten en 20 uur na spuien ca. 3 log meer *E. coli* aanwezig in het water vergeleken met pilot A. In de biofilm op 20 meter afstand van het doseerpunt wordt er geen *E. coli* aangetroffen.



FIGUUR 6. *E. COLI* RESULTATEN VAN PILOT A EN B

Het aantal gemeten kve/ml in de proefopstelling is omgerekend naar het totale aantal aanwezige *E. coli* bacteriën in het systeem voor en na spuien (Figuur 7, Bijlage I: Tabel 4, Tabel 6). Dit is de massabalans van het systeem en maakt het mogelijk om de effectiviteit van spuien in log verwijdering weer te kunnen geven. In pilot A geeft spuien een log verwijdering van 5.3. De aanwezigheid van een biofilm in pilot B vermindert de effectiviteit van spuien tot 2.7 log. Dit suggereert dat de aanwezigheid van een biofilm een negatief effect heeft op de verwijdering van *E. coli* door spuien. Mogelijk wordt *E. coli* tijdens het spuien door de biofilm vastgehouden, ondanks dat er op 20 meter afstand van het doseerpunt geen *E. coli* in de biofilm werd gevonden.



FIGUUR 7. EFFECTIVITEIT VAN SPUIEN VAN PILOT A EN B

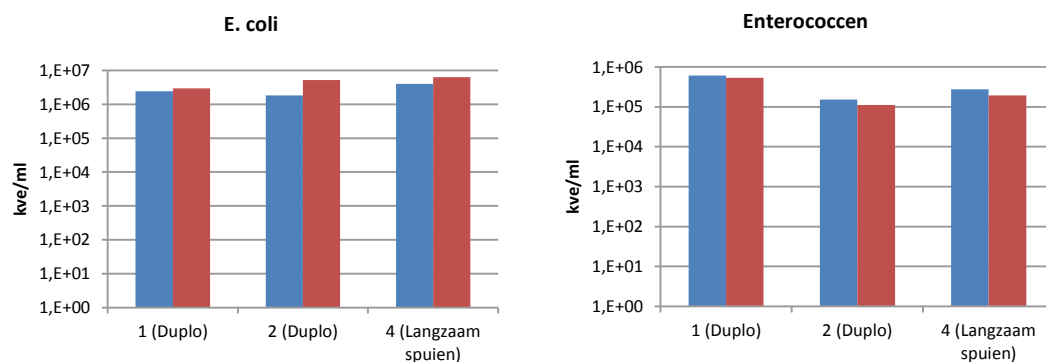
### 3.2 Experiment 1 tot 4

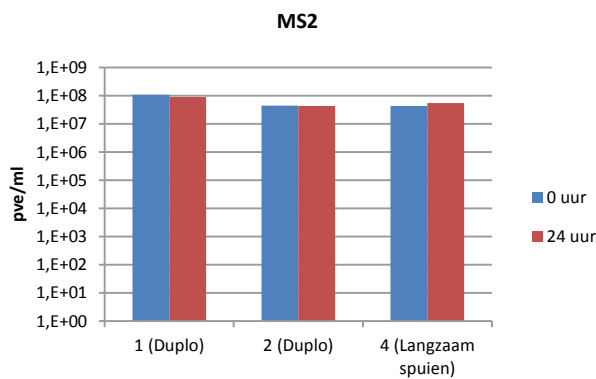
#### 3.2.1 Experimentele opzet

De experimenten 1 tot 4 worden tegelijk besproken om zo de effecten van de spuiregimes en type verontreiniging met elkaar te kunnen vergelijken. De uitgevoerde spuiscenario's per experiment zijn weergegeven in Tabel 2. In experiment 1 tot 3 is een optimaal spuiregime gesimuleerd, waarbij met 1.27 m/s en 2.5 volume is gespuid. In experimenten 1 en 2, duplo's van elkaar, is de verontreiniging toegediend in water. In experiment 3 is de verontreiniging gehecht aan zand en is zowel het zand als het aanhangende water toegediend aan de proefopstelling. In experiment 4 is een situatie gesimuleerd waarin de aanbevolen snelheid en het aantal volumeverversingen niet wordt gehaald maar de spuitijd gelijk blijft aan experiment 1 tot 3 (0.45 m/s en 0.9 volume). De verontreiniging is bij experiment 4 in water aan het distributienet gedoseerd.

#### 3.2.2 Afsterving

Tijdens de experimenten 1, 2 en 4 is een controle experiment uitgevoerd waarin de afsterving van de micro-organismen in het leidingwater is bepaald. Gedurende de 24 uur van het experiment blijft voor alle micro-organismen de concentratie ongeveer gelijk (Figuur 8). Er vindt geen afsterving plaats in 24 uur. Afname van *E. coli*, *Enterococci* en MS2 in de experimenten in het pilot distributiesysteem wordt dus niet veroorzaakt door afsterving.

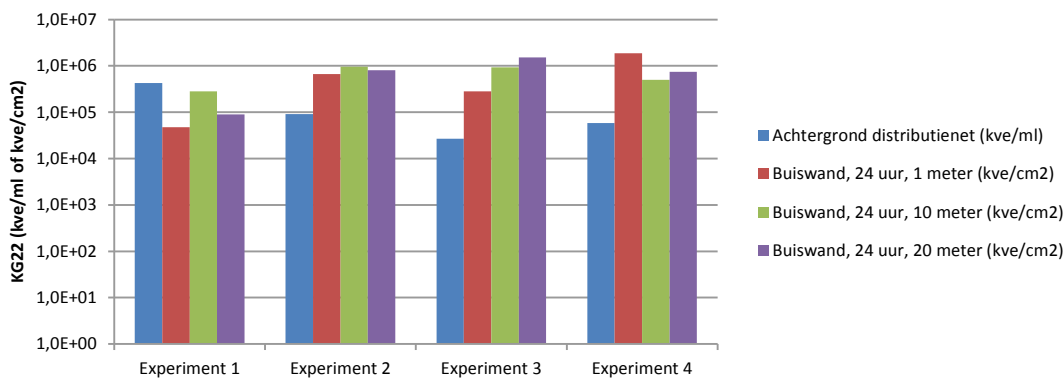




FIGUUR 8. AFSTERING VAN MICRO-ORGANISMEN IN DRINKWATER GEDURENDE 24 UUR

### 3.2.3 Biofilmvorming

Voor elk experiment wordt er een nieuwe biofilm gevormd. Biofilmvorming wordt gemonitord aan de hand van het KG22-getal (Figuur 9). Zoals eerder beschreven wordt een gekweekte biofilm als representatief beschouwd als de KG22 waarden na twee weken hoger zijn dan  $10^4$  kve/cm<sup>2</sup> in de biofilm en  $10^4$  kve/ml in het water (USEPA 2008). Voor alle vier de experimenten ligt het KG22-getal boven deze waarden, waaruit geconcludeerd kan worden dat geschikte en representatieve biofilms worden gevormd, met voldoende potentiële hechtingsplaatsen.



FIGUUR 9. BIOFILMVORMING IN EXPERIMENTEN 1 TOT 4. GEGEVEN IS HET KG22-GETAL VOOR DE WATERFASE VOOR SPIJEN (ACHTERGROND DISTRIBUTIENET) EN OP DE BUISWAND 24 UUR NA SPIJEN, OP DE VERSCHILLENDE AFSTANDEN VAN HET DOSEERPUNT.

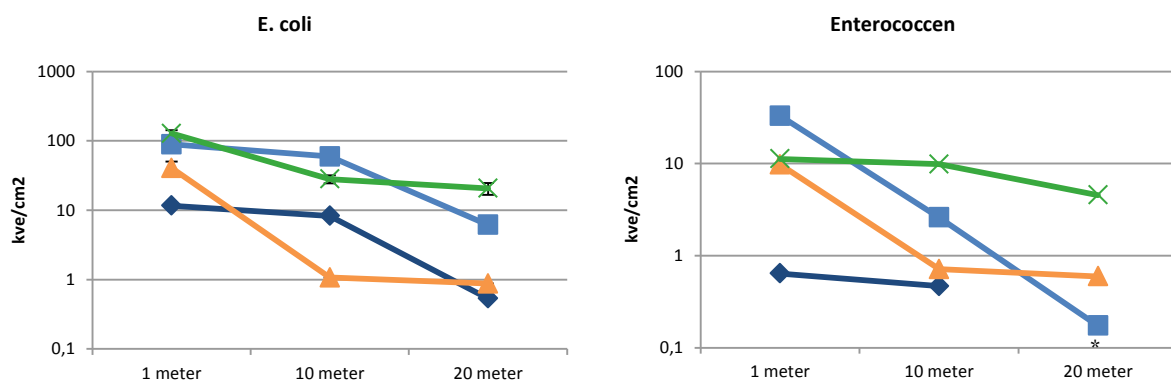
### 3.2.4 Hechting aan de biofilm

Water of zand met micro-organismen wordt toegevoegd aan de lege leiding. Dit sterk verontreinigde water is gedurende een uur voor spuien in de leiding aanwezig. Tijdens dit uur kan er hechting van de micro-organismen aan de biofilm plaatsvinden. Tevens kunnen de micro-organismen die na het spuien nog aanwezig zijn in de waterfase, gedurende de daaropvolgende 24 uur hechten aan de biofilm. Om te bepalen of hechting plaatsvindt 24 uur na spuien de biofilm op 1, 10 en 20 meter van het doseerpunt bemonsterd en geanalyseerd op aanwezigheid van de gedoseerde micro-organismen.

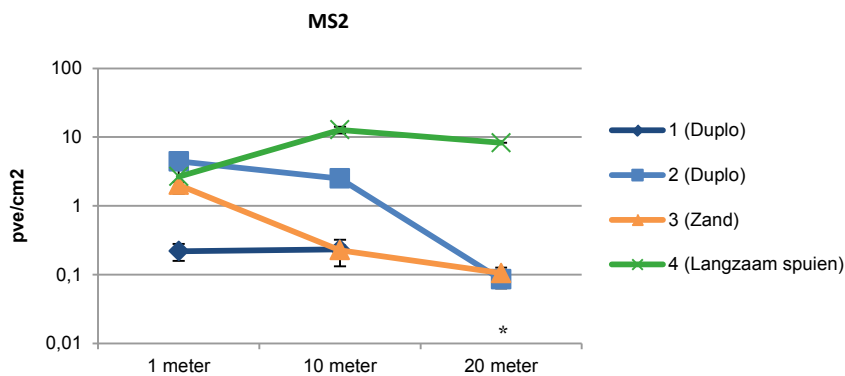
Voor alle experimenten werd veel hechting waargenomen aan de biofilm op 1 meter vanaf het doseerpunt (Figuur 10 en in Bijlage I: Tabel 7, Tabel 13, Tabel 19, Tabel 25). Hierbij varieert de concentratie in de biofilm (genormaliseerd voor de verschillen in dosering) afhankelijk van het soort

micro-organisme en per experiment. De concentratie is het hoogst voor *E. coli* (11,6 - 127,52 kve/cm<sup>2</sup>), gevolgd door de *Enterococce*n (0,6 - 33 kve/cm<sup>2</sup>) en MS2 hechting is het laagst (0,2 - 4,4 pve/cm<sup>2</sup>). De concentratie op de buiswand op 10 meter varieert en vertoont geen duidelijke trend. De enige uitzondering hierop is experiment 3, waarbij de verontreiniging in zand is gedoseerd. Hierbij is duidelijk een 0.5 - 1.5 log lagere concentratie van de drie micro-organismen aanwezig. Bij experimenten 1, 2 en 3 is op 20 meter de concentratie ongeveer 1-2 log lager vergeleken met de concentratie op 1 meter: *E. coli* (0,5 - 20,67 kve/cm<sup>2</sup>), *Enterococce*n (0 - 4,55 kve/cm<sup>2</sup>) en MS2 (0,1 - 0,85 pve/cm<sup>2</sup>). Bij experiment 4, waarbij langzaam is gespuid, vinden de minste veranderingen plaats in de concentratie micro-organismen gehecht aan de biofilm. Experimenten 1 en 2 zijn duplo's van elkaar en laten ook ongeveer dezelfde trend in hechting zien. De gemeten concentraties voor experiment 1 zijn echter 1,0 - 1,5 log lager dan voor experiment 2. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat in experiment 2 een iets uitgebreidere biofilm is gevormd (af te lezen aan het KG22-getal, Figuur 9), waardoor mogelijk meer hechting van de micro-organismen plaats kan vinden.

De resultaten van experiment 3, waarbij de verontreiniging in zand en water is gedoseerd, geven mogelijk een verklaring voor het hoge aantal gehechte micro-organismen op 1 meter en het lage aantal op 20 meter. In experiment 3 is de concentratie in de biofilm op 10 meter voor alle micro-organismen lager dan op 1 meter afstand. Terwijl dit bij de experimenten 1, 2 en 4 meestal niet het geval is. Dit verschil zou veroorzaakt kunnen worden doordat gedurende het uur voor spuien de verontreiniging in zeer geconcentreerde oplossing in het eerste deel van de leiding ligt. De micro-organismen kunnen dan hechten aan de biofilm voordat er gespuid wordt. In experiment 1 en 2 verspreidt het water met daarin de geconcentreerde verontreiniging zich in dit uur tot aan het 10-meter punt en is er op dit punt dus ook een hoge concentratie verontreiniging aanwezig. Het water kan zich niet tot aan het 20-meter punt verspreiden, en daar worden dan ook lagere aantallen micro-organismen waargenomen in de biofilm. Echter, in experiment 3 waarbij zand is toegevoegd, wordt het water tegengehouden door het zand en wordt het 10-meter punt niet, of pas laat en in kleinere hoeveelheden, bereikt (Figuur 11). Hierdoor kunnen er op 1 meter wel veel micro-organismen hechten, maar kan er op 10 en 20 meter veel minder hechting plaats vinden. Dit betekent dat de initiële concentratie micro-organismen in verontreinigd water/of zand van grote invloed is op de hechtingsaantallen van deze micro-organismen aan de biofilm.







FIGUUR 10. HECHTING VAN VERONTREINIGING AAN DE BIOFILM, 24 UUR NA SPUEN. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML. \*: OP HET 20-METERPUNT IN EXPERIMENT 1 ZIJN GEEN *ENTEROCOCCEN* EN MS2 GEDETECTEERD.



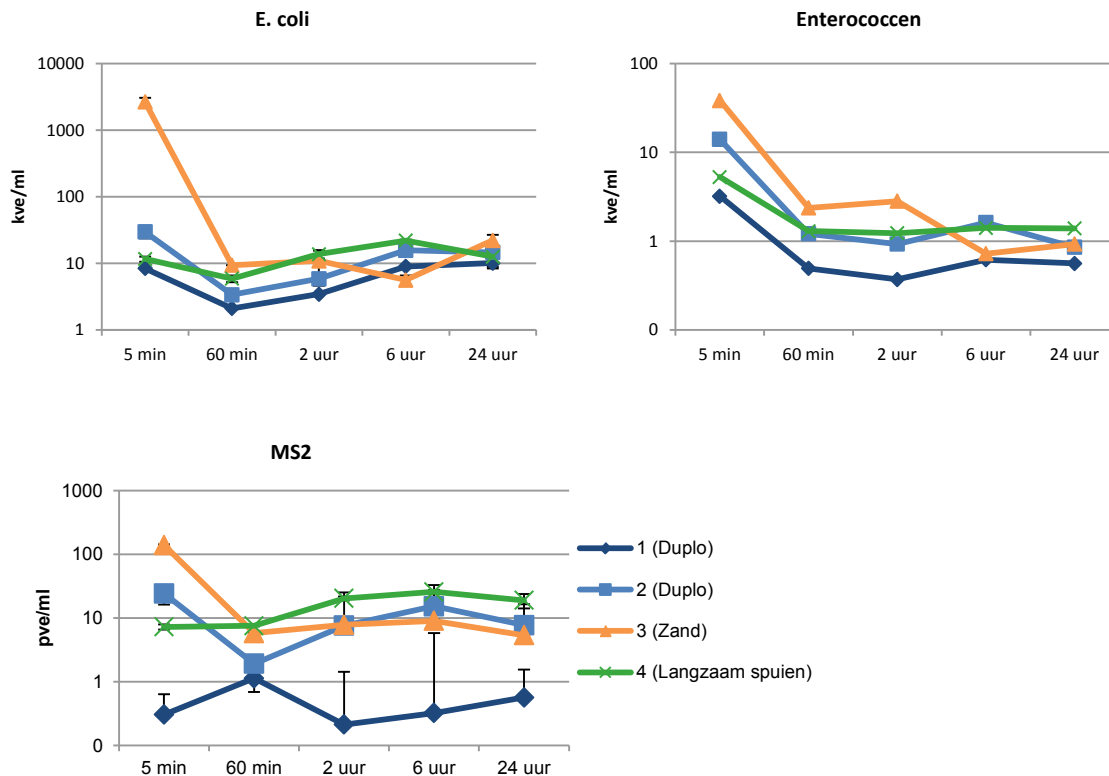
FIGUUR 11. DOSERING VAN ZAND EN WATER IN EXPERIMENT 3. WAARBIJ ZICHTBAAR EEN GEDEELTE VAN HET WATER MET VERONTREINIGING NIET VERDER DE LEIDING IN KAN STROMEN OMDAT HET WORDT TEGENGEHOUDEN DOOR HET ZAND.

### 3.2.5 1-meter punt

Op verschillende tijdstippen na spuien (5 min, 60 min, 2 uur, 6 uur, 24 uur) is er bij het 1-meter monsterpunt een watermonster genomen. Hiervan zijn de aantallen aanwezige *E. coli*, *Enterococcon* en MS2 bepaald (Figuur 12 en in Bijlage I: Tabel 7-9, Tabel 13-15, Tabel 19-21, Tabel 25-27).

Alle micro-organismen zijn duidelijk verlaagd van  $2 \times 10^4$ /ml voor het spuien. Er zijn nog relatief hoge aantallen aanwezig 5 minuten na het spuien. Bij het 60-minuten tijdstip zijn de aantallen in de meeste gevallen ongeveer 1,0 log lager en lijken de micro-organismen uit de waterfase te verdwijnen. Aangezien in dit pilot distributienet de biofilm alleen na 24 uur kan worden bemonsterd, kan geen uitspraak worden gedaan over de mogelijke hechting van deze micro-organismen aan de

biofilm in deze periode. Als er in de tijd na spuien grootschalige hechting van de micro-organismen aan de biofilm plaats vindt, of als micro-organismen loskomen uit de biofilm, zou dit zichtbaar moeten zijn in het aantal micro-organismen dat zich in de waterfase bevindt. Behalve de daling tussen het 5- en 60-minuten tijdstip blijft het aantal micro-organismen in de tijd vrij stabiel, voor *E. coli* rond de 10 kve/ml, de *Enterococce*n rond de 1 kve/ml en MS2 tussen de 1 en 10 pve/ml. Er zijn daarom geen aanwijzingen dat er, na het eerste uur, op grote schaal micro-organismen vrij komen uit, of hechten aan, de biofilm gedurende resterende 24 uur wachttijd. De onverwacht hoge waarden van het 5-minutenpunt suggereert dat er sprake is van een meetartefact. Dit wordt verder besproken in de discussie.



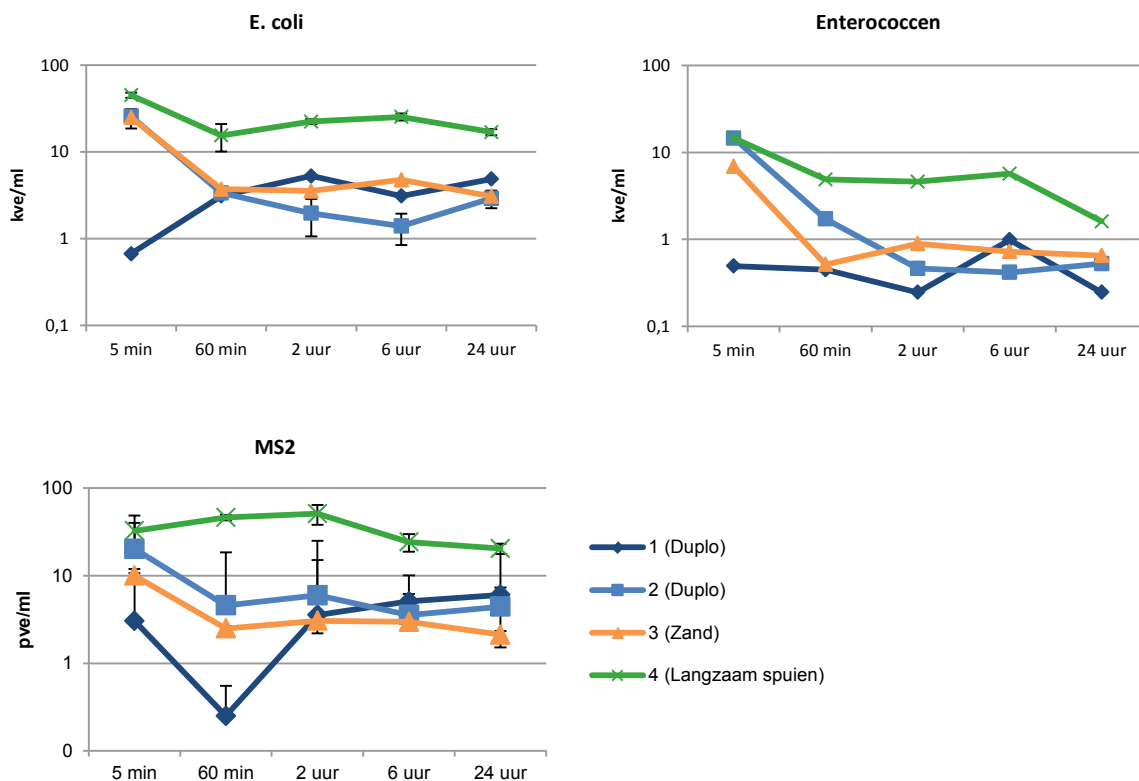
FIGUUR 12. CONCENTRATIE VAN VERONTREINIGING IN HET WATER BIJ HET 1-METER MONSTERPUNT, OP HET VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN NA SPUIEN. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML

### 3.2.6 5-meter punt

Bij experimenten 1, 2 en 3 is op het 5-meter punt eenzelfde beeld zichtbaar als bij het 1-meter punt. Op 5 minuten na spuien is het aantal micro-organismen in de waterfase hoog en dit aantal is met ongeveer 1 log gedaald op het 60-minuten tijdstip (Figuur 13 en in Bijlage I: Tabel 7-9, Tabel 13-15, Tabel 19-21, Tabel 25-27). Vanaf het 60-minuten punt is het signaal weer vrij stabiel, waarbij voor de *E. coli* en MS2 de concentratie in het water tussen 1 en 10 kve of pve/ml ligt, de *Enterococce*n concentratie ligt lager tussen de 0.1 en 1 kve/ml. Het stabiele signaal wijst er ook hier niet op dat er (detecteerbare) uitwisseling van micro-organismen met de biofilm plaatsvindt.

Het effect van het minder goede spuien in experiment 4 is al op 5 meter afstand van het doseerpunt zichtbaar voor de *Enterococce*n en *E. coli* bacteriën. Op alle tijdstippen is de concentratie ongeveer 1 log hoger vergeleken met de eerste drie experimenten. De daling tussen het 5-minuten en 60-minuten punt is ook beperkter. De onverwacht hoge waarden van het 5-minutenpunt wordt verder

besproken in de discussie. Bij MS2 zijn deze verschillen niet aanwezig en is de concentratie gelijk aan die van experiment 1 tot 3.



FIGUUR 13. CONCENTRATIE VAN DE VERONTREINIGING IN HET WATER, BIJ HET 5-METER MONSTERPUNT, IN DE TIJD. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML

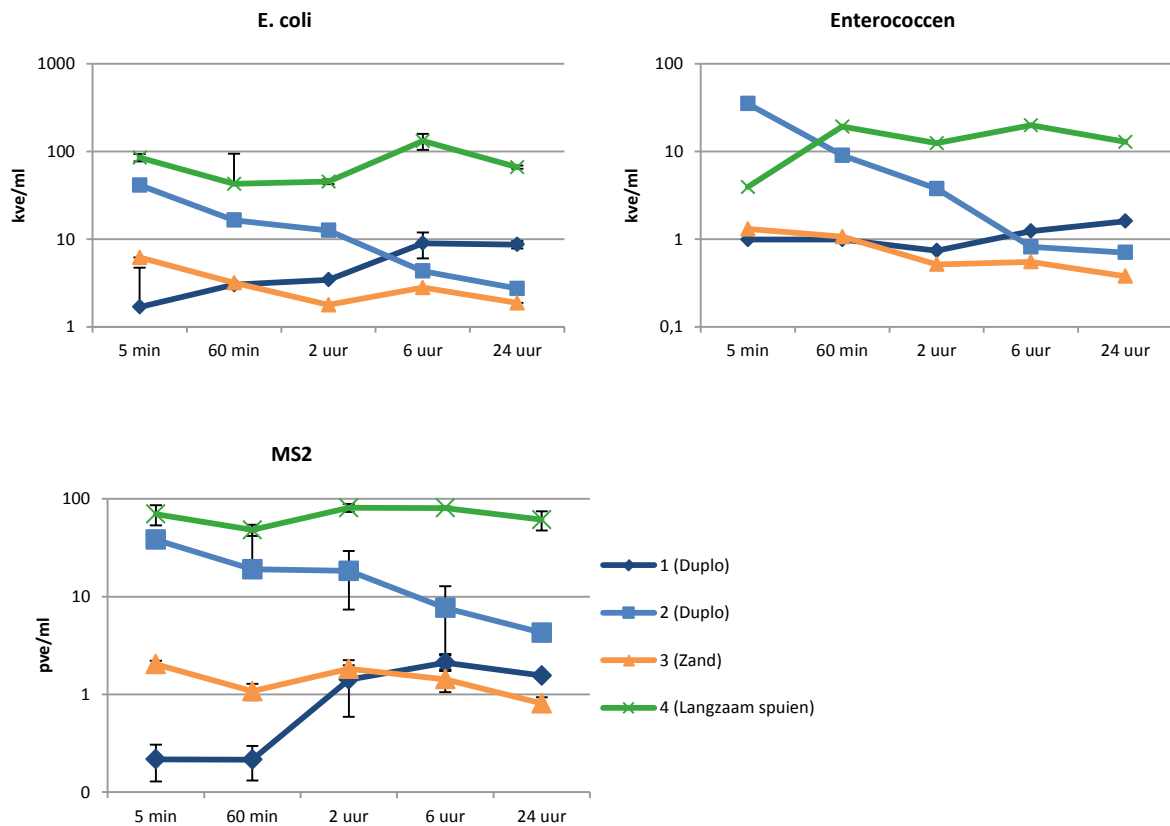
### 3.2.7 10-meter punt

Op het 10-meter punt zijn de aantallen micro-organismen in het water minder stabiel in de tijd (Figuur 14 en in Bijlage I: Tabel 7-9, Tabel 13-15, Tabel 19-21, Tabel 25-27). Het patroon met hogere aantallen micro-organismen op 5 minuten na spuien, zoals te zien was bij de 1- en 5-meter punten, is hier niet aanwezig. Er is wel meer variatie in de tijd, maar deze verschillen per experiment. In experiment 1 stijgt de concentratie met 0,0 - 1,0 log in de tijd, afhankelijk van het micro-organisme. In experiment 2 daalt de concentratie juist met 1,0 - 1,5 log in de tijd, terwijl bij experiment 3 en 4 de concentratie vrij stabiel blijft in de tijd. De reden voor deze verschillen, die alleen zichtbaar zijn op het 10-meter punt, is onbekend.

De variatie in het signaal van experimenten 1 en 2 zou er op kunnen wijzen dat er uitwisseling plaats vindt van micro-organismen tussen de biofilm en het water. De dynamiek is echter tegenovergesteld voor deze twee duplo experimenten: in experiment 1 zouden micro-organismen vrij komen uit de biofilm terwijl in experiment 2 er juist meer hechting plaats vindt. Er is geen verklaring voor dit grote verschil, terwijl voor de andere meetpunten metingen van experimenten 1 en 2 goed overeen komen. In experimenten 3 en 4 is het signaal stabiel en is er geen aanwijzing voor het loslaten van en hechten aan de biofilm van grote aantal micro-organismen in de tijd.

Het verschil tussen goed spuien, in experiment 1 tot 3, en minder goed spuien, in experiment 4, is ook hier zichtbaar in een 1,0 - 1,5 log hogere concentratie micro-organismen vergeleken met de

andere experimenten. Dit verschil komt overeen met het verschil dat is gevonden op het 5-meter punt.

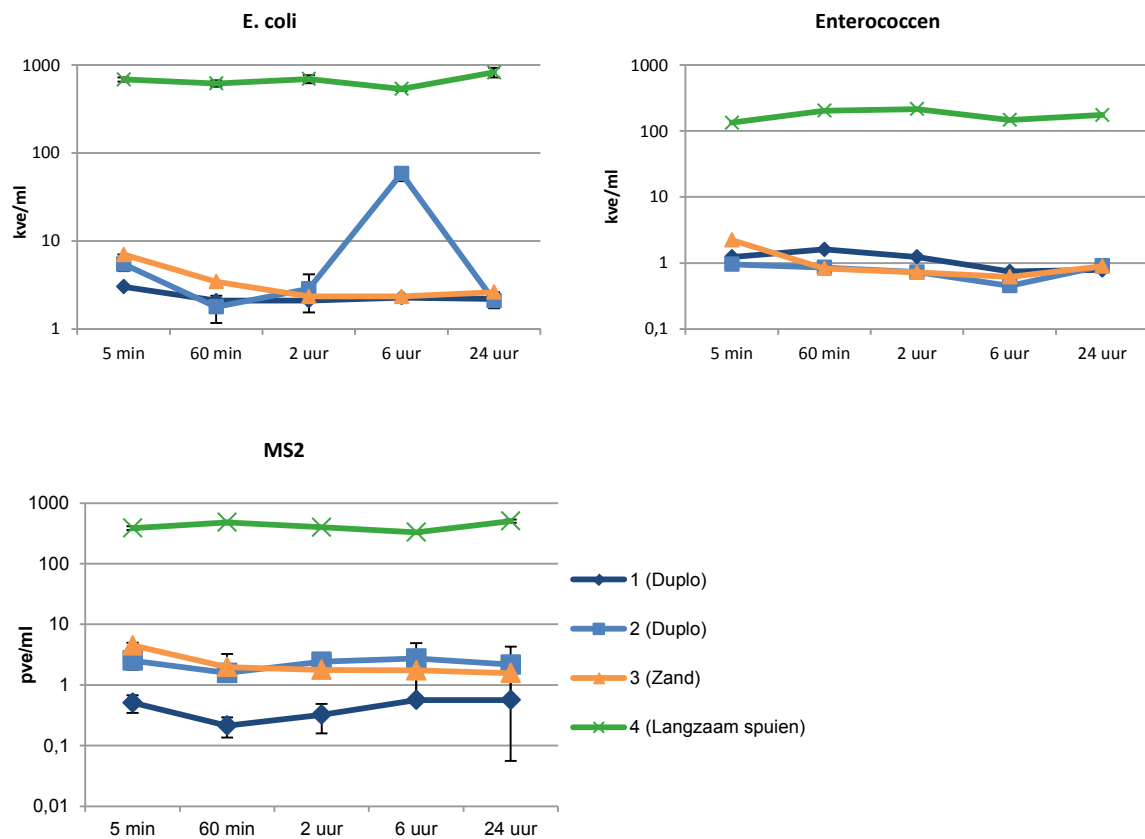


FIGUUR 14. CONCENTRATIE VAN VERONTREINIGING IN HET WATER, BIJ HET 10-METER MONSTERPUNT, IN DE TIJD. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML

### 3.2.8 20-meter punt

Het verschil tussen goed en minder goed spuien is bij het 20-meter punt nog beter zichtbaar (Figuur 15 en in Bijlage I: Tabel 7-9, Tabel 13-15, Tabel 19-21, Tabel 25-27). De aantallen micro-organismen liggen ongeveer 2 log hoger in experiment 4 (*E. coli*: gemiddeld 670 kve/ml; *Enterococci*: gemiddeld 175 kve/ml, MS2: gemiddeld 420 pve/ml) vergeleken met de eerdere experimenten (*E. coli*: ongeveer 5 kve/ml; *Enterococci*: ongeveer 1 kve/ml; MS2: ongeveer 2 pve/ml). In experiment 4 is met 0.9 volumes gespuid, wat inhoudt dat niet de hele leiding is ververs met schoon water. De propverontreiniging is na het spuien dicht bij het 20-meter punt aangekomen, maar nog niet geheel weggespoeld wat de 2 log hogere waarden verklaart.

Vergelijkbaar met de andere afstandspunten, zijn de aantallen micro-organismen in het water vrij stabiel in de tijd. Uitwisseling van lage aantallen micro-organismen tussen de waterfase en biofilm is niet uit te sluiten door de hoge concentratie micro-organismen in de waterfase. Er vindt echter geen grootschalige uitwisseling plaats.



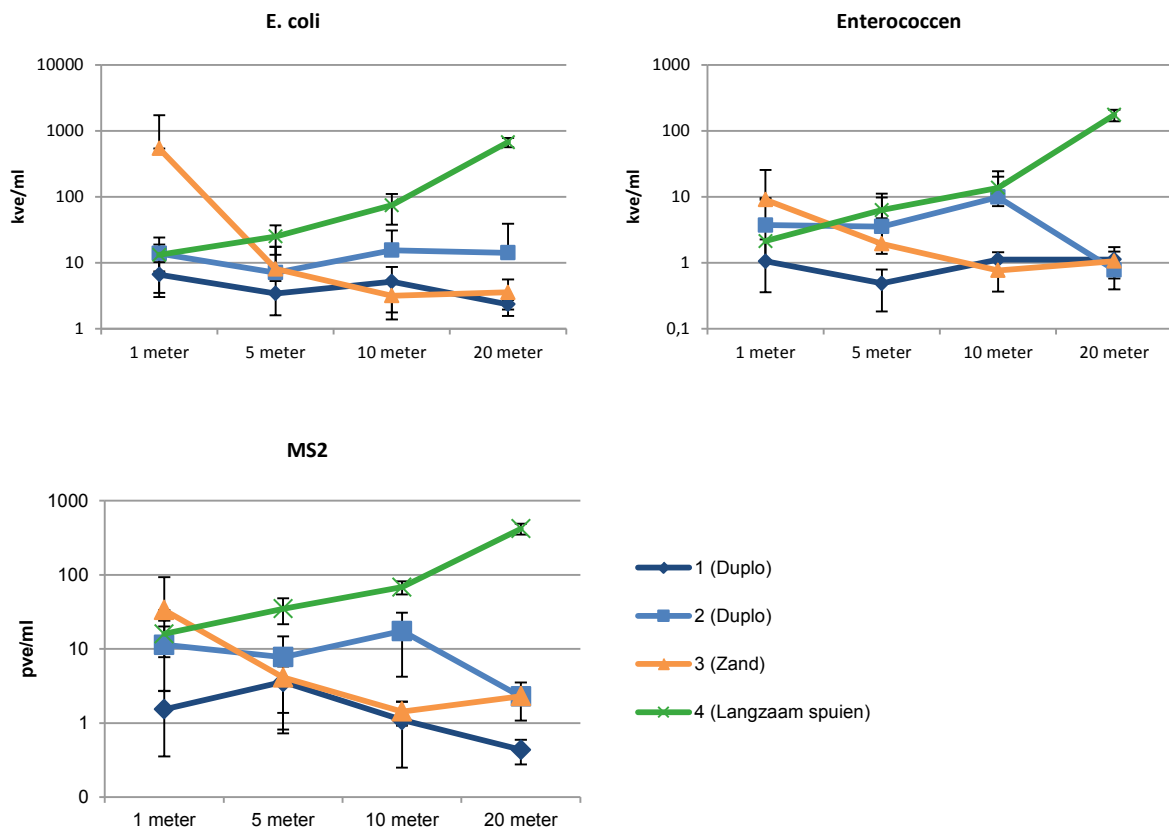
FIGUUR 15. CONCENTRATIE VAN VERONTREINIGING IN HET WATER, BIJ HET 20-METER KRAANTJE, IN DE TIJD. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML

### 3.2.9 Effect van afstand tussen doseer- en monsternamepunt op de concentratie micro-organismen in het water

Om in kaart te brengen wat het effect is van de afstand tussen doseer- en monsternamepunt, zijn de waarden per afstandspunt gemiddeld. De tijd wordt hierbij genegeerd en alleen de afstand van doseer- tot monsternamepunt speelt een rol (Figuur 16, en in Bijlage I: Tabel 12, Tabel 18, Tabel 24, Tabel 30).

In experimenten 1 en 2 speelt de afstand geen rol en zijn de aantallen micro-organismen in het water vrij stabiel (*E. coli*: 2,3 – 15,5 kve/ml; *Enterococci*: 0,5 – 9,9 kve/ml; MS2: 0,5 – 15,5 pve.ml). Bij dosering van zand aan het systeem (experiment 3) zijn er dicht bij het doseerpunt hoge aantallen micro-organismen aanwezig en dalen de waarden naarmate de afstand groter wordt (verschillen tussen 1 en 20 meter punt: *E. coli*: 2,2 log; *Enterococci*: 0,9 log; MS2: 1,1 log). Het “type” verontreiniging (water of zand) is dus van invloed op de aantallen micro-organismen dicht bij de verontreiniging. Op een afstand van 5 meter en verder is dit effect niet meer duidelijk waar te nemen. In experiment 4 is de relatie omgedraaid. Door het minder goede spuien bevindt de verontreiniging zich na het spuien nabij het 20-meter punt wat leidt tot hoge aantallen. Tevens ligt de concentratie micro-organismen dicht bij het doseerpunt lager, de stijging van het 1 tot het 20 meter punt is voor *E. coli*: 1,7 log, *Enterococci*: 1,9 log en voor MS2: 1,4 log.



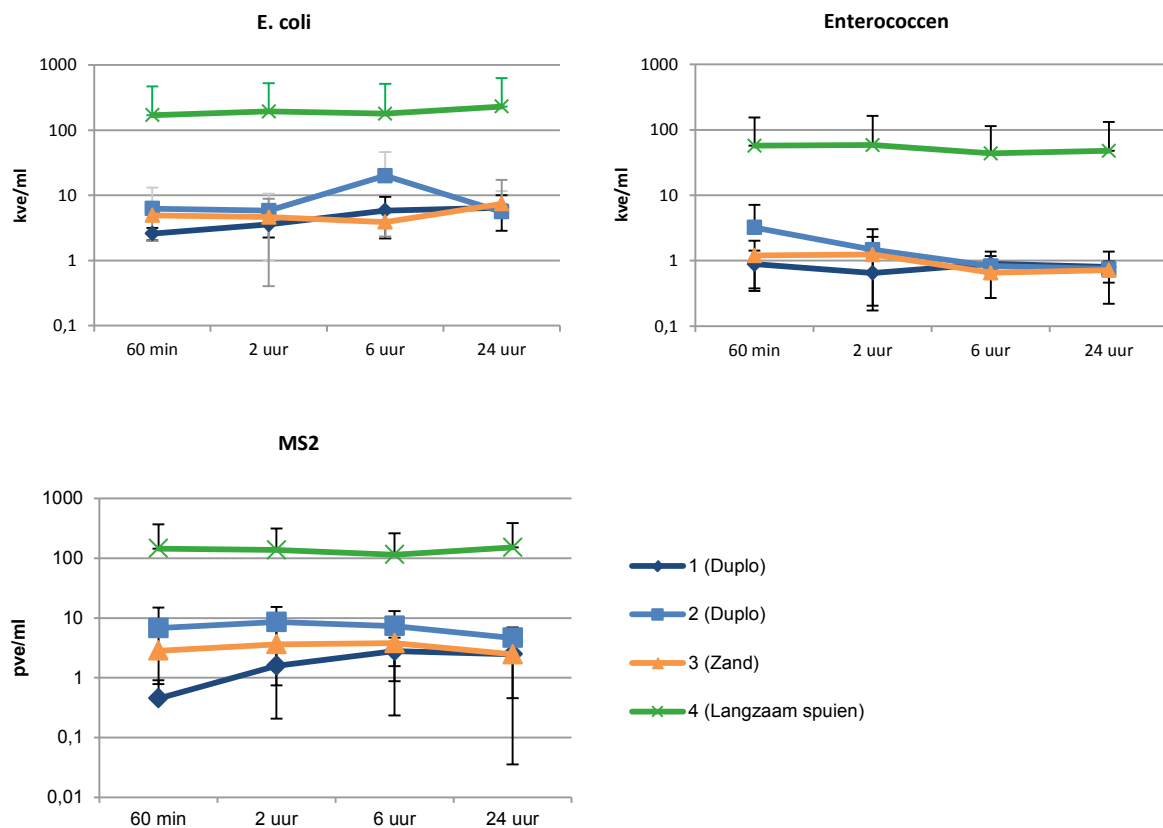


FIGUUR 16. EFFECT VAN AFSTAND VAN MONSTERNAME TOT DOSEERPUNT OP VERONTREINIGING IN DE WATERFASE. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML

### 3.2.10 Effect van tijd tussen spuien en monstername op de concentratie micro-organismen in het water

Om het effect van tijd tussen monstername en spuien in kaart te brengen, zijn de waardes per tijdstip gemiddeld. De afstand tussen doseer- en monsternamepunt wordt hierbij genegeerd (Figuur 17, en in Bijlage I: Tabel 11, Tabel 17, Tabel 23, Tabel 29). Dit geeft een beeld van het effect van de tijd tussen spuien en monstername op de aantallen micro-organismen die aanwezig zijn in het water.

Voor deze grafieken zijn de resultaten na 5 minuten buiten beschouwing gelaten. De onverwacht hoge waardes van de 5-minutenpunten suggereren dat er sprake is van een meetartefact. Dit wordt verder besproken in de discussie. In bijna alle experimenten, voor alle micro-organismen is de concentratie in het water vrij stabiel. Dit bevestigt de eerdere resultaten dat voor geen van de verontreinigingen de tijd tussen spuien en monstername een rol speelt. De concentraties zijn stabiel gedurende de 24 uur dat er gemeten is. Dit bevestigt dat er geen grote aantallen micro-organismen aan de biofilm hechten of loslaten tijdens de wachttijd.

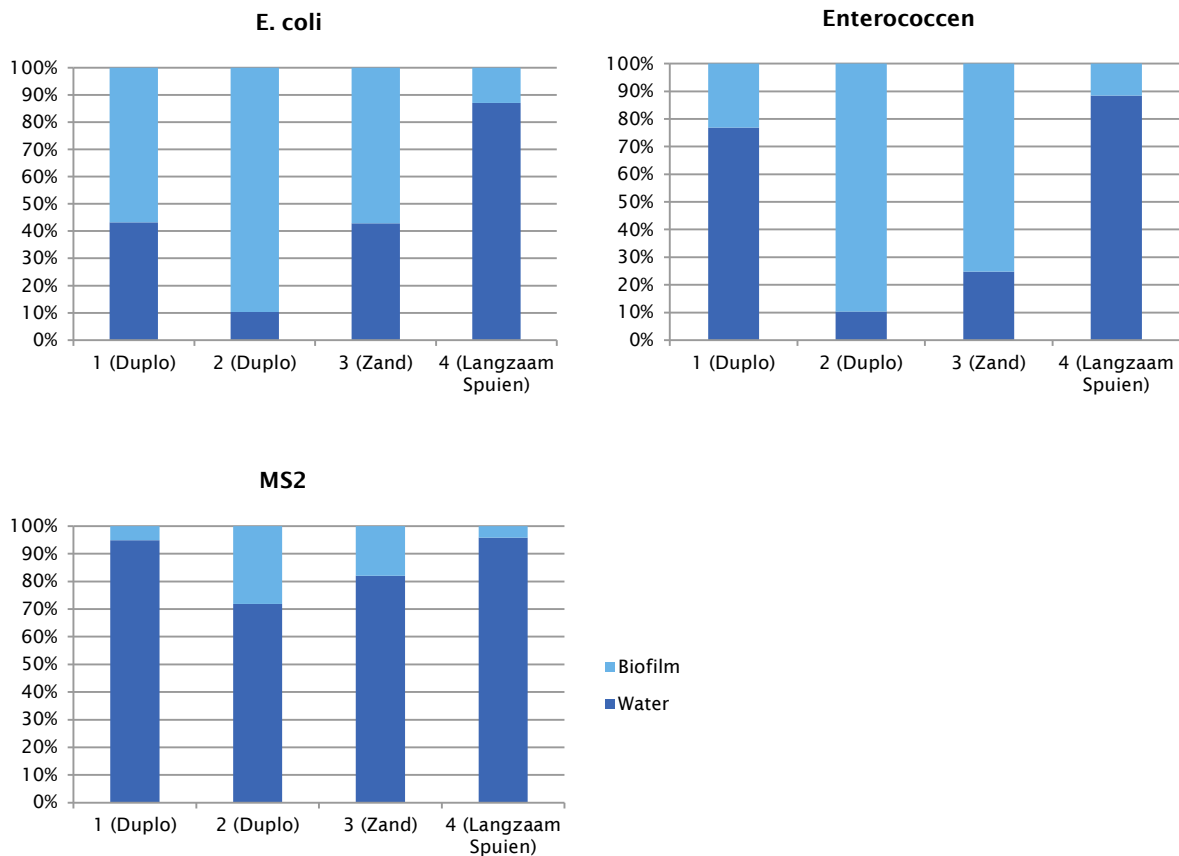


FIGUUR 17. EFFECT VAN TIJD NA SPUEN TOT MONSTERNAME OP VERONTREINIGING IN DE WATERFASE. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML

### 3.2.11 Verdeling micro-organismen over de waterfase en biofilmfase

24 uur na spuien is het enige tijdstip waarop zowel de verontreiniging in de waterfase als in de biofilmfase is gemeten. Dit maakt het mogelijk om, aan de hand van een biomassabalans, een verdeling van de micro-organismen over beide fasen te maken 24 uur na spuien (Figuur 18, en in Bijlage I: Tabel 10, Tabel 16, Tabel 22, Tabel 28). Deze benadering laat zien dat in experimenten 1, 2 en 3 van het totale aantal aanwezige *E. coli* bacteriën na spuien 57 tot 90% gehecht is aan de biofilm na 24 uur. Van de *Enterococci* is 23 tot 90% gehecht en de hechting van MS2 is duidelijk lager met 5 tot 28% hechting. *E. coli* hecht het beste aan de biofilm, gevolgd door *Enterococci*. MS2 fagen hechten nauwelijks aan de biofilm en bevinden zich voornamelijk in de waterfase.

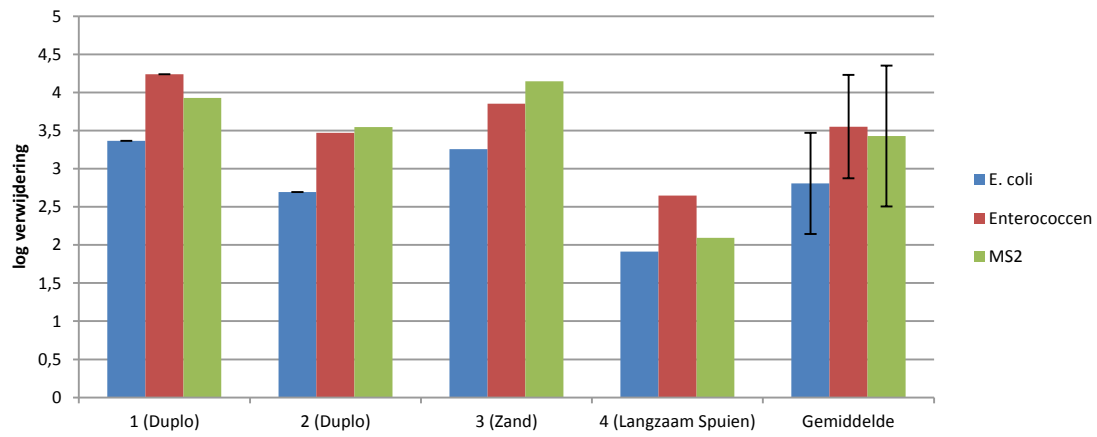
Door het minder goede spuien in experiment 4, 0.9 volumes en 0.45 m/s, is de verontreiniging in de waterfase minder goed verwijderd. Dit is zichtbaar in de hoge percentages verontreiniging in het water van alle drie de organismen (Figuur 18).



FIGUUR 18. VERDELING VAN VERONTREINIGING OVER WATERFASE EN BIOFILM, 24 UUR NA SPUIEN

### 3.2.12 Effectiviteit van spuien op de totale verontreiniging

Om de effectiviteit van spuien te berekenen is voor elk experiment de biomassa-balans berekend op het moment voor spuien (verontreiniging in water) en 24 uur na spuien (verontreiniging in water en gehecht aan de biofilm). Aan de hand hiervan is de effectiviteit van spuien, in log verwijdering, berekend (Figuur 19, en in Bijlage I: Tabel 10, Tabel 16, Tabel 22, Tabel 28). In elk experiment wordt *E. coli* het minst effectief verwijderd (log verwijderingen in experiment 1 tot 3: *E. coli* 2,7 – 3,4 log), maar de verschillen met de verwijdering van *Enterococci* (3,5 – 4,2 log verwijdering) en MS2 (3,6 – 4,2 log verwijdering) zijn klein. De aanwezigheid van zand in experiment 3 lijkt geen effect te hebben op de effectiviteit van het spuien. Het langzaam spuien in experiment 4 leidt tot een 1,5 - 3 log minder verwijdering (*E. coli*: 1,9 log verwijdering; *Enterococci*: 2,7 log; MS2: 2,1 log) vergeleken met spuien volgens de richtlijn zoals in experiment 1 tot 3.



FIGUUR 19. EFFECTIVITEIT VAN SPUIEN, IN LOG VERWIJDERING, OP DE TOTALE VERONTREINIGING. DE GETOONDE RESULTATEN ZIJN GENORMALISEERD NAAR EEN GELIJKE DOSERING VAN  $2 \times 10^4$  KVE/ML

## 4 Conclusie en Discussie

### 4.1 De invloed van afstand tot doseerpunt en de tijd na spuien op de 'pakkans' van micro-organismen in de waterfase

In dit project is onderzocht wat het effect is van de wachttijd tussen spuien en monsternamen op de verspreiding van micro-organismen. Uit alle experimenten blijkt dat variatie in deze tijd geen verschil geeft in het aantal micro-organismen dat aanwezig is in de waterfase.

De afstand tussen doseer- en monsternamenpunt speelt wel een rol die afhankelijk is van het type verontreiniging en het uitgevoerde spuiregime:

- Verontreiniging in de vorm van water en gespuid volgens de richtlijn: afstand speelt geen rol
- Verontreiniging in de vorm van zand en water en gespuid volgens de richtlijn: dicht bij het doseerpunt zijn de hoogste aantallen micro-organismen aanwezig
- Verontreiniging in de vorm van water en niet gespuid volgens de richtlijn: de hoogste aantallen micro-organismen zijn aanwezig op het punt het verst gelegen van het doseerpunt

Dit suggereert dat de 12 tot 24 uur wachttijd zoals nu beschreven in de drinkwaterrichtlijn niet noodzakelijk is en de 'pakkans' niet vergroot. Echter, door de huidige experimentele opzet waarbij hoge aantallen micro-organismen zijn gebruikt, is niet vast te stellen of kleine aantallen micro-organismen los kunnen laten uit de biofilm gedurende de wachttijd en de wachttijd dus wel de pakkans verhoogd. Hiervoor zouden extra experimenten uitgevoerd moeten worden, deze worden verder toegelicht in de aanbevelingen.

### 4.2 Experimentele verbeteringen

Voor bijna alle experimenten zijn de aantallen micro-organismen die gevonden worden op het 1- en 5-meterpunt op 5 minuten na spuien hoog vergeleken met de overige tijds- en afstandpunten. Tussen het 5- en 60-minutenpunt daalt de concentratie micro-organismen in het water sterk waarna de concentratie vrij stabiel blijft in de tijd. Een mogelijkheid zou kunnen zijn dat deze micro-organismen uit de waterfase verdwijnen omdat zij zich hechten aan de biofilm. Dit is in deze proefopstelling niet te verifiëren en valt niet uit te sluiten. Echter, het lijkt onwaarschijnlijk dat de micro-organismen alleen in het eerste uur na spuien aan de biofilm hechten en dat daarna geen hechting meer plaatsvindt. Een andere optie is dat het hier een meetartefact betreft, waarbij de geconcentreerde, toegevoegde verontreiniging in de monsterkraantjes loopt tijdens het uur voor spuien. Tijdens monsternamen wordt het kraantje eerst kort doorspoeld. Desondanks zou dit een verklaring kunnen zijn voor de hogere concentraties. De hogere waarden worden voornamelijk gevonden bij de eerste twee afstandpunten, en dit is ook tot hoe ver de gedoseerde verontreiniging stroomt. De verontreiniging bereikt het 10-meterpunt wel voor er met spuien wordt gestart, maar het gaat hier om kleinere volumes en de verontreiniging is minder lang aanwezig voordat het wordt weggespuid.

Doordat er hoge aantallen micro-organismen worden gedoseerd aan de proefopstelling kan de spui-effectiviteit goed bepaald worden. Na het spuien is de concentratie micro-organismen in het water sterk verlaagd. Er heeft hechting aan de biofilm plaatsgevonden, maar de aantallen in de waterfase bemoeilijken de analyse naar het hechten aan en loskomen uit de biofilm van micro-organismen. De biofilm wordt alleen na 24 uur bemonsterd en door de hoge concentraties in het water is verandering veroorzaakt door hechting of loslaten alleen zichtbaar als dit op grote schaal

gebeurt. De huidige resultaten geven geen aanleiding dat er uitwisseling van grote aantallen micro-organismen tussen het water en de biofilm plaats vindt, maar het valt niet uit te sluiten dat dit wel het geval is voor een beperkt aantal micro-organismen.

#### 4.3 Log verwijderingen door spuien

Spuien met 1,27 m/s en 2,5 volumeverversingen verwijdert een groot deel, maar niet alle micro-organismen uit de leiding. Dit is gemeten in de waterfase gedurende de 24 uur na spuien en de biofilmfase 24 uur na spuien. Het pilot-net is een eenvoudige leiding en dus op alle plaatsen goed te spuien. De verwachting was dat spuien met een schoonwaterfront met deze snelheid en aantal verversingen gesuspendeerde verontreinigingen en gesedimenteerde verontreinigingen zou verwijderen. Het stromingspatroon tijdens spuien was turbulent en blijktbaar wordt het water in het leidingnet daardoor niet volledig verversd. Gemeten aan de hand van de micro-organismen (die een vergelijkbaar beeld geven) blijft er na spuien 0,01 – 0,1% van de verontreiniging in het net achter.

Er zijn enkele andere onderzoeken waarin naar de effectiviteit van spuien is gekeken in het verwijderen van verschillende soorten verontreiniging uit een pilot distributiesysteem. Met een spuiregime van (0.91 m/s en 3 volumes) wordt 2,5 – 3,0 log zand, zonder micro-organismen, van verschillende korrelgroottes (0.25-0.5 mm, 0.5-2 mm, 2-4 mm) verwijderd uit een pilot distributiesysteem (Yang et al. 2015). De aan- of afwezigheid van een kunstmatig gegroeide biofilm speelt hierbij geen rol. Indien er ‘tubercules’ aanwezig zijn op de buiswand, vindt er slechts 1,5 - 2,0 log verwijdering plaats. Dit suggereert dat als verwijdering van zand wordt gebruikt als maat voor verwijdering van micro-organismen, dit geen goede methode is. Het zou wel gebruikt kunnen worden als maat voor de verwijdering van sediment of bijvoorbeeld aarde.

Spui-experimenten (2,3 volumes en 1,3 m/s aan de TU Delft geven 2,0 – 3,0 log verwijdering van *Clostridium* D10 sporen, *E. coli* bacteriën en MS2 fagen. Hierbij is er een kunstmatig gegroeide biofilm aanwezig en is de verontreiniging gedurende twee dagen gecirculeerd in de proefopstelling. Minder snel en lang spuien verlaagd de effectiviteit aanzienlijk. In dit experiment is gespuid met 0.45 m/s en ca 0,9 volumeverversingen. Dan blijft nog ca. 10% van het verontreinigde water in de leiding achter.

#### 4.4 Vergelijking met praktijk

In de hygiëncode is opgenomen dat men na spuien 12-24 uur moet wachten met monsternamen om zo de ‘pakkans’ te vergroten. In deze wachttijd wordt het water in de leiding wel verversd door gebruik via de huishoudens die op de betreffende leidingsectie zijn aangesloten.

Echter, dit wordt niet gedragen door de (beperkte) gegevens die uit de praktijk beschikbaar zijn. Hieruit blijkt dat wanneer zowel 2 uur als 12-24 uur na spuien een watermonster wordt genomen, bij de 12-24 uur minder verontreinigingen gedetecteerd worden en dat de concentratie ook lager is. Uit deze gegevens en modelberekeningen wordt tevens geschat dat een verontreiniging slechts circa 25% kans heeft om daadwerkelijk wordt gedetecteerd, doordat de sectie al verversd is door verbruik.

Uit de hier beschreven experimenten blijkt dat de tijd geen invloed heeft op de concentratie van de verontreiniging in het drinkwater. Een verschil met de praktijk is dat daar sprake is van verversing van het drinkwater, terwijl in deze experimenten een stilstaande leiding is gebruikt waarbij beperkte waterverversing (17%) is opgetreden.

## 5 Aanbevelingen

### Wachttijd monsterneming

De experimenten geven aan dat de pakkans van een verontreiniging onafhankelijk is van de wachttijd (tussen 0 en 24 uur) van de monsterneming. De modelberekeningen en beperkte praktijkgegevens geven aan dat langer wachten met de monsterneming kan leiden tot een lagere pakkans. Dat is aanleiding om de 12-24 uur wachttijd in de Hygiëncode te herzien en te verkorten naar 1 uur. Verdere onderbouwing met praktijkgegevens (monsterneming na 1 en na 12-24 uur) zou waardevol zijn, maar vraagt vanwege het geringe percentage ingrepen waarbij na spuien een verontreiniging wordt aangetroffen een grote meetinspanning.

### Spuien na ingrepen

Deze bevindingen geven aan dat spuien na ingrepen, mits uitgevoerd conform de aanbevelingen (schoonwaterfront, 1,5 m/s en 3 volumeverversingen) een aanzienlijke verlaging van de concentratie micro-organismen die eventueel zijn binnengedrongen kan geven, maar geen volledige verwijdering. Bij lichte verontreinigingen zal dit spuiregime afdoende zijn, bij zwaardere verontreinigingen is dat niet waarschijnlijk. Yang et al. (2015) bepleiten in de VS dat na ingrepen een combinatie van voldoende snel/lang spuien en chloorcontacttijd nodig is om voldoende veilig te zijn na ingrepen. In Nederland werken we meestal zonder chloor. Het is aan te bevelen om bij ingrepen met een risico (zoals nabij lekkend riool) ofwel het spuiregime te verscherpen (langer spuien) ofwel de sectie voldoende te chloreren.

### Rol hechting aan biofilm

Het is nog onbekend in welke mate de verontreinigingen hechten aan en loskomen uit de biofilm. De mate van hechting aan de biofilm is in beperkte mate onderzocht in het BTO-project 'Reinigen distributie na calamiteit'. Het loslaten van verontreinigingen van de biofilm is echter nog niet onderzocht.



## 6 Referenties

Paris, T., Skali-Lami, S. and Block, J.-C. (2009) Probing young drinking water biofilms with hard and soft particles. *Water Res* 43, 117-126.

Hornstra, L. (2015) Hechting en persistentie van indicator- en pathogene micro-organismen in biofilms in drinkwaterdistributiesystemen.

van der Kooij, D., Vrouwenvelder, J.S. and Veenendaal, H.R. (1995) Kinetic Aspects of Biofilm Formation on Surfaces Exposed to Drinking Water. *Water Sci Technol* 32(8), 61-65.

USEPA (2008) Pilot-Scale Tests and Systems Evaluation for the Containment, Treatment, and Decontamination of Selected Materials From T&E Building Pipe Loop Equipment, EPA (United States Environmental Protection Agency).

Yang, J., Schneider, O.D., Jjemba, P.K. and LeChevallier, M.W. (2015) Microbial Risk Modeling for Main Breaks. *Journal AWWA* 107(2), E97-E108.

# Bijlage I

## Pilot A

TABEL 3. PILOT A, GEMETEN *E. COLI* CONCENTRATIES IN KVE/ML

	kve/ml
<b>Gemeten concentratie (totaal kve)</b>	1,32E+09
5 min, 1 meter	0,06
5 min, 5 meter	0,12
5 min, 10 meter	0,17
5 min, 20 meter	0,14

TABEL 4. PILOT A, *E. COLI* MASSABALANS: START VERGELEKEN MET 5 MINUTEN NA SPUIEN

	<i>E. coli</i>
<b>Totaal aanwezige kve, start</b>	1,32E+09
<b>Totaal aanwezige kve, 5 minuten na spuien</b>	6,40E+03
<b>% verwijdering</b>	99,9995
<b>log verwijdering</b>	5,3

## Pilot B

TABEL 5. PILOT B, GEMETEN *E. COLI* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup>

	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>
<b>Gemeten concentratie (totaal kve)</b>	7,70E+06
5 min, 20 meter	50
20 uur, 20 meter	30
Buiswand, 20 uur, 20 meter	0

TABEL 6. PILOT B, *E. COLI* MASSABALANS: START VERGELEKEN MET 5 MINUTEN EN 20 UUR NA SPUIEN

	<i>E. coli</i>
Totaal aanwezige kve, start	7,70E+08
Totaal aanwezige kve, 5 minuten na spuien	2,41E+06
Totaal aanwezige kve, 20 uur na spuien	1,45E+06
% verwijderd, 5 min	99,687013
log verwijdering, 5 min	2,5
% verwijderd, 20 uur	99,812208
log verwijdering, 20 uur	2,7

## Experiment 1

TABEL 7. EXPERIMENT 1, GEMETEN *E. COLI* CONCENTRATIES IN KVE/ML OF KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *E. COLI* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	Genormaliseerde concentratie	
		kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige kve, start	1,2E+10		
Correctiefactor	0,1		
5 min, 1 meter	100	8,4	*
5 min, 5 meter	8	0,7	*
5 min, 10 meter	20	1,7	3,0
5 min, 20 meter	36	3,0	*
60 min, 1 meter	25	2,1	*
60 min, 5 meter	37	3,1	*
60 min, 10 meter	36	3,0	*
60 min, 20 meter	25	2,1	*
2 uur, 1 meter	41	3,4	*
2 uur, 5 meter	63	5,3	*
2 uur, 10 meter	41	3,4	*
2 uur, 20 meter	25	2,1	*
6 uur, 1 meter	107	9,0	*
6 uur, 5 meter	37	3,1	*
6 uur, 10 meter	107	9,0	3,0
6 uur, 20 meter	27	2,3	*
24 uur, 1 meter	120	10,1	1,7
24 uur, 5 meter	58	4,9	*
24 uur, 10 meter	103	8,7	0,8
24 uur, 20 meter	26	2,2	*
Buiswand, 24 uur, 1 meter	139	11,6	3,9
Buiswand, 24 uur, 10 meter	99	8,3	*
Buiswand, 24 uur, 20 meter	6	0,5	4,3

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 8. EXPERIMENT 1, GEMETEN *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		Genormaliseerde concentratie	
	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>		kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige kve, start	8,10E+08			
Correctiefactor	1,2			
5 min, 1 meter	2,6	3,2	*	
5 min, 5 meter	0,4	0,5	*	
5 min, 10 meter	0,8	1,0	*	
5 min, 20 meter	1,0	1,2	*	
60 min, 1 meter	0,4	0,5	*	
60 min, 5 meter	0,4	0,4	*	
60 min, 10 meter	0,8	1,0	*	
60 min, 20 meter	1,3	1,6	*	
2 uur, 1 meter	0,3	0,4	*	
2 uur, 5 meter	0,2	0,2	*	
2 uur, 10 meter	0,6	0,7	*	
2 uur, 20 meter	1,0	1,2	*	
6 uur, 1 meter	0,5	0,6	*	
6 uur, 5 meter	0,8	1,0	*	
6 uur, 10 meter	1,0	1,2	*	
6 uur, 20 meter	0,6	0,7	*	
24 uur, 1 meter	0,5	0,6	*	
24 uur, 5 meter	0,2	0,2	*	
24 uur, 10 meter	1,3	1,6	*	
24 uur, 20 meter	0,6	0,8	*	
Buiswand, 24 uur, 1 meter	0,5	0,6	*	
Buiswand, 24 uur, 10 meter	0,4	0,5	*	
Buiswand, 24 uur, 20 meter	0,0	0,0	*	

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 9. EXPERIMENT 1, GEMETEN MS2 CONCENTRATIES IN PVE/ML EN PVE/CM<sup>2</sup> EN DE MS2 CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 PVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		Genormaliseerde concentratie	
	pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>		pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige pve, start	1,28E+11			
Correctiefactor	0,0078			
5 min, 1 meter	39		0,3	0,3
5 min, 5 meter	390		3,0	8,8
5 min, 10 meter	28		0,2	0,1
5 min, 20 meter	66		0,5	0,2
60 min, 1 meter	145		1,1	0,4
60 min, 5 meter	32		0,3	0,3
60 min, 10 meter	27		0,2	0,1
60 min, 20 meter	27		0,2	0,1
2 uur, 1 meter	137		1,1	1,2
2 uur, 5 meter	455		3,6	11,6
2 uur, 10 meter	182		1,4	0,8
2 uur, 20 meter	42		0,3	0,2
6 uur, 1 meter	440		3,4	5,5
6 uur, 5 meter	650		5,1	1,1
6 uur, 10 meter	271		2,1	0,4
6 uur, 20 meter	73		0,6	0,8
24 uur, 1 meter	221		1,7	1,0
24 uur, 5 meter	775		6,1	11,6
24 uur, 10 meter	199		1,6	0,1
24 uur, 20 meter	73		0,6	0,6
Buiswand, 24 uur, 1 meter	28		0,2	0,1
Buiswand, 24 uur, 10 meter	30		0,2	0,0
Buiswand, 24 uur, 20 meter	<0,2		#VALUE!	0,0
VBNC, 24 uur (1,52 liter)	5,50E+07			

TABEL 10. EXPERIMENT 1, MASSABALANS: START VERGELEKEN MET 24 UUR NA SPUIEN

	<i>E. coli</i>			<i>Enterococcen</i>			MS2		
	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal
Totaal aanwezige kve/pve, start	1,19E+10		1,19E+10	8,12E+08		8,12E+08	1,28E+11		1,28E+11
Totaal aanwezige kve/pve, 60 min na spuien	1,04E+06			3,70E+04			2,22E+06		
Totaal aanwezige kve/pve, 24 uur na spuien	2,25E+06	2,94E+06	5,19E+06	3,66E+04	1,10E+04	4,76E+04	1,45E+07	7,66E+05	1,52E+07
% Biofilm van totaal		56,7			23,1			5,0	
% verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	99,9563			99,9941			99,9881		
log verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	3,36			4,23			3,92		

TABEL 11. EXPERIMENT 1, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER TIJDPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
5 min	3,4	3,4	1,5	1,2	1,0	1,4
60 min	2,6	0,6	0,9	0,5	0,5	0,5
2 uur	3,6	1,3	0,6	0,4	1,6	1,4
6 uur	5,8	3,6	0,9	0,3	2,8	1,9
24 uur	6,5	3,6	0,8	0,6	2,5	2,4

TABEL 12. EXPERIMENT 1, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER MONSTERPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
1 meter	6,6	3,6	1,1	1,2	1,5	1,2
5 meter	3,4	1,8	0,5	0,3	3,6	2,2
10 meter	5,2	3,4	1,1	0,3	1,1	0,9
20 meter	2,3	0,4	1,1	0,4	0,4	0,2

## Experiment 2

TABEL 13. EXPERIMENT 2, GEMETEN *E. COLI* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *E. COLI* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie	Genormaliseerde concentratie	
	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige kve, start	5,25E+09		
Correctiefactor	0,2		
5 min, 1 meter	156	29,7	5,9
5 min, 5 meter	135	25,7	0,6
5 min, 10 meter	217	41,3	16,4
5 min, 20 meter	29	5,5	0,9
60 min, 1 meter	18	3,4	0,2
60 min, 5 meter	18	3,4	0,4
60 min, 10 meter	86	16,4	1,1
60 min, 20 meter	9	1,8	0,6
2 uur, 1 meter	31	5,8	1,2
2 uur, 5 meter	10	2,0	0,9
2 uur, 10 meter	66	12,6	1,0
2 uur, 20 meter	15	2,9	1,3
6 uur, 1 meter	82	15,7	1,2
6 uur, 5 meter	7	1,4	0,5
6 uur, 10 meter	23	4,3	0,8
6 uur, 20 meter	307	58,4	10,5
24 uur, 1 meter	77	14,6	0,1
24 uur, 5 meter	15	2,9	0,7
24 uur, 10 meter	14	2,7	0,7
24 uur, 20 meter	11	2,1	0,4
Buiswand, 24 uur, 1 meter	468	89,1	*
Buiswand, 24 uur, 10 meter	312	59,4	6,0
Buiswand, 24 uur, 20 meter	32	6,1	*

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden



TABEL 14. EXPERIMENT 2, GEMETEN *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		SD
	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	Genormaliseerde concentratie kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	
Totaal aanwezige kve, start	3,99E+08		
Correctiefactor	2,5		
5 min, 1 meter	5,6	14,0	*
5 min, 5 meter	5,8	14,5	*
5 min, 10 meter	14,0	35,1	*
5 min, 20 meter	0,4	1,0	*
60 min, 1 meter	0,5	1,2	*
60 min, 5 meter	0,7	1,7	*
60 min, 10 meter	3,6	9,0	*
60 min, 20 meter	0,3	0,9	*
2 uur, 1 meter	0,4	0,9	*
2 uur, 5 meter	0,2	0,5	*
2 uur, 10 meter	1,5	3,8	*
2 uur, 20 meter	0,3	0,7	*
6 uur, 1 meter	0,6	1,6	*
6 uur, 5 meter	0,2	0,4	*
6 uur, 10 meter	0,3	0,8	*
6 uur, 20 meter	0,2	0,5	*
24 uur, 1 meter	0,3	0,9	*
24 uur, 5 meter	0,2	0,5	*
24 uur, 10 meter	0,3	0,7	*
24 uur, 20 meter	0,4	0,9	*
Buiswand, 24 uur, 1 meter	13,2	33,0	*
Buiswand, 24 uur, 10 meter	1,0	2,6	*
Buiswand, 24 uur, 20 meter	0,1	0,2	*

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 15. EXPERIMENT 2, GEMETEN MS2 CONCENTRATIES IN PVE/ML EN PVE/CM<sup>2</sup> EN DE MS2 CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 PVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie	Genormaliseerde concentratie	
	pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>	pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige pve, start	9,70E+10		
Correctiefactor	0,0103		
5 min, 1 meter	2365	24,4	8,0
5 min, 5 meter	1965	20,3	28,4
5 min, 10 meter	3715	38,3	5,1
5 min, 20 meter	245	2,5	0,7
60 min, 1 meter	186	1,9	0,0
60 min, 5 meter	445	4,6	13,9
60 min, 10 meter	1845	19,0	28,4
60 min, 20 meter	154	1,6	1,7
2 uur, 1 meter	740	7,6	17,5
2 uur, 5 meter	580	6,0	19,0
2 uur, 10 meter	1775	18,3	10,9
2 uur, 20 meter	235	2,4	0,7
6 uur, 1 meter	1490	15,4	17,5
6 uur, 5 meter	345	3,6	6,6
6 uur, 10 meter	745	7,7	5,1
6 uur, 20 meter	265	2,7	2,2
24 uur, 1 meter	750	7,7	8,7
24 uur, 5 meter	430	4,4	2,9
24 uur, 10 meter	415	4,3	0,7
24 uur, 20 meter	211	2,2	2,1
Buiswand, 24 uur, 1 meter	431	4,4	0,2
Buiswand, 24 uur, 10 meter	242	2,5	0,0
Buiswand, 24 uur, 20 meter	8	0,1	0,0

TABEL 16. EXPERIMENT 2, MASSABALANS: START VERGELEKEN MET 24 UUR NA SPUIEN

	<i>E. coli</i>			<i>Enterococcen</i>			MS2		
	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal
Totaal aanwezige kve/pve, start	5,25E+09		5,25E+09	3,99E+08		3,99E+08	9,73E+10		9,73E+10
Totaal aanwezige kve/pve, 60 min na spuien	6,85E+06			8,01E+04			4,14E+07		
Totaal aanwezige kve/pve, 24 uur na spuien	1,11E+06	9,64E+06	1,07E+07	1,41E+04	1,23E+05	1,37E+05	2,01E+07	7,87E+06	2,80E+07
% Biofilm van totaal		89,7			89,7			28,1	
% verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	99,7953			99,9657			99,9712		
log verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	2,69			3,47			3,54		

TABEL 17. EXPERIMENT 2, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER TIJDPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
5 min	25,5	14,9	16,2	14,1	21,4	14,7
60 min	6,2	6,8	3,2	3,9	6,8	8,3
2 uur	5,8	4,8	1,5	1,5	8,6	6,8
6 uur	20,0	26,4	0,8	0,6	7,3	5,8
24 uur	5,6	6,0	0,7	0,2	4,7	2,3

TABEL 18. EXPERIMENT 2, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER MONSTERPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
1 meter	13,8	10,4	3,7	5,8	11,4	8,7
5 meter	7,1	10,4	3,5	6,2	7,8	7,0
10 meter	15,5	15,5	9,9	14,5	17,5	13,3
20 meter	14,1	24,8	0,8	0,2	2,3	0,4

## Experiment 3

TABEL 19. EXPERIMENT 3, GEMETEN *E. COLI* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *E. COLI* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		Genormaliseerde concentratie	
	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>		kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige kve, start	1,07E+10			
Correctiefactor	0,1			
5 min, 1 meter	2,84E+04		2657,3	394,3
5 min, 5 meter	266,7		24,9	6,4
5 min, 10 meter	66,0		6,2	*
5 min, 20 meter	75,0		7,0	*
60 min, 1 meter	100,0		9,3	2,8
60 min, 5 meter	40,0		3,7	*
60 min, 10 meter	34,0		3,2	*
60 min, 20 meter	37,0		3,5	*
2 uur, 1 meter	116,7		10,9	4,6
2 uur, 5 meter	38,0		3,6	*
2 uur, 10 meter	19,0		1,8	*
2 uur, 20 meter	25,0		2,3	*
6 uur, 1 meter	60,0		5,6	0,9
6 uur, 5 meter	51,0		4,8	*
6 uur, 10 meter	30,0		2,8	*
6 uur, 20 meter	25,0		2,3	*
24 uur, 1 meter	236,7		22,1	4,6
24 uur, 5 meter	33,0		3,1	*
24 uur, 10 meter	20,0		1,9	*
24 uur, 20 meter	28,0		2,6	*
Buiswand, 24 uur, 1 meter	432,9		40,5	9,6
Buiswand, 24 uur, 10 meter	11,4		1,1	*
Buiswand, 24 uur, 20 meter	9,4		0,9	*

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 20. EXPERIMENT 3, GEMETEN *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		SD
	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	Genormaliseerde concentratie kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	
Totaal aanwezige kve, start	2,91E+08		
Correctiefactor	3,4		
5 min, 1 meter	11,2	38,5	*
5 min, 5 meter	2,0	6,9	*
5 min, 10 meter	0,4	1,3	*
5 min, 20 meter	0,7	2,2	*
60 min, 1 meter	0,7	2,4	*
60 min, 5 meter	0,2	0,5	*
60 min, 10 meter	0,3	1,1	*
60 min, 20 meter	0,2	0,8	*
2 uur, 1 meter	0,8	2,8	*
2 uur, 5 meter	0,3	0,9	*
2 uur, 10 meter	0,2	0,5	*
2 uur, 20 meter	0,2	0,7	*
6 uur, 1 meter	0,2	0,7	*
6 uur, 5 meter	0,2	0,7	*
6 uur, 10 meter	0,2	0,5	*
6 uur, 20 meter	0,2	0,6	*
24 uur, 1 meter	0,3	0,9	*
24 uur, 5 meter	0,2	0,7	*
24 uur, 10 meter	0,1	0,4	*
24 uur, 20 meter	0,3	0,9	*
Buiswand, 24 uur, 1 meter	2,8	9,8	*
Buiswand, 24 uur, 10 meter	0,2	0,7	*
Buiswand, 24 uur, 20 meter	0,2	0,6	*

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 21. EXPERIMENT 3, GEMETEN MS2 CONCENTRATIES IN PVE/ML EN PVE/CM<sup>2</sup> EN DE MS2 CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 PVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		Genormaliseerde concentratie
	pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>	pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige pve, start	1,72E+11		
Correctiefactor	0,0058		
5 min, 1 meter	24000	139,5	*
5 min, 5 meter	1725	10,0	*
5 min, 10 meter	350	2,0	*
5 min, 20 meter	775	4,5	*
60 min, 1 meter	995	5,8	*
60 min, 5 meter	430	2,5	*
60 min, 10 meter	185	1,1	*
60 min, 20 meter	340	2,0	*
2 uur, 1 meter	1350	7,8	*
2 uur, 5 meter	525	3,1	*
2 uur, 10 meter	313	1,8	*
2 uur, 20 meter	305	1,8	*
6 uur, 1 meter	1555	9,0	*
6 uur, 5 meter	510	3,0	*
6 uur, 10 meter	245	1,4	*
6 uur, 20 meter	300	1,7	*
24 uur, 1 meter	925	5,4	*
24 uur, 5 meter	365	2,1	*
24 uur, 10 meter	139	0,8	*
24 uur, 20 meter	270	1,6	*
Buiswand, 24 uur, 1 meter	348	2,0	*
Buiswand, 24 uur, 10 meter	39	0,2	*
Buiswand, 24 uur, 20 meter	18	0,1	*

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 22. EXPERIMENT 3, MASSABALANS: START VERGELEKEN MET 24 UUR NA SPUIEN

	<i>E. coli</i>			<i>Enterococcen</i>			MS2		
	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal
Totaal aanwezige kve/pve, start	1,15E+10		1,15E+10	2,59E+08		2,59E+08	2,76E+11		2,76E+11
Totaal aanwezige kve/pve, 60 min na spuien	2,22E+06			1,51E+04			1,93E+07		
Totaal aanwezige kve/pve, 24 uur na spuien	2,77E+06	3,68E+06	6,45E+06	9,13E+03	2,75E+04	3,67E+04	1,64E+07	3,60E+06	2,00E+07
% Biofilm van totaal		57,1			75,1			18,0	
% verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	99,9438			99,9858			99,9928		
log verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	3,25			3,85			4,14		

TABEL 23. EXPERIMENT 3, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER TIJDPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
5 min	673,9	1322,3	12,2	17,7	39,0	67,1
60 min	4,9	3,0	1,2	0,8	2,8	2,1
2 uur	4,6	4,2	1,2	1,1	3,6	2,9
6 uur	3,9	1,6	0,7	0,1	3,8	3,6
24 uur	7,4	9,8	0,7	0,3	2,5	2,0

TABEL 24. EXPERIMENT 3, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER MONSTERPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
1 meter	541,1	1183,0	9,1	16,5	33,5	59,3
5 meter	8,0	9,5	1,9	2,8	4,1	3,3
10 meter	3,2	1,8	0,8	0,4	1,4	0,5
20 meter	3,6	2,0	1,1	0,7	2,3	1,2



## Experiment 4

TABEL 25. EXPERIMENT 4, GEMETEN *E. COLI* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *E. COLI* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		Genormaliseerde concentratie	
	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>		kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige kve, start	2,58E+10			
Correctiefactor	0,0388			
5 min, 1 meter	300		11,63	1,0
5 min, 5 meter	1163,3		45,09	2,9
5 min, 10 meter	2196,7		85,14	8,1
5 min, 20 meter	17666,7		684,75	35,2
60 min, 1 meter	152,0		5,89	*
60 min, 5 meter	400,0		15,50	0,7
60 min, 10 meter	1103,3		42,76	5,4
60 min, 20 meter	15933,3		617,57	51,6
2 uur, 1 meter	353,3		13,70	2,0
2 uur, 5 meter	576,7		22,35	1,4
2 uur, 10 meter	1166,7		45,22	2,8
2 uur, 20 meter	17900,0		693,80	70,1
6 uur, 1 meter	566,7		21,96	0,8
6 uur, 5 meter	653,3		25,32	2,3
6 uur, 10 meter	3400,0		131,78	27,1
6 uur, 20 meter	13833,3		536,18	29,6
24 uur, 1 meter	323,3		12,53	3,7
24 uur, 5 meter	436,7		16,93	1,4
24 uur, 10 meter	1710,0		66,28	2,8
24 uur, 20 meter	21300,0		825,58	101,4
Buiswand, 24 uur, 1 meter	3290,0		127,52	15,7
Buiswand, 24 uur, 10 meter	723,8		28,05	3,7
Buiswand, 24 uur, 20 meter	533,3		20,67	4,0

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 26. EXPERIMENT 4, GEMETEN *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIES IN KVE/ML EN KVE/CM<sup>2</sup> EN DE *ENTEROCOCCEN* CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 KVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		SD
	kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	Genormaliseerde concentratie kve/ml of kve/cm <sup>2</sup>	
Totaal aanwezige kve, start	7,39E+08		
Correctiefactor	1,35		
5 min, 1 meter	3,9	5,28	*
5 min, 5 meter	10,8	14,61	*
5 min, 10 meter	2,9	3,92	*
5 min, 20 meter	99,0	133,96	*
60 min, 1 meter	1,0	1,30	*
60 min, 5 meter	3,6	4,87	*
60 min, 10 meter	14,2	19,22	*
60 min, 20 meter	150,0	202,98	*
2 uur, 1 meter	0,9	1,23	*
2 uur, 5 meter	3,4	4,60	*
2 uur, 10 meter	9,2	12,45	*
2 uur, 20 meter	159,0	215,16	*
6 uur, 1 meter	1,0	1,41	*
6 uur, 5 meter	4,2	5,68	*
6 uur, 10 meter	14,7	19,89	*
6 uur, 20 meter	109,0	147,50	*
24 uur, 1 meter	1,0	1,39	*
24 uur, 5 meter	1,2	1,61	*
24 uur, 10 meter	9,5	12,86	*
24 uur, 20 meter	129,0	174,56	*
Buiswand, 24 uur, 1 meter	8,3	11,25	*
Buiswand, 24 uur, 10 meter	7,3	9,84	*
Buiswand, 24 uur, 20 meter	3,4	4,55	*

\*: aantal kve bepaald d.m.v. enkelvoudige filtratie van  $\geq 1$  ml, hierdoor kan geen SD berekend worden

TABEL 27. EXPERIMENT 4, GEMETEN MS2 CONCENTRATIES IN PVE/ML EN PVE/CM<sup>2</sup> EN DE MS2 CONCENTRATIE BIJ NORMALISATIE VOOR DOSERING VAN 1,0E+09 PVE AAN HET SYSTEEM. DE GEBRUIKTE CORRECTIEFACTOR IS GEGEVEN.

	Gemeten concentratie		Genormaliseerde concentratie	
	pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>		pve/ml of pve/cm <sup>2</sup>	SD
Totaal aanwezige pve, start	1,03E+11			
Correctiefactor	0,0097			
5 min, 1 meter	750		7,28	0,7
5 min, 5 meter	3350		32,52	7,6
5 min, 10 meter	7200		69,90	16,5
5 min, 20 meter	39900		387,38	28,8
60 min, 1 meter	780		7,57	0,1
60 min, 5 meter	4750		46,12	3,4
60 min, 10 meter	4950		48,06	6,2
60 min, 20 meter	49450		480,10	32,3
2 uur, 1 meter	2100		20,39	1,4
2 uur, 5 meter	5250		50,97	13,0
2 uur, 10 meter	8350		81,07	7,6
2 uur, 20 meter	41100		399,03	17,8
6 uur, 1 meter	2650		25,73	2,1
6 uur, 5 meter	2500		24,27	5,5
6 uur, 10 meter	8300		80,58	2,7
6 uur, 20 meter	34000		330,10	15,1
24 uur, 1 meter	1950		18,93	4,8
24 uur, 5 meter	2100		20,39	2,7
24 uur, 10 meter	6300		61,17	13,7
24 uur, 20 meter	52000		504,85	28,8
Buiswand, 24 uur, 1 meter	275		2,67	1,2
Buiswand, 24 uur, 10 meter	1314		12,76	1,4
Buiswand, 24 uur, 20 meter	852		8,27	0,0

TABEL 28. EXPERIMENT 4, MASSABALANS: START VERGELEKEN MET 24 UUR NA SPUIEN

	<i>E. coli</i>			<i>Enterococcen</i>			MS2		
	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal
Totaal aanwezige kve/pve, start	2,73E+10		2,73E+10	8,68E+08		8,68E+08	9,91E+10		9,91E+10
Totaal aanwezige kve/pve, 60 min na spuien	2,17E+08			2,11E+06			6,53E+08		
Totaal aanwezige kve/pve, 24 uur na spuien	2,95E+08	4,36E+07	3,38E+08	1,75E+06	2,27E+05	1,97E+06	7,77E+08	3,36E+07	8,11E+08
% Biofilm van totaal		12,9			11,5			4,1	
% verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	98,7615			99,7727			99,1819		
log verwijdering, 24 uur na spuien t.o.v. start	1,91			2,64			2,09		

TABEL 29. EXPERIMENT 4, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER TIJDPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
5 min	207	320	39,4	63	124	177
60 min	170	299	57,1	98	145	224
2 uur	194	334	58,4	105	138	176
6 uur	179	334	43,6	70	115	146
24 uur	230	398	47,6	85	151	236

TABEL 30. EXPERIMENT 4, GEMIDDELDE KOLONIEGETALLEN PER MONSTERPUNT

	<i>E. coli</i>	SD	<i>Enterococcen</i>	SD	MS2	SD
1 meter	13,1	5,8	2,1	1,8	16,0	8,2
5 meter	25,0	11,9	6,3	4,9	34,9	13,4
10 meter	74,2	36,5	13,7	6,5	68,2	13,9
20 meter	671,6	106,8	174,8	34,8	420,3	71,4