

BTO 2016.075 | Augustus 2016

## **BTO** rapport

Effectiviteit van spuien  
en chloren op de  
verwijdering van  
microbiële  
verontreinigingen in het  
distributienet - een  
pilotonderzoek



# BTO

## Effectiviteit van spuien en chloren op de verwijdering van microbiële verontreinigingen in het distributienet - een pilotonderzoek

BTO 2016.075 | Augustus 2016

### Opdrachtnummer

400554-075

### Projectmanager

Luc Hornstra

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Hygiëne en veiligheid

### Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

### Auteur

Nikki van Bel

### Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder medewerkers van BTO-participanten.

**Jaar van publicatie**  
2016

**Meer informatie**  
dr. ir. Nikki van Bel  
T 030 606 9516  
E [nikki.van.bel@kwrwater.nl](mailto:nikki.van.bel@kwrwater.nl)

**Keywords**  
Spuien, chloren, calamiteit, distributienet, biofilm, VBNC

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 2016.075 | Augustus 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

### *Chloren noodzakelijk bij grotere verontreinigingen en wanneer micro-organismen aan de biofilm hechten*

**Auteurs** Dr. Nikki van Bel, Prof. Dr. Gertjan Medema

In een pilot distributienet is getest hoe effectief spuien en chloren zijn voor het verwijderen van een homogeen verdeelde microbiële verontreiniging uit het water en uit de biofilm. Hieruit blijkt dat spuien effectief micro-organismen verwijdert uit het water, maar slechts in zeer beperkte mate uit de biofilm. Chloren doodt micro-organismen in het water en in de biofilm, maar omdat de biofilm bescherming biedt tegen de werking van chloor verloopt de afdoding in de biofilm langzamer. Bij besmettingen met een kleine hoeveelheid micro-organismen voldoet spuien om de besmetting te verwijderen. Bij grotere besmettingen en besmettingen die langer dan één à twee uur in de leiding aanwezig zijn is chloren noodzakelijk, omdat de micro-organismen zich hebben kunnen hechten aan de biofilm. Dit onderzoek heeft meer inzicht gegeven in de (beperkte)mogelijkheden om een verontreinigd distributienet te reinigen en in de effectiviteit van reinigingsmethoden in de praktijk.



*De pilot distributieopstelling met uitneembare coupons die zijn afgedekt met aluminiumfolie. Om de biofilm tijdens het experiment te bemonsteren, zijn steeds de afsluiters rondom één coupon afgesloten om die vervolgens te vervangen door een nieuwe coupon.*



**Belang: aantonen van de effectiviteit van spuien en chloren op micro-organismen in water en biofilm**

Waterbedrijven willen snel en adequaat kunnen reageren bij incidenten of calamiteiten waarbij drinkwater in het distributienet fecaal verontreinigd raakt, om zode gezondheidsrisico's voor de consument te beperken. Daarvoor is inzicht nodig in beschikbare reinigingsmethoden voor het distributienet en hun effectiviteit. Daarom is de effectiviteit onderzocht van spuien en chloren bij een fecale verontreiniging in het drinkwater en de biofilm in het leidingnet.

**Aanpak: testen van het effect van chloren en spuien in een pilot distributieopstelling**

In een pilot distributieopstelling van hard PVC is een biofilm gekweekt om de omstandigheden in de praktijk na te bootsen. Als verontreiniging zijn drie typen micro-organismen aan het leidingnet toegevoegd: *E. coli* bacteriën, sporen van *Clostridium perfringens* D10 en phiX174 fagen. Na een verblijf van 24 uur in het net, waarbij mogelijke hechting van de micro-organismen aan de biofilm is opgetreden, is de distributieopstelling gespuid en vervolgens gechloord. Na het spuien en op verschillende tijdstippen na de dosering van chloor zijn de concentraties micro-organismen in het water en in de biofilm gemeten om zo de effectiviteit van beide reinigingsmethoden te bepalen.

**Resultaten: spuien verwijdert deel verontreiniging uit het water, chloor verwijdert uit water én biofilm**

*E. coli* bacteriën, sporen van *Clostridium perfringens* D10 en phiX174 fagen hechten in verschillende mate aan de biofilm. Deze hechting vindt binnen 6 uur plaats.

Spuien volgens de richtlijn (1,5 m/s en 3 volumes) verwijdert maximaal 3,3 log, maar gemiddeld 1,8 log van een homogeen verdeelde verontreiniging

uit de waterfase. Uit de biofilm wordt slechts 0,5 – 1,0 log verwijderd.

Chloren doodt zeer effectief de micro-organismen in het water af, zodanig dat deze na 6 uur bij een concentratie van 10 mg/l (contacttijd: 3600 mg\*min/l) niet meer detecteerbaar zijn. De biofilm biedt bescherming tegen chloor, waardoor de afdoding langzamer verloopt, maar nog steeds is het zo dat binnen 6 tot 48 uur (contacttijd: 3600 – 28800 mg\*min/l) geen micro-organismen meer worden gedetecteerd.

**Implementatie: chloren noodzakelijk bij grotere verontreinigingen, anders voldoet spuien**

Dit pilotonderzoek leidt tot de volgende aanbevelingen hoe te reageren op incidenten en calamiteiten in het drinkwaterdistributienet:

- Bij verontreiniging met vermoedelijk kleine aantallen indicator-organismen (tot 10 kve/100 ml) voldoet spuien volgens de richtlijn.
- Bij een grotere verontreiniging is chloren met 10 mg/l gedurende 48 uur noodzakelijk. Hierdoor wordt de concentratie van (pathogene) bacteriën en virussen sterk gereduceerd.
- Aanvullend onderzoek op dit gebied, in combinatie met het systematisch verzamelen van praktijkgegevens, kan bijdragen aan meer kennis over en betere beheersing van infectierisico's.

**Rapport**

Dit onderzoek is beschreven in rapport *Effectiviteit van spuien en chloren op de verwijdering van een microbiële verontreiniging in het distributienet – een pilotonderzoek* (BTO 2016.075).

# Inhoud

<b>Inhoud</b>	<b>1</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>3</b>
<b>2 Materiaal &amp; Methoden</b>	<b>4</b>
2.1 Distributieopstelling	4
2.2 Micro-organismen en meetmethoden	7
2.3 Reinigingsmethoden	8
2.4 Biofilm productie	8
2.5 Biofilm bemonstering	9
2.6 Uitvoering van de reinigingsproeven	9
2.7 Stromingsprofielen in het pilot distributienet	9
2.8 Overzicht van experimenten	10
<b>3 Resultaten</b>	<b>11</b>
3.1 Afsterving	11
3.2 Experiment 1	11
3.3 Experiment 2	17
3.4 Experiment 3	24
<b>4 Discussie</b>	<b>31</b>
4.1 Hechtingskarakteristieken	31
4.2 Chloordesinfectie	33
4.3 Effectiviteit van spuien	35
4.4 VBNC <i>E. coli</i>	36
4.5 Toepassing van spuien en chloren in de praktijk	37
<b>5 Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>40</b>
<b>6 Referenties</b>	<b>41</b>
<b>Bijlage I Experiment 1</b>	<b>42</b>
<i>E. coli</i> resultaten	42
<i>Clostridium perfringens</i> D10 resultaten	43
<b>Bijlage II Experiment 2</b>	<b>45</b>
<i>E. coli</i> resultaten	45
<i>E. coli</i> (qPCR) resultaten	46
<i>Clostridium</i> D10 resultaten	48
phiX174 resultaten	49
<b>Bijlage III Experiment 3</b>	<b>52</b>
<i>E. coli</i> resultaten	52
<i>E. coli</i> (qPCR) resultaten	53
<i>Clostridium</i> D10 resultaten	55
phiX174 resultaten	56



# 1 Inleiding

Bij het optreden van een verontreinigingsincident of calamiteit in het drinkwaterdistributienet dient het waterbedrijf snel en adequaat te reageren om gezondheidsrisico's voor de consument te beperken. Het mogelijk verontreinigde deel van het distributiesysteem moet worden gereinigd, maar de mogelijkheden hiervoor zijn beperkt en er is weinig bekend over de effectiviteit van reinigingsmethoden in de praktijk. Na reinigingen moet met waterkwaliteitscontrole worden aangetoond dat de reiniging afdoende was om gezondheidsrisico's te beperken tot een acceptabel niveau.

Het doel van dit project is om vast te stellen hoe effectief de twee meest toegepaste reinigingsmaatregelen – spuien en chloren – zijn. Dit pilotonderzoek bouwt voort op de conclusies van het BTO onderzoek "Strategie bij calamiteiten in het leidingnet" (BTO 2013.056). In het onderzoek wordt genoemd dat in water oplosbare verontreinigingen en sedimentgebonden verontreinigingen verwijderd kunnen worden door systematisch spuien, maar de effectiviteit hiervan is niet onderzocht. Het huidige beeld is dat biofilmgebonden verontreinigingen zich niet goed laten verwijderen door middel van spuien.

Dit project is ook een vervolg op het literatuuronderzoek naar de huidige kennis over hechting en persistentie van micro-organismen aan de biofilm (BTO 2015.058). Hieruit bleek dat micro-organismen zich kunnen hechten aan de biofilm van een drinkwaterdistributiesysteem en dat zij zich daar in infectieuze vorm kunnen handhaven gedurende enkele dagen tot weken. In dit rapport is een uitgebreide introductie te vinden over de interactie tussen (fecale) micro-organismen en de drinkwaterbiofilm.

Het distributiesysteem is een volledig afgesloten omgeving met een continue, hoge waterdruk, waardoor het drinkwater wordt beschermd tegen de introductie van pathogene micro-organismen. Tijdens werkzaamheden aan het drinkwaterdistributienet of bij calamiteiten, zoals een leidingbreuk, kan het drinkwater besmet raken door introductie via besmette grond of (grond)water waarin zich pathogene micro-organismen bevinden. Uit het voorafgaande literatuuronderzoek is gebleken dat deze organismen zich aan de biofilm kunnen hechten. Hechting maakt dat de pathogene micro-organismen moeilijker te verwijderen zijn uit het distributiesysteem en dat alleen spuien mogelijk niet voldoende is om de gehechte pathogene organismen te verwijderen.

In dit rapport is onderzocht wat de effectiviteit is van twee reinigingsmethoden (spuien en chloren) op de aanwezigheid van drie soorten micro-organismen (*E. coli* bacteriën, *Clostridium perfringens* D10 sporen en phiX174 fagen) in het water en de biofilm. Aan de hand hiervan kan worden bepaald welke maatregelen bij welke soort verontreiniging moeten worden genomen om de veiligheid van het water te garanderen.



## 2 Materiaal & Methoden

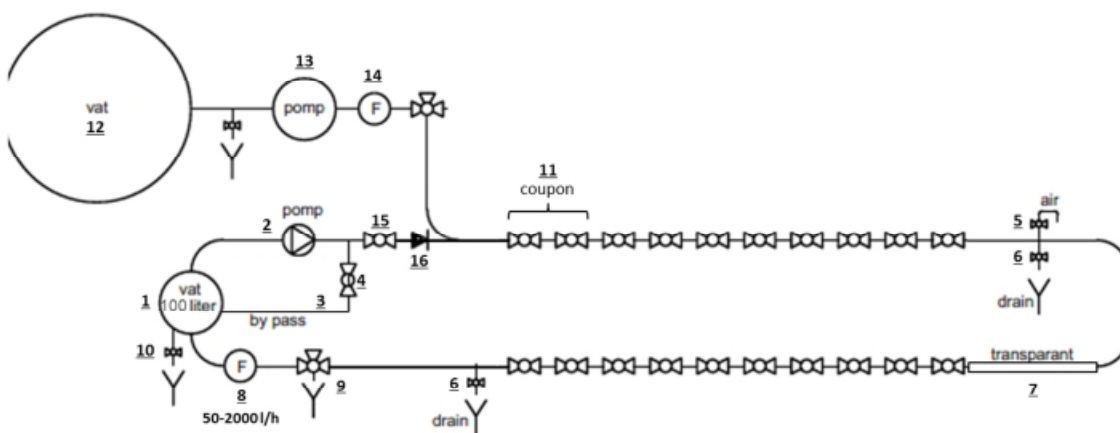
### 2.1 Distributieopstelling

In de proefhal van KWR is een opstelling gebouwd waarmee een drinkwaterdistributiesysteem gesimuleerd wordt. Alle leidingen zijn gemaakt van hard PVC-P (Figuur 1). De hoofdleidingen hebben een buitendiameter van 63 mm en binnendiameter van 54 mm. De overige leidingen, tussen nummer 9 en 15 (Figuur 2), hebben een kleinere diameter (27,2 en 21,2 mm binnendiameter). De coupons met afsluiters zijn afkomstig van eerder onderzoek dat is uitgevoerd aan de TU Delft (Yang, 2014). Het volume van het leidingsysteem is 52,2 liter. Voor de experimenten is gebruik gemaakt van een volume van 80 tot 110 liter, waarbij de overige liters zich dus in het circulatievat bevinden. Voor alle experimenten is gebruik gemaakt van niet-steriel drinkwater van het pompstation Tull en 't Waal.

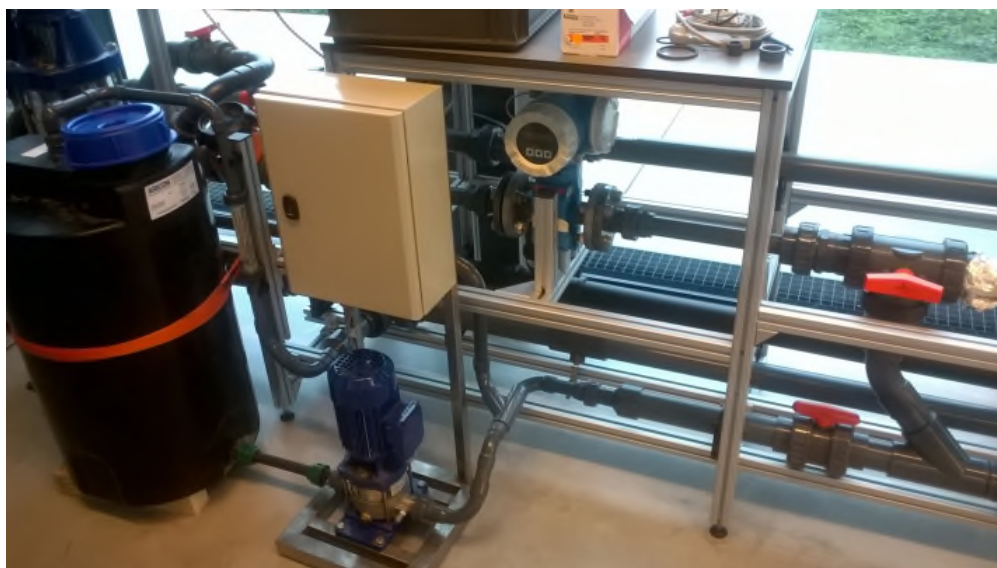


FIGUUR 1. OVERZICHT VAN HET DISTRIBUTIESYSTEEM GEZIEN VAN BEIDE KANTEN. DE ONDERSTE LEIDINGEN BEHOREN TOT DIT PROJECT

Vanuit het circulatievat van 100 liter (1, zie Figuur 2), wordt het water rondgepompt (2) in de proefopstelling op een snelheid van 0,1 m/s (868 l/h). Dit is gelijk aan de gemiddelde snelheid in het distributienet gemeten over 24 uur. Om de flowsnelheid nauwkeurig te kunnen instellen, is er naast de pomp een by-pass (3) gemaakt met daarin een afsluiter (4, zie ook Figuur 3). Er is één ontluchtingskraantje (5) aangebracht om lucht uit het systeem te kunnen laten ontsnappen en via de twee monsterkraantjes (6) kunnen er watermonsters genomen worden. Het gedrag van het water in de proefopstelling kan bekeken worden via het transparante leidingstuk (7). Het water stroomt vervolgens door een tweede set coupons (Figuur 4) en door de flowmeter (8) weer terug naar het circulatievat. Het water valt in het vat, waardoor zuurstof opgenomen kan worden in het water (Figuur 3). Via vier punten kan de opstelling leeg lopen: de twee monsterkraantjes (6), een aansluiting op het riool vlak voor het circulatievat (9) en een aansluiting op het riool vanuit het circulatievat (10).



FIGUUR 2. PILOT DISTRIBUTIEOPSTELLING. DE VERSCHILLENDE ONDERDELEN ZIJN GENUMMERD. 1) CIRCULATIEVAT VAN 100 LITER. 2) CIRCULATIEPOMP. 3) BY-PASS EN 4) DRAAIBARE AFSLUITER OM DE STROOMSNELHEID NAUWKEURIG IN TE KUNNEN STELLEN. 5) ONTLUCHTINGSKRAANTJE. 6) MONSTERKRAANTJE EN AFVOER OP RIOOL. 7) TRANSPARANT LEIDINGDEEL OM STROMINGSGEDRAG TE BEKIJKEN. 8) FLOWMETER. 9) 3-WEG AFSLUITER. 10) AFVOER OP RIOOL. 11) UITNEEMBARE, DOORZICHTIGE COUPONS MET AAN WEERSZIJDE EEN AFSLUITER. DE AFSLUITERS ZITTEN NIET AAN DE COUPONS VAST. 12) SPUI VAT VAN 1000 LITER. 13) SPUIPOMP VOOR HOGE SNELHEDEN. 14) DIGITALE FLOWMETER. 15) AFSLUITER EN 16) TERUGSLAGKLEP OM ER VOOR TE ZORGEN DAT TIJDENS SPUIEN HET WATER IN DE GOEDE RICHTING STROOMT. WERKING VAN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING IS BESCHREVEN IN DE TEKST.



FIGUUR 3. LINKS HET CIRCULATIE VAT, IN HET MIDDEN ONDERIN DE CIRCULATIEPOMP EN NA DE POMP DE AFTAKKING VAN DE BY-PASS

In het distributiesysteem is een serie coupons (11) geplaatst. Deze kunnen individueel afgesloten worden met afsluiters aan beide zijden (Figuur 4). Op deze manier kan er makkelijk, snel en met minimaal waterverlies (volume van 1 coupon: 366 ml) een coupon vervangen worden voor het bemonsteren van de biofilm. De coupons zijn 16 cm lang en gemaakt van transparant materiaal om het bemonsteren van de biofilm te vergemakkelijken. Tijdens het experiment zijn de coupons afgedekt met aluminiumfolie om algengroei te voorkomen.



FIGUUR 4. COUPONS VOOR BEMONSTERING VAN DE BIOFILM. AAN WEERSZIJDEN VAN EEN COUPON ZITTEN AFSLUITERS.

Het grote voorraadvat (12) wordt gebruikt om te spuien. Hieruit pompt een krachtige pomp (13) het water het leidingsysteem in (Figuur 2). Een aparte, digitale, flowmeter (14) meet de spuisnelheid. De afsluiter (15) en terugslagklep (16) voorkomen dat tijdens het spuien het water de verkeerde kant op het distributienet in stroomt (Figuur 5). Er is gekozen om niet het gehele systeem te spuien. De pomp (2) en flowmeter (8) van het circulatiedeel kunnen deze hoge snelheden niet aan en indien er een verontreiniging met zand zou worden gebruikt, kan dit leiden tot een defecte pomp. Het water in het deel dat niet wordt gespuid, wordt handmatig drie keer verversd met 100 liter schoon drinkwater. Na spuien blijft het systeem vol water staan en wordt het water weer gecirculeerd. De benodigde hoeveelheid natriumhypochloriet wordt al roerend toegevoegd aan het circulatievat, op deze manier worden piekconcentraties in het distributiesysteem zoveel mogelijk voorkomen.

Grondstofdoserings voor biofilmvorming (koolstof-, stikstof- en fosfaatbron) en de micro-organismen worden ook aan het circulatievat toegevoegd.



FIGUUR 5. VERBINDING TUSSEN WATERAANVOER VOOR SPUIEN (BOVENSTE LEIDING, LINKS VAN DE 3- WEGKLEP) EN DISTRIBUTIESYSTEEM (ONDER). DE BOVENSTE AFSLUITER STUURT HET WATER OMLAAG HET DISTRIBUTIESYSTEEM IN. DE ONDERSTE AFSLUITER VOORKOMT DAT SPUIWATER IN DE VERKEERDE RICHTING STROOMT

## 2.2 Micro-organismen en meetmethoden

Er is gekozen voor de volgende micro-organismen: *E. coli* WR1 bacteriën, phiX174 fagen en *Clostridium perfringens* D10 sporen. *E. coli* is het referentieorganisme waarvan veel bekend is en waarvan de resultaten eventueel vergeleken kunnen worden met andere onderzoeken. *Clostridium* is gekozen vanwege de productie van sporen die resistent zijn tegen chloor. Voor de fagen is gekozen voor phiX174 in plaats van de vaak gebruikte MS2 faag, omdat uit eerder onderzoek duidelijk werd dat MS2 minder goed hecht aan de biofilm (Yang *et al.*, 2014).

De gekozen concentraties voor de micro-organismen in het systeem zijn afgeleid van eerdere soortgelijke onderzoeken (Yang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014; USEPA, 2008):  $10^6$ /ml *E. coli*,  $10^6$ /ml phiX174,  $10^4$ /ml *Clostridium* sporen.

*Escherichia coli* (WR1) werd opgekweekt in lab lemco broth (LLB) gedurende 72 uur bij 36°C. Om het groeimedium te verwijderen is de bacteriekweek vervolgens gecentrifugeerd, het medium verwijderd en gesuspendeerd in steriel leidingwater. Dit proces is drie maal herhaald waarna het koloniaantal is bepaald op Laurylsulfaat-agar (LSA).

*Clostridium perfringens* (D10) werd opgekweekt op perfringens agar base (PAB). De gevormde kolonies zijn m.b.v. een wattenstaafje overgebracht in steriel leidingwater. Deze oplossing werd vervolgens twee weken geïncubeerd bij 36°C zodat de bacteriën sporen gaan vormen. Voor alle experimenten is één stock van *Clostridium* sporen gebruikt. Deze zijn gedurende de hele periode bewaard bij 4°C. Kort voor de start van elk experiment is de concentratie bepaald.

Somatische colifagen (phiX174) zijn verkregen door een celcultuur van *Escherichia coli* WG5 te infecteren met phiX174 gedurende 5 uur bij 36 °C. Om het groeimedium te verwijderen is de suspensie vervolgens gewassen met centricon buizen. Voor alle experimenten is één phiX174 stock gebruikt. Deze zijn gedurende de hele periode bewaard bij 4°C. Kort voor de start van elk experiment is de concentratie bepaald.

Van de biofilm- en water monsters zijn de volgende parameters geanalyseerd:

Koloniegetal bij 22°C (KG22) werd aangetoond door middel van de NEN-EN-ISO 6222 norm op yeast extract agar en geïncubeerd bij 22°C gedurende drie dagen. Van alle monsters werd een verdunningsreeks ingezet om vervolgens de meest telbare verdunning te gebruiken voor het resultaat.

*Escherichia coli* (WR1) is aangetoond door middel van twee methoden: kweek op LSA volgens de NEN-EN-ISO 9308-1 norm en kwantitatieve PCR van het Hsp-gen.

*Clostridium perfringens* (D10) is volgens de NEN-ISO 6461 norm gekweekt op PAB. *Clostridium perfringens* is voorafgaand aan de kweek 30 minuten op 60 graden verhit om bacteriën af te doden en alleen sporen te tellen. Er werd een verdunningsreeks ingezet met spatel en/of filtratie methode en geïncubeerd bij 36°C. Van elk monster werd de meest telbare verdunning gebruikt voor het resultaat.

phiX174 is aangetoond door middel van de NEN-ISO 10705-2 norm op Modified Scholtens Agar (MSA) en geïncubeerd bij 36°C. Verschillende water monsters werden eerst geconcentreerd met centricon buizen "plus 70". Waarna van alle monsters een verdunningsreeks werd ingezet om vervolgens de meest telbare verdunning te gebruiken voor het resultaat.

### 2.3 Reinigingsmethoden

Er worden twee reinigingsmethodes getest: spuien en chloren. Spuien vindt plaats conform de hygiëncode zoals die aan het begin van het project beschikbaar was (BTO 2001.175, 2<sup>e</sup> editie, december 2010): 2 tot 3 volumeverversingen en een snelheid van 1,0 tot 1,5 m/s. In de nieuwste versie van de hygiëncode wordt inmiddels een minimale spuisnelheid van 1,5 m/s voorgeschreven (PCD 1-4: 2016). Voor chloordesinfectie wordt 10 mg/l natriumhypochloriet rondgepompt in het distributiesysteem gedurende maximaal 48 uur. Op aangegeven tijdstippen wordt een water- en biofilmmonster genomen en worden ook de totale en vrije chloorconcentraties gemeten gebaseerd op fotometrie (Hach, LCK310). Om het aanwezige chloor weg te vangen, wordt er direct na monsternamen natriumthiosulfaat toegevoegd. De monsters zijn vervolgens binnen 4 uur geanalyseerd.

Na afronding van elk experiment wordt het distributiesysteem schoongemaakt met 200 mg/l natriumhypochloriet gedurende 2,5 uur. Aangenomen wordt dat met een nieuwe chloordosering alle nog aanwezige micro-organismen worden gedood. Om de biofilm te verwijderen is de opstelling vervolgens schoongemaakt d.m.v. 10 g/l SDS (sodium dodecyl sulfaat) en 30 g/l citroenzuur.

### 2.4 Biofilm productie

In de praktijk situatie is er altijd een biofilm aanwezig op de buiswand van drinkwaterleidingen. Dit wordt gesimuleerd door in twee weken een reproduceerbare biofilm te kweken in de pilot distributieopstelling. Hiervoor wordt er aan het drinkwater koolstof (10 µg C/l), stikstof (2 µg N/l) en fosfaat (0,1 µg P/l) gedoseerd. Na twee weken wordt de gevormde biofilm geanalyseerd op het koloniegetal bij 22°C (KG22) en de aanwezige

concentratie mangaan en ijzer als (in)organische parameters van de biofilm. Bij KG22-waardes van  $10^4$ - $10^5$  kve/ml in het water of  $10^4$ - $10^5$  kve/cm<sup>2</sup> in de biofilm wordt de biofilm beschouwd als een representatieve, levende biofilm (USEPA, 2008).

## 2.5 Biofilm bemonstering

Om de biofilm van de uitgenomen leidingstukken te verwijderen, werd een afgemeten deel van het segment met wattenstaafjes gewabt. De wattenstaafjes zijn gepoold in steriel leidingwater. De biofilm is via een gestandaardiseerd protocol losgetrild van de wattenstaafjes door vier LES (Lage Energie Sonificatie) behandelingen met ultrasoon geluid uit te voeren gedurende 2 minuten bij een frequentie van 40 kHz.

## 2.6 Uitvoering van de reinigingsproeven

Na elk experiment (en voor de start van het eerste experiment) is het distributiesysteem schoongemaakt met een hoge concentratie chloor en met SDS en citroenzuur. Hierna wordt het systeem doorspoeld met 500 liter drinkwater en wordt het distributiesysteem gevuld met drinkwater waaraan koolstof, stikstof en fosfaat is gedoseerd. Na 2 weken circulatie wordt het systeem gelegegd, doorspoeld met 500 liter drinkwater en gevuld met 80 – 110 liter drinkwater. De verontreiniging wordt toegevoegd en gedurende 24 uur gecirculeerd. Er is gekozen voor 24 uur circulatie, omdat in dit onderzoek met name het effect van de reinigingsmaatregelen op verontreiniging in de biofilm wordt onderzocht. Door voor een lange circulatietijd te kiezen, is zeker dat er hoge aantallen micro-organismen in de biofilm aanwezig zijn en de effectiviteit van spuien en chloren goed kan worden getest. Het distributiesysteem wordt vervolgens gespuid en het water in de circulatietank wordt handmatig drie maal met 100 liter ververst. Er wordt een monster genomen van het water en de biofilm waarna de watercirculatie wordt hervat. Hierna wordt het natriumhypochloriet toegevoegd en worden op de aangegeven tijden water- en biofilmmonsters genomen. Per meetpunt is er één water- en één biofilmmonster genomen. Na het laatste tijdstip wordt het distributiesysteem gelegegd en wordt het systeem schoongemaakt.

## 2.7 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 geteste snelheden (Tabel 1). Bij stroomsnelheden tot 0,03 m/s is de stroming laminair en vanaf 0,07 m/s is deze turbulent. Zowel tijdens het circuleren (0,1 m/s) als tijdens het spuien (1,0 en 1,5 m/s) is er een turbulente stroming in de distributieopstelling.

Het Reynold's Getal is als volgt berekend:  $Re = \rho \cdot v \cdot D / \mu$

$\rho$  = de dichtheid in kg/m<sup>3</sup> (998,2 kg/m<sup>3</sup>)

$v$  = de snelheid in m/s

$D$  = de inwendige diameter van de leiding in meters (0,0554 m)

$\mu$  = de dynamische viscositeit uitgedrukt in kg/[m.s] ( $1,002 \cdot 10^{-3}$  kgm<sup>-1</sup>sec<sup>-1</sup>)



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
1,0	57886	Turbulent
1,27	73516	Turbulent
1,5	86829	Turbulent

## 2.8 Overzicht van experimenten

In Tabel 2 is een overzicht gegeven van alle uitgevoerde experimenten.

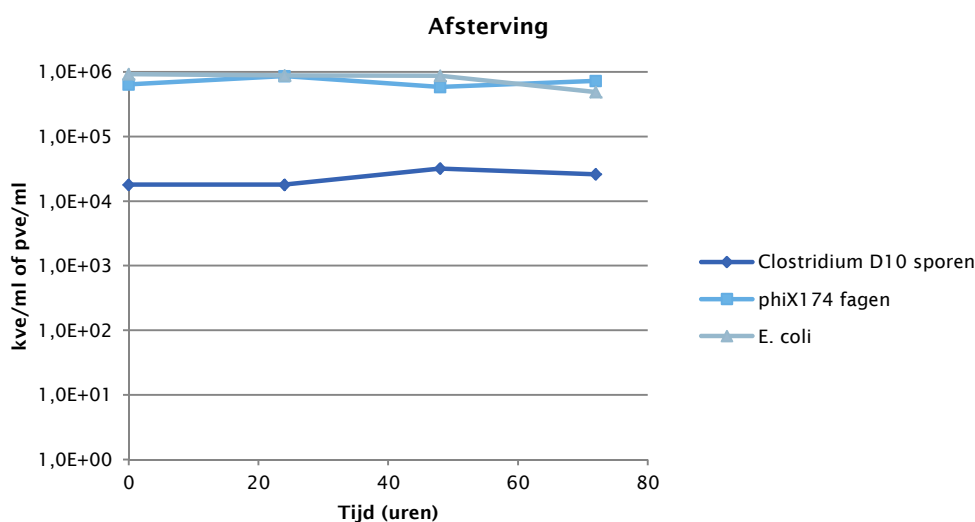
TABEL 2. OVERZICHT VAN DE UITGEVOERDE REINIGINGSEXPERIMENTEN

Experiment	Micro-organismen	Spuien	Chloren
1	7,5*10 <sup>10</sup> kve <i>E. coli</i> 2,6*10 <sup>8</sup> kve <i>Clostridium</i> D10	1,5 m/s, 3 vol	10 mg/l, 0 - 48 uur
2	6,3*10 <sup>10</sup> kve <i>E. coli</i> 9,7*10 <sup>8</sup> kve <i>Clostridium</i> D10 1,2*10 <sup>11</sup> pve phiX174 fagen	1,5 m/s, 3 vol	10,5 mg/l, 0 - 48 uur
3	9,1*10 <sup>10</sup> kve <i>E. coli</i> 1,6*10 <sup>9</sup> kve <i>Clostridium</i> D10 5,9*10 <sup>10</sup> pve phiX174 fagen	1,0 m/s, 3 vol; 1,5 m/s, 3 vol; 1,5 m/s, 3 vol; 1,5 m/s, 3 vol.	-

## 3 Resultaten

### 3.1 Afsterving

Om uit te sluiten dat eventuele verschillen in aantallen micro-organismen in de proefopstelling veroorzaakt worden door afsterving, zijn *E. coli*, *Clostridium* D10 sporen en de phiX174 fagen in een 2-liter fles gedoseerd aan drinkwater. De startconcentratie hierbij is gelijk als die in de proefopstelling. Vervolgens is in de tijd gemeten of er vermindering van het aantal kweekbare bacteriën en sporen plaatsvindt (Figuur 6). In 72 uur is er bij 22°C nauwelijks effect op het aantal kweekbare micro-organismen.



FIGUUR 6. AFSTERVING VAN MICRO-ORGANISMEN IN DRINKWATER GEDURENDE 72 UUR BIJ 22°C

### 3.2 Experiment 1

#### 3.2.1 Experimentele procedure

In het eerste experiment is het effect van spuien (3 volumes, 1,5 m/s) en chloren (10 mg/l) getest op verwijdering van *E. coli* bacteriën en *Clostridium* D10 sporen uit de proefopstelling. De parameters van het experiment staan in Tabel 3.

Na dosering van de verontreiniging en 24 uur circulatie is het systeem gespuid. 5 minuten na spuien is het monster 'na spuien' genomen. Daarna is chloor toegevoegd aan het circulatievat en is op verschillende tijdstippen een water- en biofilmmonster genomen en is de chloorconcentratie in de distributieopstelling bepaald.

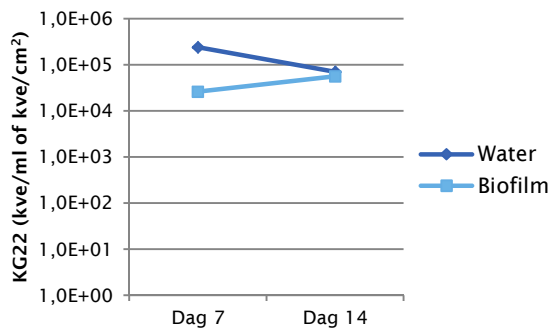
TABEL 3. PARAMETERS EXPERIMENT 1

Hechting	Stroom-snelheid	<i>E. coli</i> (kve)	<i>Clostridium</i> D10 sporen (kve)	Spuien	Chloren
24 uur	0,1 m/s	$7,5 \cdot 10^{10}$	$2,6 \cdot 10^8$	1,5 m/s, 3 volumes	10 mg/l, 48 uur

### 3.2.2 Biofilmvorming

Het koloniegetal bij 22°C (KG22) is bepaald in het water en in de biofilm van de proefopstelling om de aanwezigheid en groei van de biofilm te kunnen monitoren. In de literatuur wordt gesproken over een grenswaarde van  $10^4$  kve/ml of  $10^4$  kve/cm<sup>2</sup> als maat voor een geschikte biofilm (USEPA, 2008).

In Figuur 7 is te zien dat er, na dosering van koolstof, stikstof en fosfaat, in 14 dagen een geschikte biofilm wordt gevormd met hoge KG22 aantallen.



FIGUUR 7. VORMING VAN BIOFILM IN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING. GEGEVEN IS HET KG22 OP DAG 7 EN 14 NA DOSERING VAN DE GROEISTOFFEN.

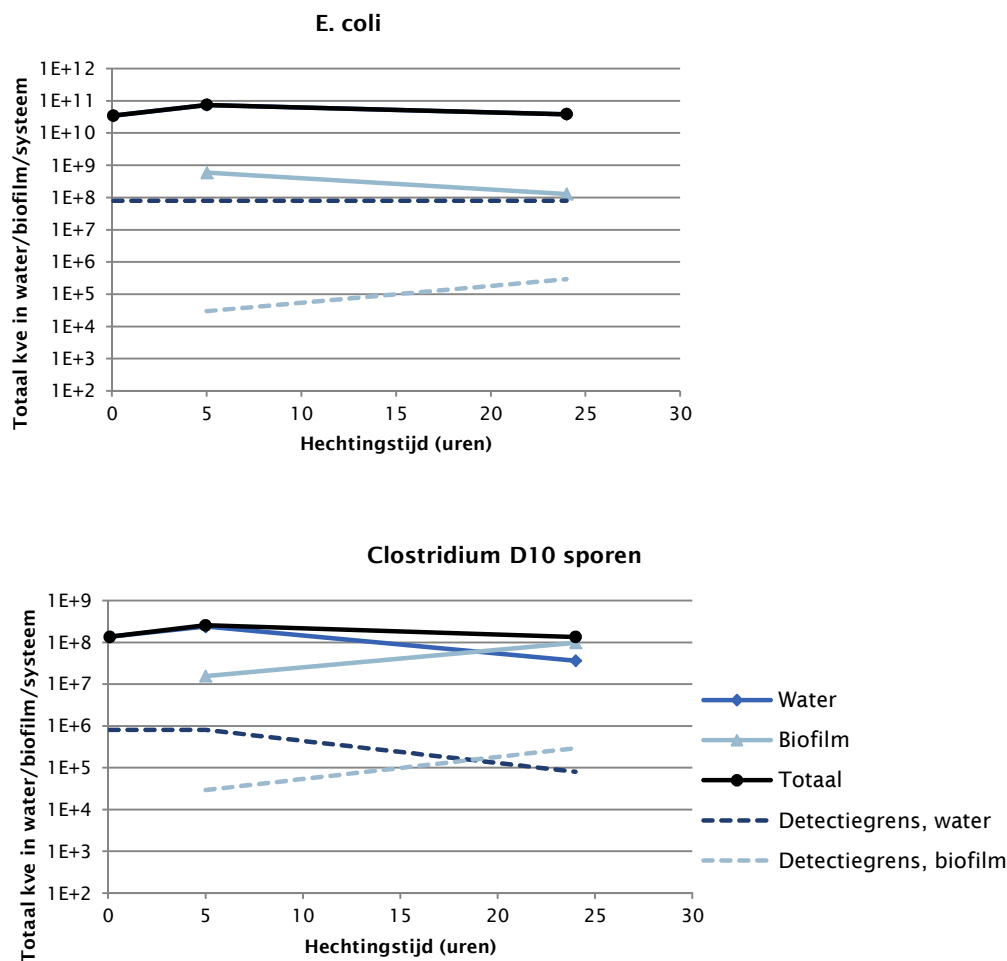
### 3.2.3 Hechting van *E. coli* en *Clostridium* D10 sporen aan de biofilm

Op dag 14 wordt het systeem gespoeld om de groeistoffen te verwijderen en worden de verontreinigende micro-organismen toegevoegd aan het circulatievat. De concentratie van de verontreinigingen in het water na 5 minuten is lager dan wat was berekend (Figuur 8). Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat gehele verversing van het water in de proefopstelling ruim 3 minuten duurt. Hierdoor is de verontreiniging die is toegevoegd aan het circulatievat na 5 minuten nog niet homogeen verdeeld. De concentraties die gemeten zijn op 5 uur komen dicht in de buurt van de berekeningen:  $7,5 \cdot 10^{10}$  vs  $10^{11}$  totaal aantal kve voor *E. coli* en  $2,6 \cdot 10^8$  vs  $10^9$  totaal aantal kve voor *Clostridium* D10 sporen (Tabel 3 en Figuur 8).

De micro-organismen worden in de proefopstelling gecirculeerd met 0,1 m/s, de gemiddelde stroomsnelheid in het distributienet. In deze 24 uur voordat er gespuid wordt, kunnen de toegediende micro-organismen hechten aan de biofilm. De maximale hechting van *E. coli* aan de biofilm wordt binnen 5 uur bereikt (Figuur 8), hierbij is 0,8% van de totale toegevoegde verontreiniging gebonden aan de biofilm (Tabel 4). In de volgende 19 uur neemt de concentratie kweekbare *E. coli* bacteriën in de biofilm af. De maximale hechting van de *Clostridium* D10 sporen wordt pas 24 uur na toediening bereikt (Figuur 8), en bedraagt 73% (Tabel 4).

TABEL 4. HECHTING VAN MICRO-ORGANISMEN AAN DE BIOFILM GEDURENDE 24 UUR. DE PERCENTAGES ZIJN GEBASEERD OP CONCENTRATIES DIE MET KWEEKMETHODEN ZIJN BEPAALD.

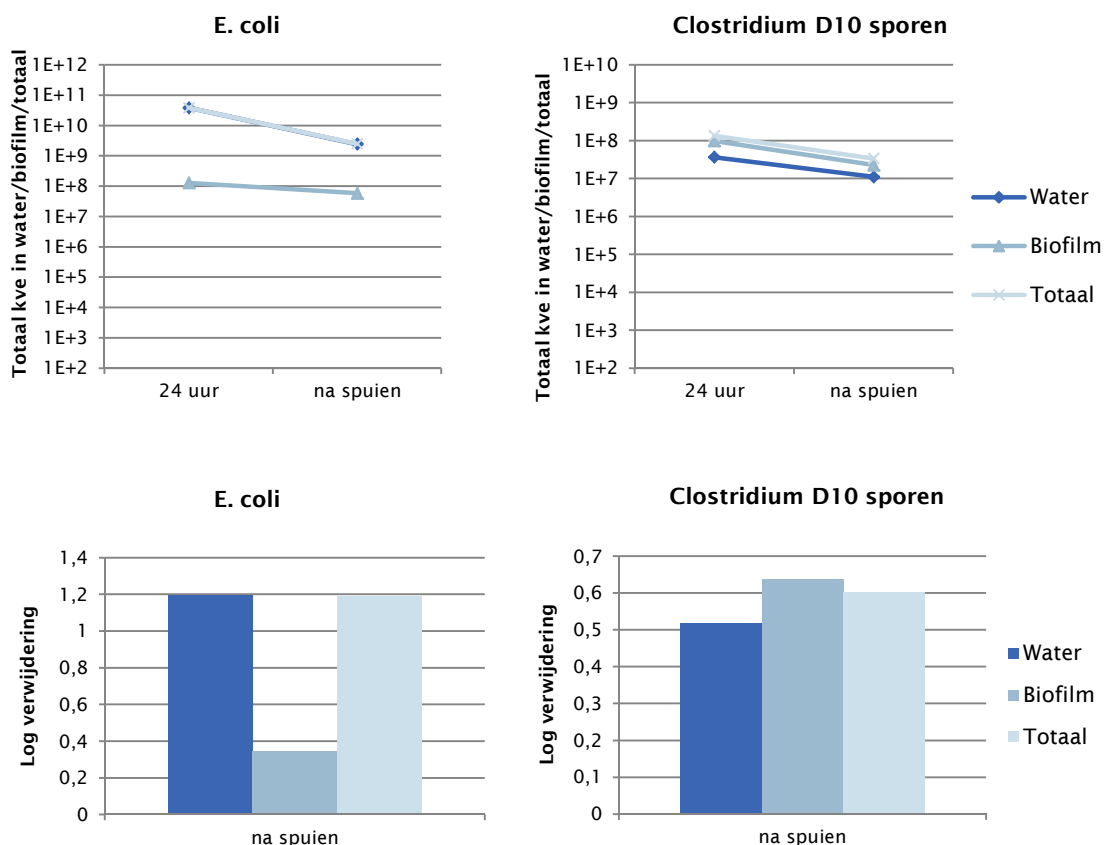
Tijd na dosering verontreiniging	<i>E. coli</i>		<i>Clostridium</i> D10	
	Water (%)	Biofilm (%)	Water (%)	Biofilm (%)
5 min	100,0		100,0	
5 uur	99,2	0,8	93,9	6,1
24 uur	99,7	0,3	27,0	73,0



FIGUUR 8. VERDELING VAN *E. COLI* EN D10 SPOREN OVER DE WATER- EN BIOFILMFASE GEDURENDE DE EERSTE 24 UUR NA DOSERING AAN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING. DE DETECTIEGREN VAN ZOWEL DE ANALYSES OP HET WATER ALS DE BIOFILM ZIJN GEGEVEN. DE LIJNEN TUSSEN DE MEETPUNTEN ZIJN WEERGEGEVEN VOOR DUIDELIJKHEID, MAAR WEERSPIEGELEN MOGELIJK NIET DE DYNAMIEK VAN HECHTING EN LOSLATEN VAN DE MICRO-ORGANISMEN.

### 3.2.4 Effectiviteit van spuien op verontreiniging in het water en in de biofilm

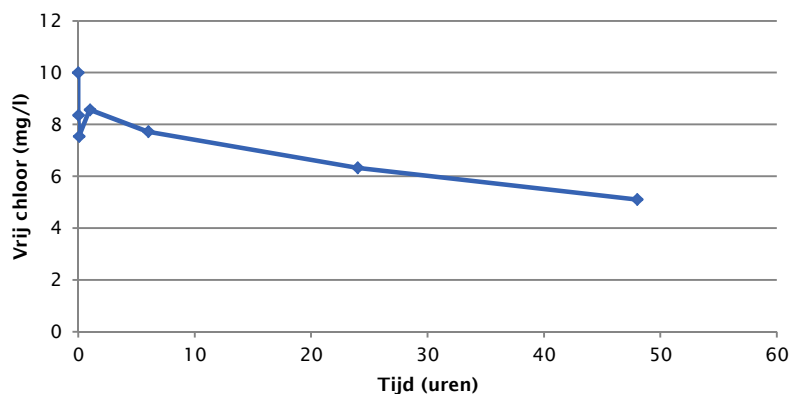
24 uur na toediening van de verontreiniging aan de proefopstelling, wordt deze conform de richtlijn gespuid met 1,5 m/s en 3 volumes. Na het spuien is de circulatie weer gestart en na 5 minuten zijn de 'na spuien' monsters genomen. De concentratie *E. coli* in de waterfase daalt met 1,2 log, in de biofilm daalt de concentratie met 0,3 log (Figuur 9). *Clostridium* D10 sporen in de waterfase worden minder goed verwijderd (0,5 log) dan *E. coli*, maar verwijdering uit de biofilm is juist licht hoger dan bij *E. coli* (0,6 log). In totaal wordt er 1,2 log *E. coli* en 0,6 log *Clostridium* D10 verwijderd d.m.v. spuien.



FIGUUR 9. EFFECTIVITEIT SPIUEN, IN TOTAAL AANWEZIGE KVE (BOVEN) EN IN LOG VERWIJDERING (ONDER).

**3.2.5 Effectiviteit van chlore op verontreiniging in het water en in de biofilm**

Na spuien is chloor toegevoegd aan het circulatievat tot een concentratie van 10 mg/l. De vrij chloorconcentratie in de leiding is op verschillende tijdstippen gemeten om het verval te kunnen monitoren (Figuur 10). Op het startmoment en na 5 minuten ligt de chloorconcentratie lager dan verwacht. Dit wordt, net als bij het toedienen van de verontreiniging veroorzaakt doordat het chloor na 5 minuten nog niet homogeen verdeeld is. Na 1 uur circulatie is het chloor homogeen verdeeld, maar ligt de gemeten vrij chloorconcentratie lager dan wat gedoseerd is: 8,7 mg/l vs 10 mg/l. De chloorvraag van het water en de PVC-P leidingen leidt tot dit snelle verval van het chloor.



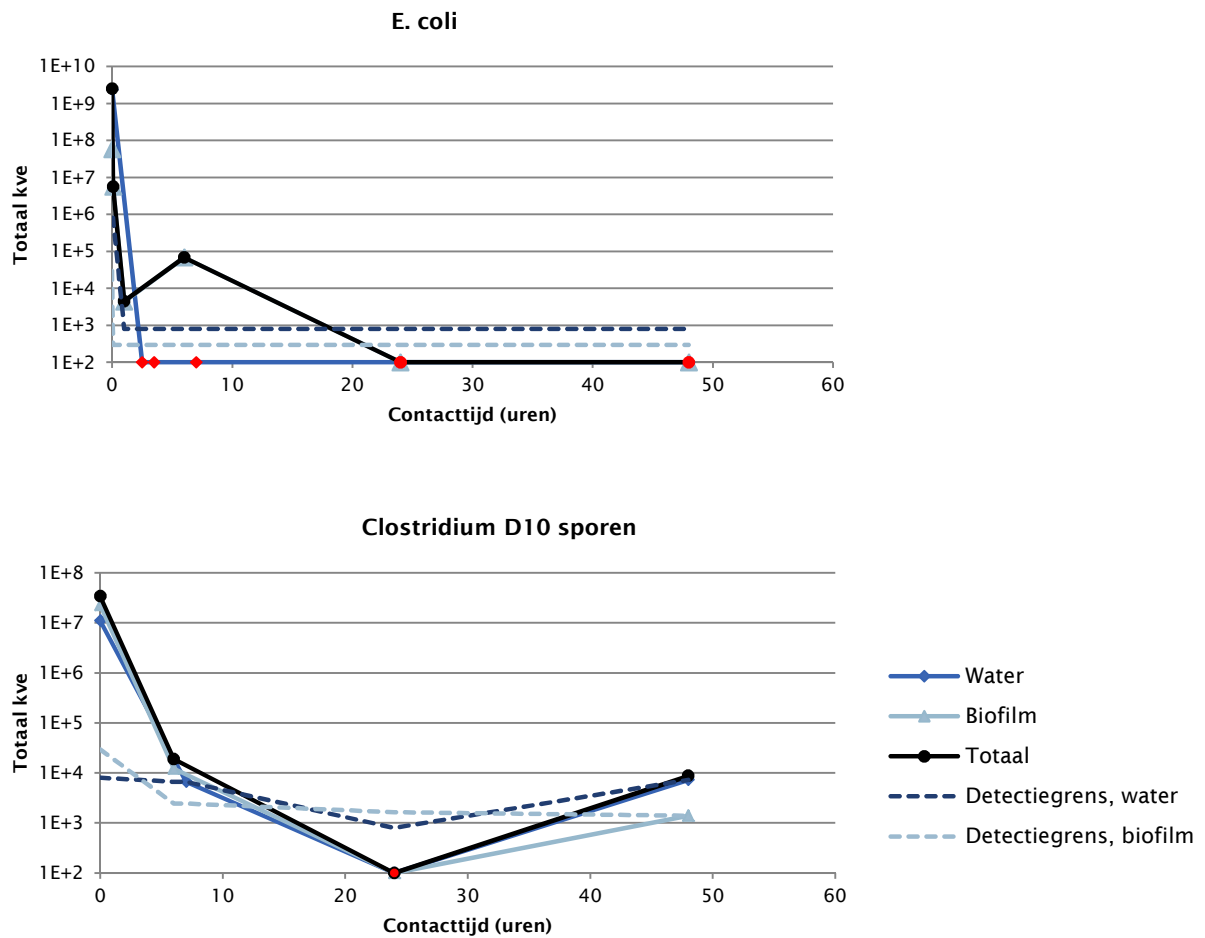
FIGUUR 10. CHLOORCONCENTRATIE IN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING. OP 0 UREN IS ER 10 MG/L CHLOOR TOEGEVOEGD AAN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING.

Op verschillende tijdpunten na toediening van het chloor zijn er water- en biofilmmonsters genomen om de concentratie micro-organismen te kunnen bepalen.

*E. coli* is niet meer aanwezig in de waterfase 2,5 uur na toediening van chloor (Figuur 11), maar zijn in de biofilm nog wel aanwezig 6 uur na start van het chloren. Bij de latere tijdpunten is *E. coli* niet meer detecteerbaar in de biofilm. Afdoding van *E. coli* in de waterfase gaat zeer snel, de biofilm biedt enige bescherming tegen het chloor.

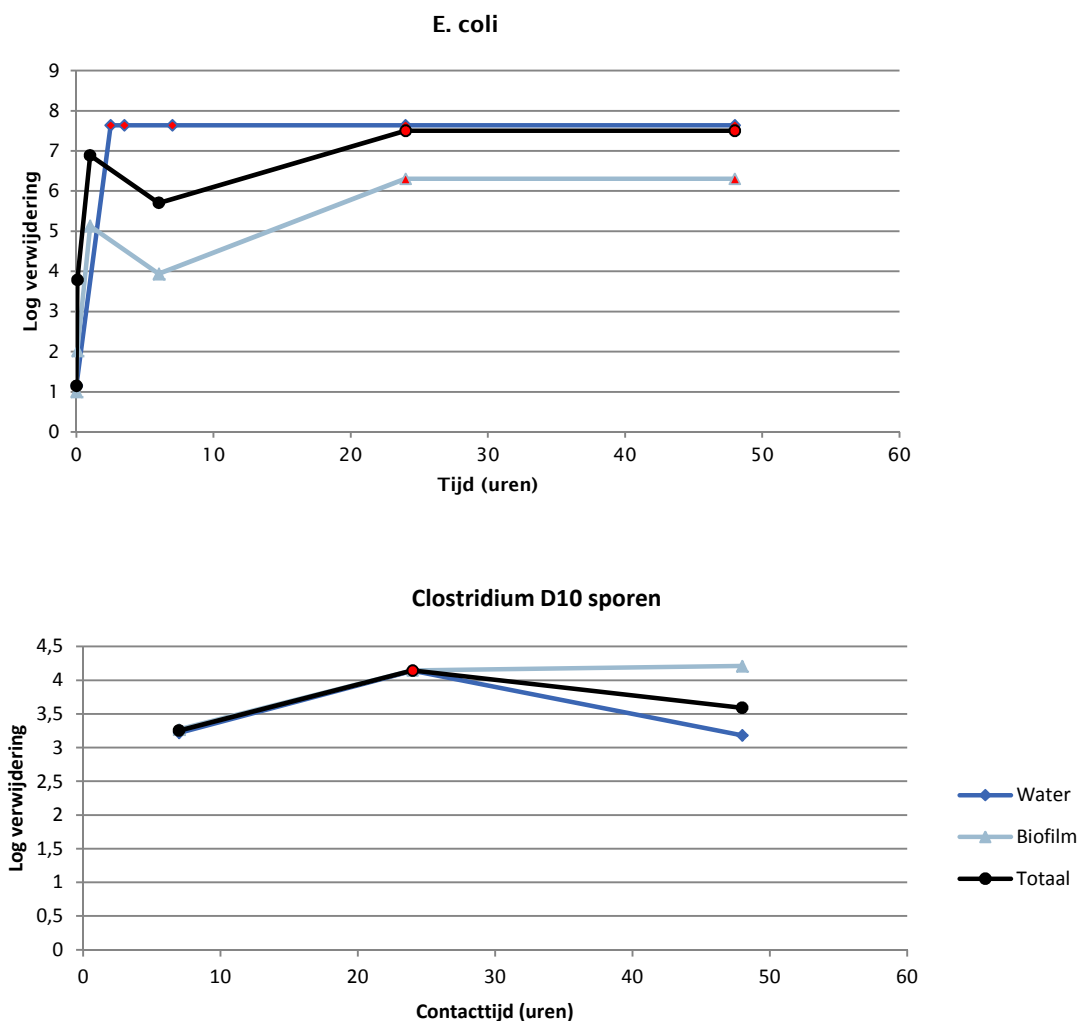
*Clostridium* D10 sporen zijn 7 uur na chloordosering nog aanwezig in de waterfase en in de biofilm. Op het 24-uurs tijdpunt is het aantal sporen in zowel het water als de biofilm tot onder de detectiegrens gedaald. Na 48 uur is de waarde in het water en de biofilm licht hoger dan de detectiegrens. Een mogelijke verklaring voor een positief watermonster na een eerder negatief watermonster is dat de verontreiniging niet homogeen is verdeeld in het water, en dat bij een lage concentratie het wel of niet vinden van een *Clostridium* D10 spore een toevalsproces is. Afdoding van de sporen vindt dus voornamelijk plaats in de eerste 7 uur na dosering van chloor. Hierna blijft de concentratie redelijk stabiel.





FIGUUR 11. EFFECT VAN CHLOREN OP HET AANTAL MICRO-ORGANISMEN IN DE WATERFASE EN BIOFILM. GEGEVEN IS HET TOTAAL AANTAL KVE IN DISTRIBUTIEOPSTELLING. DE ROOD GEMARKEERDE DATAPUNTEN ZIJN WAARDES DIE ONDER DE DETECTIEGRENSEN VALLEN EN ZIJN ARTIFICIEEL OP  $1E+2$  TOTAAL AANTAL KVE GESTELD.

2,5 uur na toediening van chloor zijn er geen *E. coli* bacteriën meer detecteerbaar in de waterfase (Figuur 12). Van de *Clostridium* D10 sporen wordt slechts 3,3 log verwijderd. In de waterfase zijn *E. coli* dus gevoeliger voor chloor dan de *Clostridium* D10 sporen. De biofilm beschermt wel in beperkte mate *E. coli*, maar niet *Clostridium* sporen, tegen het effect van chloor. Afsterving van *Clostridium* lijkt even snel te gaan in de waterfase en de biofilm, al is dat niet met zekerheid te zeggen gezien het lagere aantal monsters van D10.



FIGUUR 12. EFFECT VAN CHLOREN PER MICRO-ORGANISME. DE LOG VERWIJDERING IS BEREKEND TEN OPZICHTE VAN HET TOTALE AANTAL KVE IN DE DISTRUBITEOPSTELLING OP HET MOMENT NA SPUIEN. DE RODE DATAPUNTEN GEVEN AAN DAT DE MEETWAARDE ONDER DE DETECTIEGREN LAG EN DE LOG VERWIJDERING DUS EEN '>' WAARDE IS.

### 3.3 Experiment 2

In experiment 2 is er voor gekozen om het eerste experiment gedeeltelijk te herhalen en verder uit te breiden door het toevoegen van phiX174 fagen (Tabel 5). De verontreiniging bestaat uit *E. coli* bacteriën, *Clostridium* D10 sporen en phiX174 fagen. Tevens zijn er extra meetpunten toegevoegd en worden de *E. coli* zowel met kweek als met kwantitatieve PCR (qPCR) geanalyseerd om de mogelijke aanwezigheid van VBNC bacteriën te detecteren.

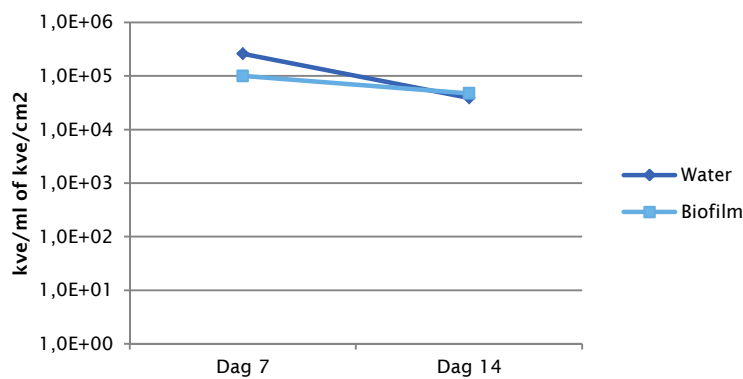
TABEL 5. PARAMETERS EXPERIMENT 2

Hechting	Stroom-snelheid	<i>E. coli</i> (totaal kve)	<i>Clostridium</i> D10 (totaal kve)	phiX174 (totaal pve)	Spuien	Chloren
24 uur	0.1 m/s	$6,3 \cdot 10^{10}$	$8,4 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^{11}$	1,5 m/s, 3 volumes	10 mg/l, 48 uur

Na dosering van de verontreiniging en 24 uur circulatie is het systeem gespuid. Zowel meteen na het spuien (dus voor herstart van de circulatie) als na 30 minuten circulatie zijn het water en de biofilm bemonsterd. Na 30 minuten circulatie, als de watersamenstelling in het de distributieopstelling weer homogeen is, is het chloor toegevoegd aan het circulatievat en is op verschillende tijdstippen een water- en biofilmmonster genomen.

### 3.3.1 Biofilmvorming en dosering verontreiniging

De KG22 analyses van de biofilm na 7 en 14 dagen liggen rond de  $10^5$  kve/ml of  $10^5$  kve/cm<sup>2</sup> (Figuur 13). Deze waarden zijn ongeveer gelijk aan de resultaten van experiment 1 (Figuur 7) en liggen boven de grenswaarde van  $10^4$  kve/ml of kve/cm<sup>2</sup>, wat duidt op een bruikbare, representatieve biofilm.



FIGUUR 13. BIOFILMVORMING IN DE PROEFOPSTELLING

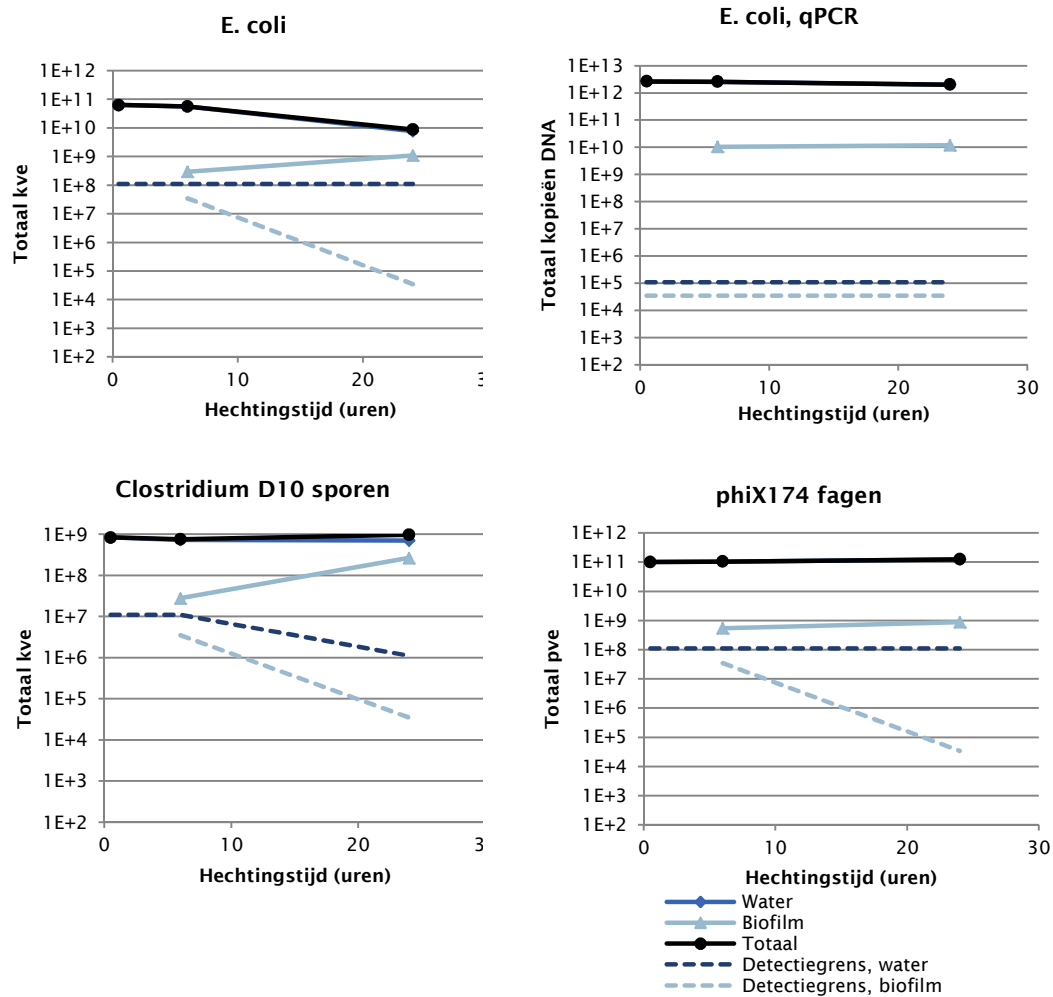
### 3.3.2 Hechting van verontreiniging aan de biofilm

IN DE EERSTE 6 UUR NA DOSERING VAN DE MICRO-ORGANISMEN AAN HET WATER VINDT ER HECHTING PLAATS AAN DE BIOFILM VOOR ZOWEL *E. COLI*, *CLOSTRIDIUM D10* ALS PHIX174 (FIGUUR 14). DEZE WAARDEN ZIJN VERGELIJKBAAR MET EXPERIMENT 1. IN DE DAAROPVOLGENDE 18 UUR, TOT AAN HET 24-UURS TIJDPUNT, BINDEN VOORNAMELIJK *E. COLI* (KWEK) EN *CLOSTRIDIUM D10* NOG AAN DE BIOFILM TOT EEN HECHTINGSPERCENTAGE VAN 12,5% EN 27,4%, RESPECTIEVELIJK (

Tabel 6). PhiX174 en *E. coli* (qPCR) binden in lage percentages aan de biofilm, slechts 0,7% en 0,6% van de verontreiniging is gehecht aan de biofilm na 24 uur.

TABEL 6. HECHTING VAN DE MICRO-ORGANISMEN AAN DE BIOFILM IN PERCENTAGE VAN HET TOTAAL

Tijd na dosering verontreiniging	<i>E. coli</i> (kweek)		<i>E. coli</i> (qPCR)		<i>Clostridium D10</i>		phiX174	
	Water	Biofilm	Water	Biofilm	Water	Biofilm	Water	Biofilm
30 min	100,0		100,0		100,0		100,0	
6 uur	99,5	0,5	99,6	0,4	96,3	3,7	99,5	0,5
24 uur	87,5	12,5	99,4	0,6	72,6	27,4	99,3	0,7

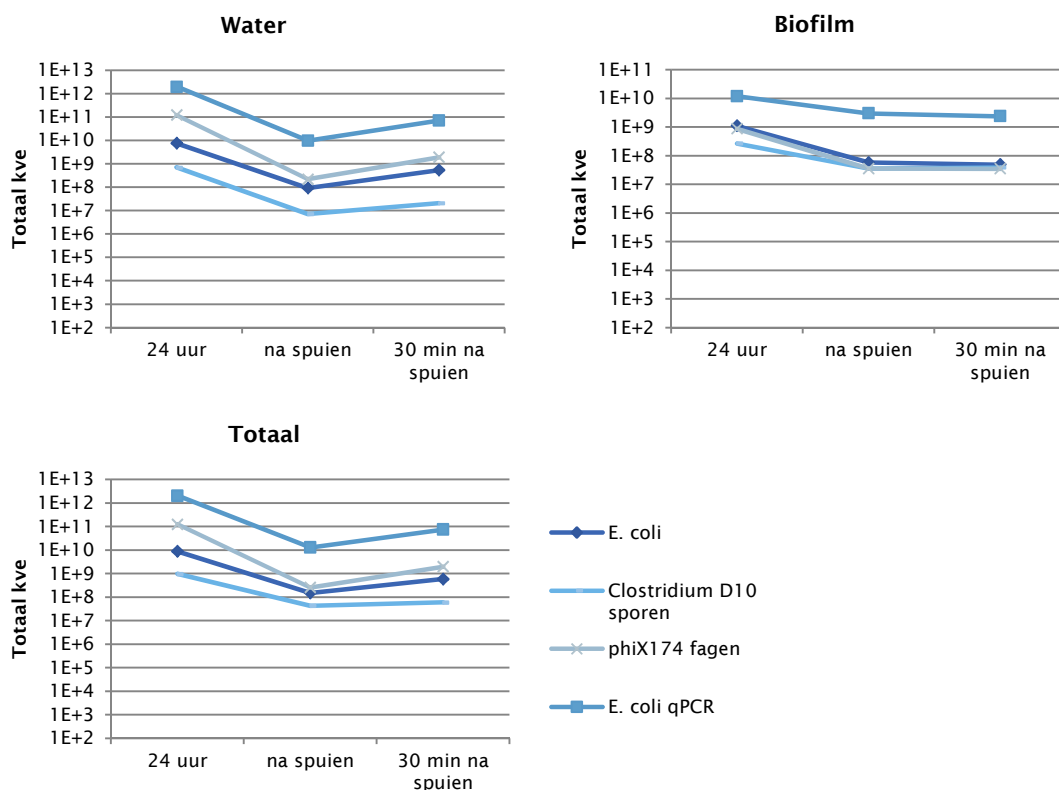


FIGUUR 14. VERDELING VAN DE MICRO-ORGANISMEN OVER DE WATER- EN BIOFILMFASE GEDURENDE DE EERSTE 24 UUR NA DOSERING. GEGEVEN IS HET TOTAAL AANTAL MICRO-ORGANISMEN IN DE PROEFOPSTELLING.

### 3.3.3 Effectiviteit van spuien

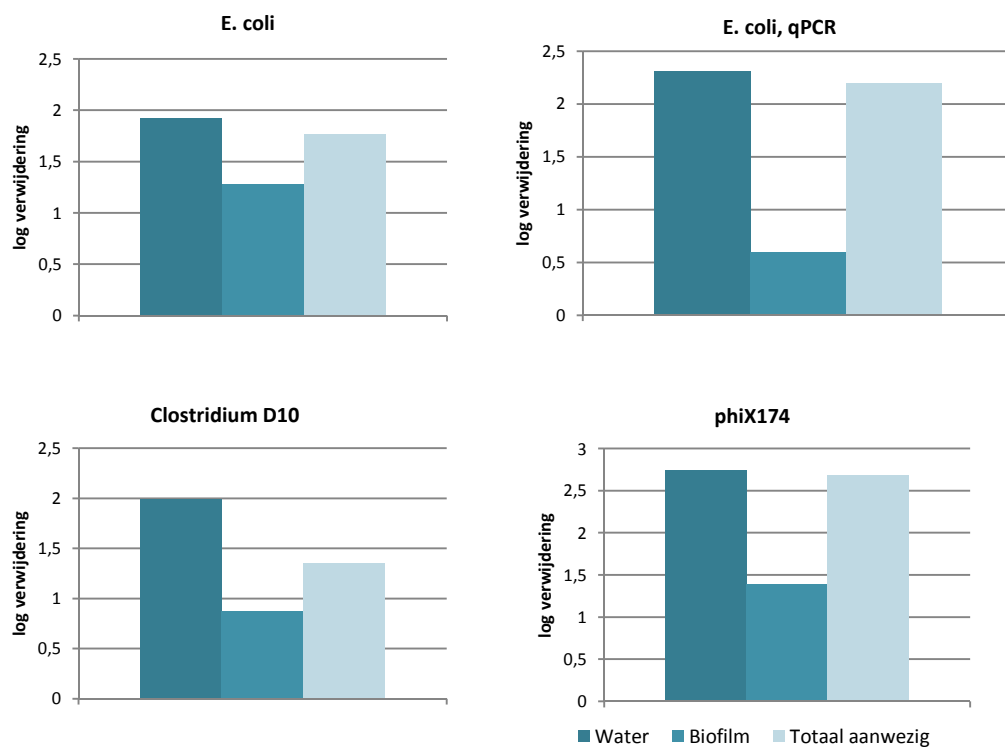
Het effect van spuien is in het tweede experiment bepaald door meteen na het spuien een water- en biofilmmonster te nemen en pas daarna de circulatie in het systeem te starten. Na het herstarten van de circulatie wordt de inhoud van het minder goed schoongemaakte circulatievat (alleen handmatig gespoid, niet met hoge stroomsnelheid gespoid) gemengd met het schonere water in het leidingsysteem. Hierdoor zijn de concentraties micro-organismen in de distributieopstelling hoger, wat zou suggereren dat het spuien minder effectief is geweest. Dit is mogelijk het geval in experiment 1, waarbij alleen 5 minuten na herstart van de circulatie een watermonster genomen. Om dit te voorkomen is 30 minuten na herstart van de circulatie nog een water- en biofilmmonster genomen wat dient als het startpunt voor chloren (in Figuur 18 de waarde van tijdstip '0 uur'). Het effect van de herstart van circulatie op de concentratie van alle micro-organismen in het water is duidelijk te zien in Figuur 15: de concentraties micro-organismen van de watermonsters die genomen zijn op '30 minuten na spuien' liggen hoger vergeleken met de monsters die 'na spuien' zijn genomen. Dit geldt met name voor de waterfase en niet voor de biofilmfase. Door de lagere concentratie in de waterfase, veroorzaakt door het spuien, kunnen er minder micro-

organismen hechten aan de biofilm in de 30 minuten circulatie na spuien. Gecombineerd met de korte circulatietijd lijken de micro-organismen niet extra te hechten aan de biofilm.



FIGUUR 15. EFFECT VAN SPUEN OP MICROBIËLE VERONTREINIGING. GEGEVEN IS HET TOTAAL AANTAL KVE IN DE PROEFOPSTELLING. '24 UUR' IS HET MOMENT VLAK VOOR SPUEN WAAROP DE MICRO-ORGANISMEN GEDURENDE 24 UUR IN DE PROEFOPSTELLING ZIJN GECIRCULEERD. 'NA SPUEN' IS DE CONCENTRATIE METEEN NA SPUEN, VOOR HET HERSTARTEN VAN DE CIRCULATIE. '30 MIN NA SPUEN' IS DE CONCENTRATIE 30 MINUTEN NA HERSTART VAN DE CIRCULATIE.

Spuien verwijdert 1,9 - 2,7 log van alle micro-organismen uit de waterfase (Figuur 15, Figuur 16). Verwijdering uit de biofilm is minder efficiënt met 0,6 - 1,4 log. PhiX174 wordt het best verwijderd van de drie micro-organismen, wat onder andere veroorzaakt zal worden door de hogere startconcentraties in de waterfase, wat makkelijker weggespoeld wordt.

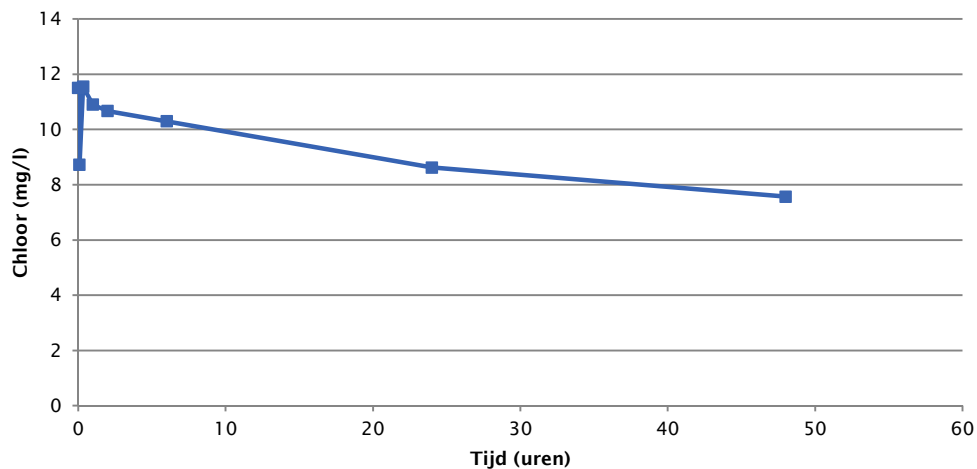


FIGUUR 16. EFFECTIVITEIT VAN SPUIEN IN LOG VERWIJDERING OP VERWIJDERING VAN DE MICRO-ORGANISMEN UIT HET WATER, DE BIOFILM EN HET TOTALE AANTAL AANWEZIG MICRO-ORGANISMEN.

### 3.3.4 Effectiviteit van chloren op verontreiniging in het water en in de biofilm

In experiment 1 was er sprake van een snel chloorverval na toediening aan het systeem. De chloorconcentratie was daardoor kort na dosering al onder de 10 mg/l gedaald. Om dit te voorkomen is er in dit experiment meer chloor toegediend (11,5 mg/l vs 10 mg/l), in de verwachting dat hetzelfde verval zou optreden. Figuur 17 laat zien dat het verval in dit experiment ongeveer even groot is en dat de chloorconcentratie in de eerste 6 uur boven de 10 mg/l ligt. Na 24 uur ligt de chloorconcentratie onder die grens.





FIGUUR 17. CHLOORCONCENTRATIE IN DE PROEFOPSTELLING

Op verschillende tijdpunten na toediening van het chloor zijn er water- en biofilmmonsters genomen. Het chloor is na monsternamen meteen geïnactiveerd door toediening van natriumthiosulfaat dat het chloor weg vangt.

De eerste 20 minuten van de chloordosering is er een sterke afname van het aantal kweekbare *E. coli* in zowel het water (van  $5,4 \times 10^8$  naar  $3,9 \times 10^4$  totaal kve; 4,1 log inactivatie) als de biofilm ( $4,9 \times 10^7$  naar  $4,9 \times 10^5$  totaal kve; 2,0 log verwijdering) (Figuur 18). De afdoding van *E. coli* blijft hierna snel. Uitzondering is een sterke toename van het aantal *E. coli* in de biofilm na 6 uur waarvoor de reden onbekend is. *E. coli* is met kweek niet meer detecteerbaar in het water na 6 uur en in de biofilm na 48 uur.

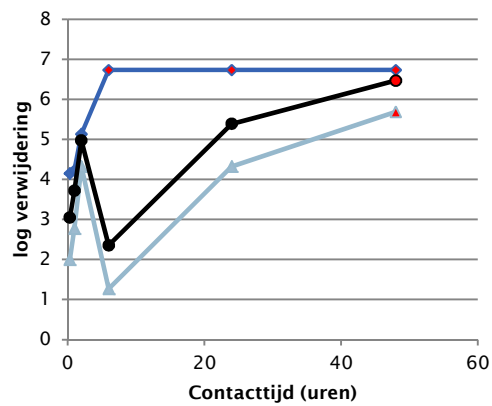
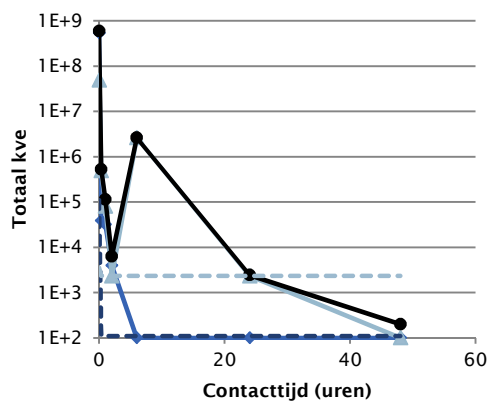
De afname van het aantal *E. coli* is minder groot wanneer de analyse wordt uitgevoerd met kwantitatieve PCR. Deze techniek bepaalt het aantal *E. coli* DNA kopieën, ongeacht of deze *E. coli* bacteriën kweekbaar zijn. Dode bacteriën waarvan het DNA nog intact is, of *E. coli* die VBNC (viable but not culturable) zijn geworden zijn op de manier detecteerbaar. In het water daalt de concentratie met 3,0 log van  $7,2 \times 10^{10}$  naar  $6,8 \times 10^7$  DNA kopieën. In de biofilm is de verwijdering slechts 0,6 log van de *E. coli* ( $2,4 \times 10^9$  naar  $5,3 \times 10^8$  DNA kopieën). Tot 2 uur na de chloordosering blijft de inactivatie snel hoog, hierna vlakt deze sterk af en vindt er tot 24 uur nauwelijks nog verwijdering plaats. Deze verwijderingen zijn minder sterk vergeleken met de standaard kweekmethode. Hier wordt in de discussie verder op in gegaan.

De grootste verwijdering van *Clostridium* D10 uit de water- en biofilmfase vindt plaats in het eerste uur na dosering (water:  $2,1 \times 10^7$  naar  $6,6 \times 10^3$  totaal kve, 3,5 log verwijdering en in de biofilm van  $3,9 \times 10^7$  naar  $7,5 \times 10^5$  totaal kve, 1,7 log verwijdering). Na 6 en 24 uur valt de concentratie *Clostridium* D10 in het water onder de detectiegrens. Na 48 uur zijn de sporen wel detecteerbaar, maar is de gemeten concentratie gelijk aan de detectiegrens. In de biofilm vindt wel afdoding plaats van de sporen, maar de sporen worden gedurende de 48 uur niet geheel verwijderd. In experiment 1 is eenzelfde patroon gemeten waarbij een negatief monster wordt opgevolgd door een monster waarin wel *Clostridium* wordt gedetecteerd. Dit suggereert dat één negatief monster niet inhoudt dat de opvolgende monsters ook negatief zullen zijn. Een mogelijke oorzaak voor een positief monster na een negatief monster, is dat de verontreiniging niet homogeen in het water of de biofilm is verdeeld en dat vooral bij lage aantallen de meting in bepaalde mate een toevalsproces is.

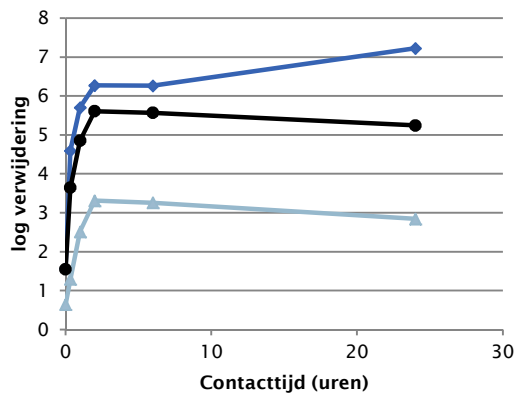
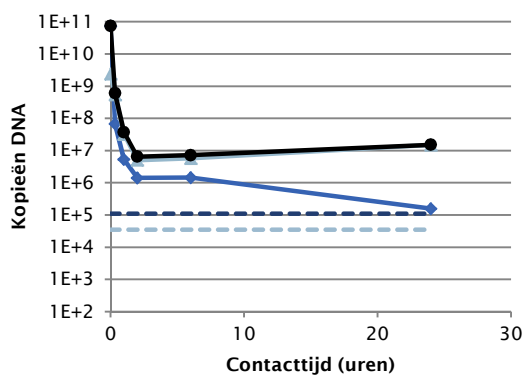
De sterkste verwijdering van phiX174 vindt plaats in de eerste 20 minuten na chloordosering: de concentratie in het water daalt van  $1,9 \times 10^9$  naar  $3,3 \times 10^3$  totaal kve (5,8 log verwijdering) en daalt in de biofilm van  $3,5 \times 10^7$  naar  $4,5 \times 10^4$  totaal kve (2,9 log verwijdering). Na 2 uur zijn de fagen niet meer in de waterfase detecteerbaar, terwijl pas na 48 uur de fagen niet meer detecteerbaar zijn in de biofilm.

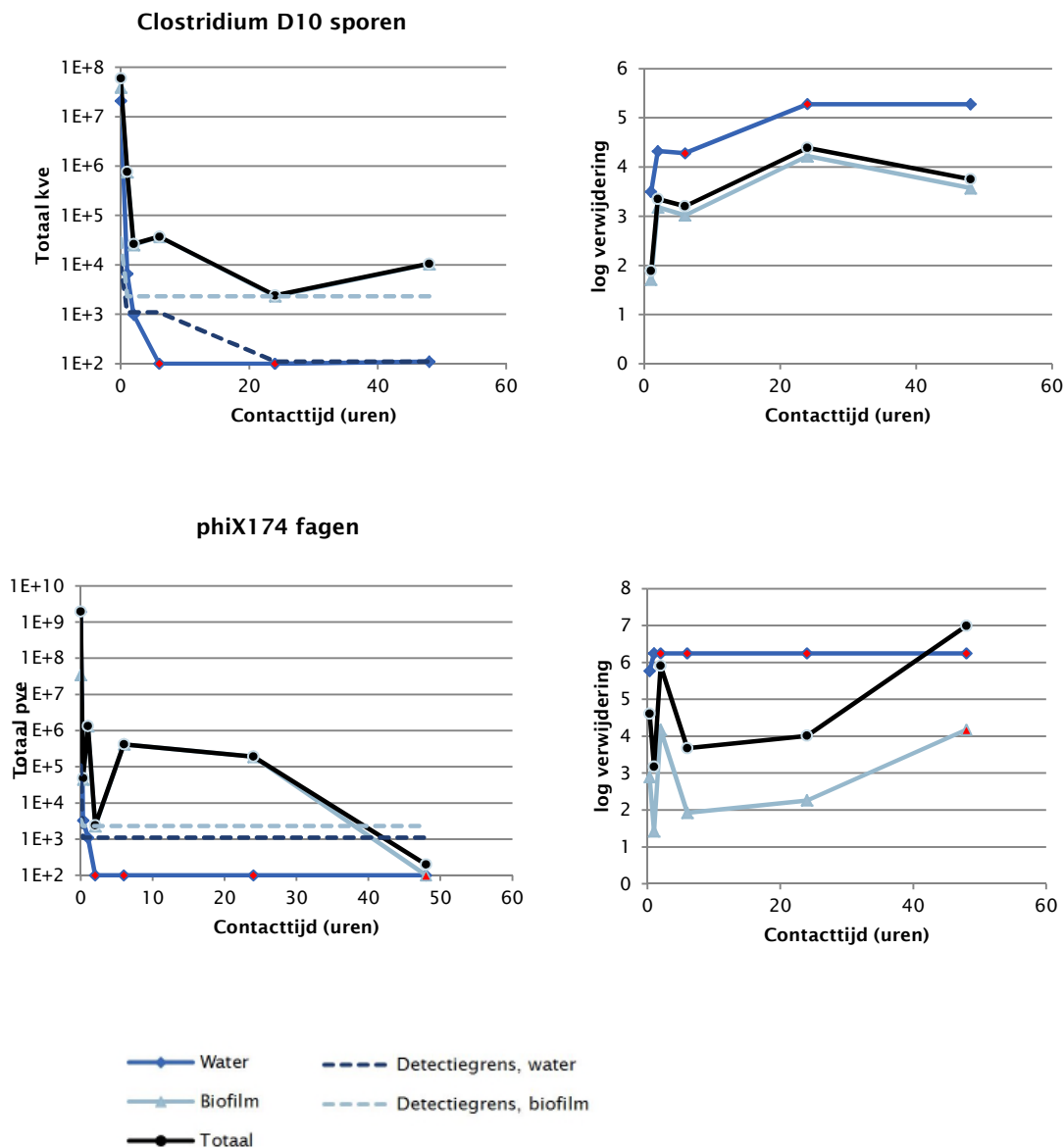
Voor alle drie de micro-organismen is afdoding in de waterfase sneller dan wanneer de micro-organismen gehecht zijn aan de biofilm, de biofilm biedt dus bescherming tegen het afdodende effect van chloor. Dit beschermende effect is vanaf het begin van de desinfectieperiode aanwezig. Tevens blijkt dat desinfectie in zowel de waterfase als de biofilm niet lineair verloopt, terwijl de desinfectiemodellen dit wel veronderstellen. Deze modellen zijn onder andere gebruikt bij het opstellen van de hygiëncode.

**E. coli**



**E. coli, qPCR**





FIGUUR 18. EFFECT VAN CHLOREN OP MICRO-ORGANISMEN IN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING. DE LINKER GRAFIEKEN GEVEN HET TOTAAL AANTAL KVE IN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING, DE RECHTER GRAFIEKEN GEVEN DE LOG VERWIJDERING WEER. DE RODE DATAPUNTEN IN DE RECHTERGRAFIEKEN GEVEN AAN DAT DE GEMETEN WAARDE ONDER DE DETECTIEGRENIS LIGT. DAARDOOR IS EEN MAXIMALE LOG VERWIJDERING BEREKEND EN BETREFT HET DUS EEN '>'-WAARDE.

In de waterfase zijn *Clostridium* D10 sporen het meest resistent tegen chloor en de phiX174 fagen het minst. Deze verschillen in gevoeligheid zijn grotendeels verdwenen zodra de micro-organismen gehecht zijn aan de biofilm. De *Clostridium* D10 sporen in de biofilm zijn mogelijk iets resistentier tegen chloor, al volgt deze conclusie uit slechts één meetpunt (48 uur na toediening van chloor) waar de sporen nog gedetecteerd worden.

### 3.4 Experiment 3

In overleg met de themagroepleden is besloten om in het derde, en laatste experiment, de effectiviteit van spuien nader te bestuderen. In experiment 1 en 2 is aangetoond dat de

effectiviteit van chloor in de waterfase zeer hoog is en dat ook in de biofilm na 48 uur de micro-organismen over het algemeen niet langer gedetecteerd worden. Aangezien in de praktijk liever geen chloor wordt gebruikt, richt dit experiment zich op het testen van de effectiviteit van verschillende spuiregimes. Hiervoor is de proefopstelling 4 maal gespuid met 3 volumes bij verschillende snelheden (Tabel 7). Bij de eerste spuiactie is gespuid met 1,0 m/s en de volgende drie spuiacties zijn uitgevoerd met 1,5 m/s. In totaal is er met 12 volumes water gespuid.

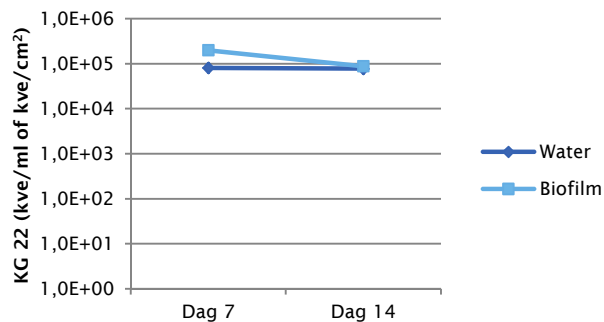
Tijdens de spuiactie is een deel van de distributieopstelling afgesloten van het te spuien deel. Dit deel bevat onder andere het circulatievat dat handmatig wordt gespoeld en minder effectief lijkt dan spuien vanwege het ontbreken van een hoge stroomsnelheid. Vervolgens wordt na elke spuiactie het water in de gehele distributieopstelling 30 minuten gecirculeerd. Door het herstarten van de circulatie wordt het water uit het handmatig gespoelde circulatievat gemengd met het schonere water uit het gespuide distributiesysteem. Hierdoor zal de concentratie in het distributiesysteem (licht) stijgen. Na deze 30 minuten wordt er opnieuw gespuid. Deze cyclus herhaalt zich totdat er vier maal is gespuid. Water- en biofilmmonsters zijn meteen na spuien genomen (voor de herstart van circulatie) en 30 minuten na de herstart. Het 30-minuten monsternamepunt dient als startwaarde voor de volgende spuiactie om zo de effectiviteit van spuien te bepalen. Er is gekozen om het water na elke spuiactie te circuleren om te voorkomen dat na de vierde spuiactie geen meetbare concentraties meer in de distributieopstelling aanwezig zijn en de effectiviteit van spuien niet kan worden gemeten. De rationale achter vier maal achter elkaar spuien was dat, ondanks het circuleren, bij de vierde spuiactie sterk lagere concentraties aanwezig zouden zijn in de proefopstelling die representatiever zijn voor de praktijksituatie.

TABEL 7. PARAMETERS EXPERIMENT 3

Hechting	Stroom-snelheid	<i>E. coli</i>	<i>Clostridium</i> D10 sporen	phiX174 fagen	Spuien
24 uur	0,1 m/s	9,1×10 <sup>10</sup>	1,6×10 <sup>9</sup>	5,9×10 <sup>10</sup>	1,0 m/s, 3 volumes
					1,5 m/s, 3 volumes
					1,5 m/s, 3 volumes
					1,5 m/s, 3 volumes

### 3.4.1 Biofilmvorming en dosering verontreiniging

KG22 analyses van het water en de biofilm op 7 en 14 dagen als mate van biofilmvorming komen overeen met de gevormde biofilm in experiment 1 en 2. De KG22 waardes liggen rond de 10<sup>5</sup> kve/ml of kve/cm<sup>2</sup>, wat erop duidt dat een bruikbare en representatieve biofilm is gevormd (Figuur 19).



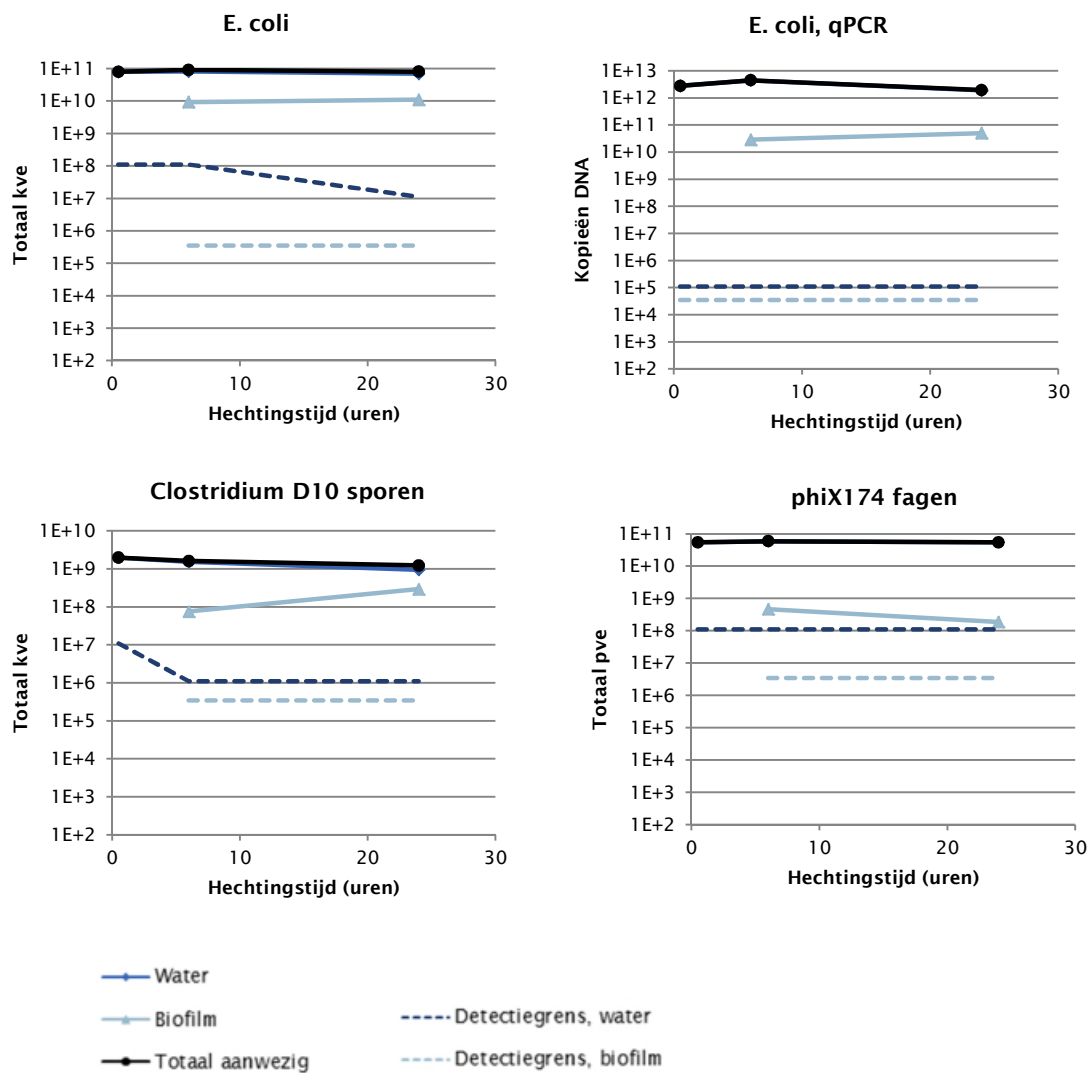
FIGUUR 19. BIOFILMVORMING IN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING DOOR ANALYSE VAN HET KG22 GEHALTE VAN HET WATER EN DE BIOFILM.

### 3.4.2 Hechting van verontreiniging aan de biofilm

In de eerste 6 uur na dosering van de verontreiniging aan de distributieopstelling, hechten alle drie de micro-organismen aan de biofilm. PhiX174 fagen hechten met een laag percentage (0,8%) terwijl *E. coli* (kweek) en *Clostridium* D10 hogere percentages bereiken (respectievelijk 10,2% en 4,7%; Tabel 8, Figuur 20). Het *E. coli* gehalte van de biofilm, zoals bepaald met kwantitatieve PCR (qPCR), is echter lager (0,6%). *E. coli* (kweek: 13,7%; qPCR: 2,6%) en *Clostridium* D10 (23,8%) hechting vindt gedurende de volgende 18 uur nog steeds plaats, terwijl phiX174 juist los laat van de biofilm (0,3% hechting). In dit experiment is duidelijk het verschil in hechtingseigenschappen tussen de verschillende micro-organismen zichtbaar. Kweekbare *E. coli* en *Clostridium* D10 hechten percentueel gezien 45 en 80x beter aan de biofilm dan phiX174, terwijl dit verschil slechts 9x is vergeleken met de *E. coli* (qPCR).

TABEL 8. HECHTING VAN DE MICRO-ORGANISMEN AAN DE BIOFILM GEDURENDE 24 UUR. GEGEVEN IS HET PERCENTAGE VAN DE TOTALE POPULATIE DAT ZICH IN DE WATER- OF BIOFILMFASE BEVINDT. 30 MINUTEN NA DOSERING IS DE BIOFILM NIET GEANALYSEERD EN WORDT AANGENOMEN DAT ER NOG GEEN HECHTING, OF IN ZEER LAGE AANTALLEN, AAN DE BIOFILM HEEFT PLAATS GEVONDEN.

Tijd na dosering verontreiniging	<i>E. coli</i> (kweek)		<i>E. coli</i> (qPCR)		<i>Clostridium</i> D10		phiX174	
	Water	Biofilm	Water	Biofilm	Water	Biofilm	Water	Biofilm
30 min	100,0		100,0		100,0		100,0	
6 uur	89,8	10,2	99,4	0,6	95,3	4,7	99,2	0,8
24 uur	86,3	13,7	97,4	2,6	76,2	23,8	99,7	0,3



FIGUUR 20. VERDELING VAN MICRO-ORGANISMEN OVER DE WATER- EN BIOFILMFASE GEDURENDE DE EERSTE 24 UUR NA DOSERING. GEGEVEN IS HET TOTAAL AANTAL DAT AANWEZIG IS IN DE GEHELE DISTRIBUTIEOPSTELLING.

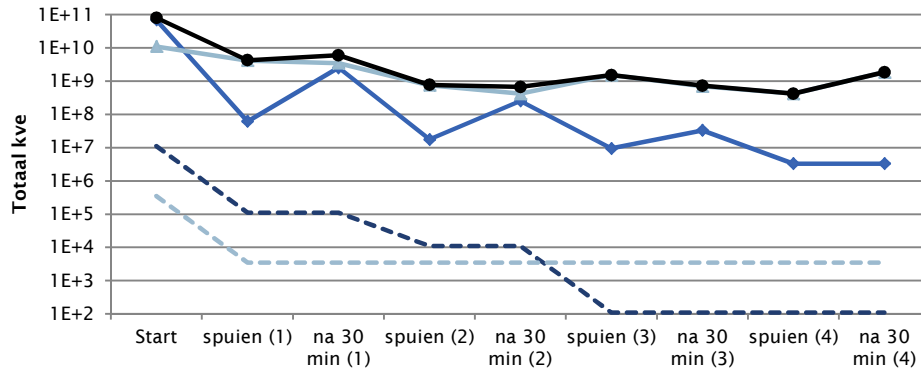
### 3.4.3 Effectiviteit van vier elkaar opvolgende spuiacties

Zoals hierboven beschreven, wordt na elke spuiactie het water in de gehele distributieopstelling gedurende 30 minuten gecirculeerd zodat het schonere water uit het gespuide deel gemengd wordt met het minder schone water uit het handmatig gespoelde circulatievat.

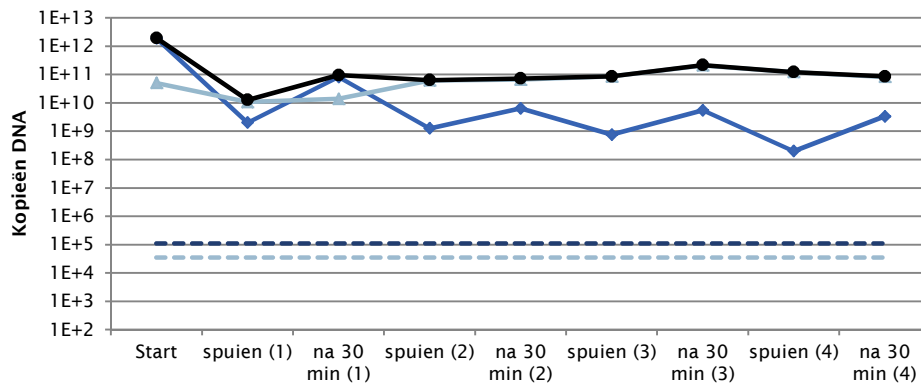
In Figuur 21 is het totaal aantal kve (*E. coli* kweek, *Clostridium*), DNA kopieën (*E. coli* qPCR) of pve (*phiX174*) gegeven. Het patroon van pieken (circulatie) en dalingen (spuien) is duidelijk zichtbaar voor alle micro-organismen: de concentratie stijgt met 0 - 2 log wanneer er 30 minuten na circulatie gemeten wordt. Voor *E. coli* (kweek) wordt dit herstel door circulatie minder naarmate er meer spuiacties worden uitgevoerd. Voor *E. coli* bepaald met qPCR is het verloop ook aanwezig maar minder sterk. Voor *Clostridium* blijft dit herstel, op de eerste spuiactie na, redelijk gelijk. De mate van herstel varieert voor de *phiX174* fagen.



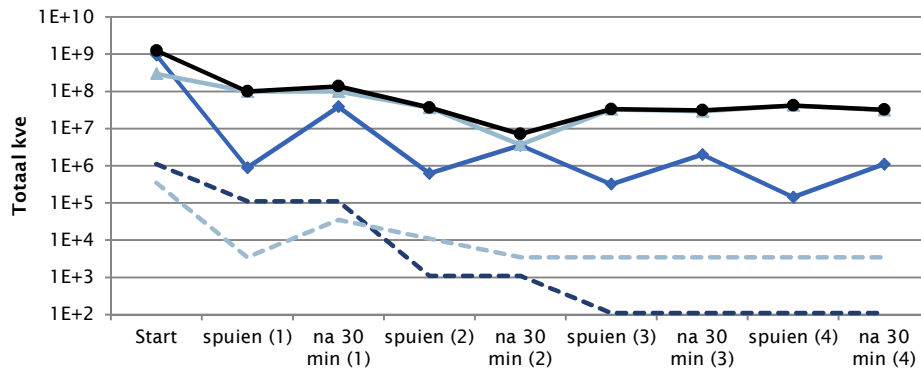
**E. coli**

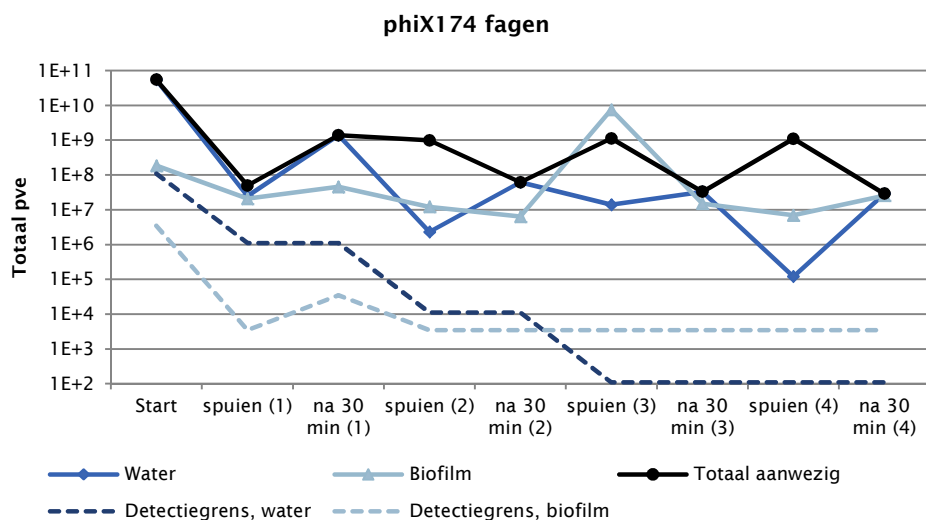


**E. coli, qPCR**



**Clostridium D10 sporen**





FIGUUR 21. EFFECTIVITEIT VAN VIER SPUIACTIES OP DE TOTAAL AANWEZIGE HOEVEELHEID MICRO-ORGANISMEN IN DE WATER- EN BIOFILMFASE. GEGEVEN IS HET TOTAAL AANTAL KVE, PVE OF DNA KOPIEËN IN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING.

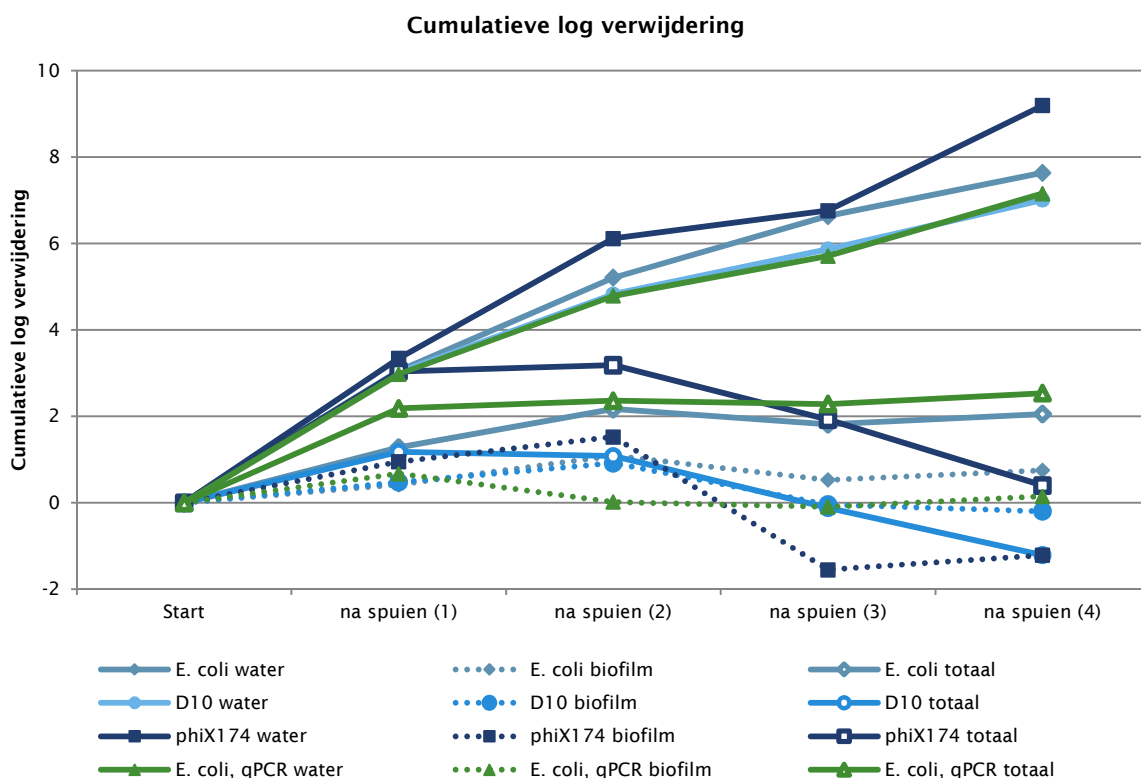
De vier uitgevoerde spuiacties verwijderen het meest efficiënt de micro-organismen in de waterfase, verwijdering van alle drie de micro-organismen uit de biofilm is daarentegen beperkt (Figuur 21, Tabel 9). Voor alle drie de verontreinigingen is de eerste spuiactie het meest efficiënt en is de log verwijdering het hoogst vergeleken met de daarop volgende spuiacties. De enige uitzondering hierop is *E. coli* in de biofilmfase waarvoor de tweede spuiactie iets effectiever is dan de eerste (0,7 vs 0,4 log verwijdering).

De effectiviteit van de individuele spuiacties op de verontreiniging in de waterfase wordt minder als er meerdere spuiacties achter elkaar worden uitgevoerd. De eerste spuiactie (1,0 m/s, 3 volumes) verwijdert 3,1 (kweek) en 3,0 (qPCR) log *E. coli*, 3,0 log *Clostridium* D10 en 3,3 log phiX174 uit de waterfase. De laatste spuiactie (1,5 m/s, 3 volumes) verwijdert respectievelijk slechts 1,0 log, 1,4 log, 1,1 log en 2,4 log. Deze verminderde meeropbrengst van meerdere malen spuien is het duidelijkst zichtbaar voor *E. coli* (kweek) in de waterfase waarvoor bij elke volgende spuiactie de effectiviteit met 0,5 – 1,0 log daalt. Voor *E. coli* (qPCR) en *Clostridium* daalt de effectiviteit van spuien minder stapsgewijs en dit varieert voor phiX174.

TABEL 9. EFFECTIVITEIT VAN SPUIEN, IN LOG VERWIJDERING. DE TOTALE EFFECTIVITEIT IS BEREKEND DOOR DE EFFECTIVITEIT VAN DE INDIVIDUELE SPUIACTIES BIJ ELKAAR OP TE TELLEN.

Log verwijdering	<i>E. coli</i> (kweek)			<i>E. coli</i> (qPCR)			<i>Clostridium</i> D10			phiX174		
	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal
Spuien (1)	3,1	0,4	1,3	3,0	0,7	2,2	3,0	0,5	1,2	3,3	0,9	3,0
Spuien (2)	2,2	0,7	0,9	1,8	-0,7	0,2	1,8	0,4	-0,1	2,8	0,6	0,1
Spuien (3)	1,4	-0,6	-0,4	0,9	-0,1	-0,1	1,0	-1,0	-1,2	0,6	-3,1	-1,3
Spuien (4)	1,0	0,2	0,2	1,4	0,2	0,2	1,1	-0,2	-1,1	2,4	0,3	-1,5
Totaal	7,7	0,7	2,0	7,1	0,1	2,5	6,9	-0,3	-1,2	9,1	-1,3	0,3

Om de totale effectiviteit van de vier spuiacties te berekenen, zijn de effectiviteiten van alle individuele spuiacties bij elkaar opgeteld, en is niet de eindconcentratie (na de vier spuiacties) vergeleken met de startconcentratie. De concentratiestijging die veroorzaakt wordt door het herstarten van de circulatie is dus buiten beschouwing gelaten. Hieruit blijkt dat spuien met 12 volumes bij 1,0 – 1,5 m/s een verwijdering uit de waterfase geeft van 7,7 log *E. coli* (kweek), 7,1 log *E. coli* (qPCR), 7,0 log *Clostridium* D10 en 9,1 log phiX174 (Tabel 9, Figuur 22). Verwijdering uit de biofilm is beperkt of er worden na spuien zelfs hogere aantallen teruggevonden vergeleken met voor spuien (respectievelijk 0,7 log, 0,1 log, -0,3 log en -1,3 log). Deze getallen worden niet beïnvloed door de mate van herstel na 30 minuten circulatie, aangezien de effectiviteit voor elke afzonderlijke spuiactie is berekend en deze bij elkaar zijn opgeteld. Voor de totale effectiviteit is dus niet het verschil tussen de concentratie voor de eerste spuiactie en na de laatste spuiactie gebruikt.



FIGUUR 22. CUMULATIEVE LOG VERWIJDERING VAN VIER SPUIACTIES DIE NA ELKAAR ZIJN UITGEVOERD. DE CUMULATIEVE LOG VERWIJDERING IS BEREKEND DOOR DE LOG VERWIJDERINGEN VAN DE INDIVIDUELE SPUIACTIES BIJ ELKAAR OP TE TELLEN.

## 4 Discussie

### 4.1 Hechtingskarakteristieken

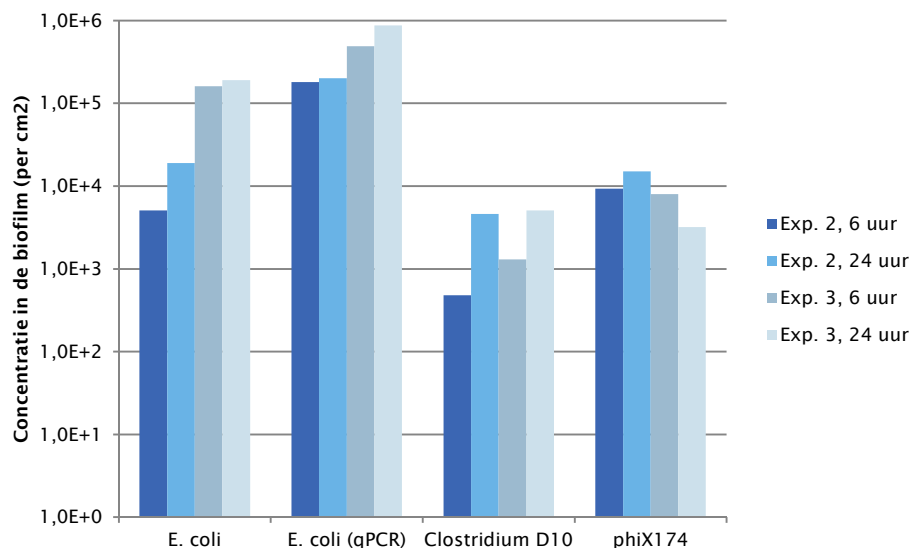
In de experimenten is de mate van hechting van *E. coli* bacteriën, *Clostridium* D10 sporen en phiX174 fagen aan de biofilm bepaald op twee tijdstippen: 5-6 uur en 24 uur na dosering van de verontreiniging aan de distributieopstelling (Tabel 10). De hechtingskarakteristieken van experimenten 2 en 3 komen sterk overeen. Van *Clostridium* D10 is het hoogste percentage (23,8 – 27,4%) van de totale verontreiniging gehecht aan de biofilm. Het hechtingspercentage van *E. coli* ligt ongeveer de helft lager (12,5 – 13,7%) en phiX174 fagen zijn nauwelijks in staat om zich te hechten aan de biofilm met 0,7 en 0,3% hechting na 24 uur.

Percentueel bindt phiX174 het minst goed aan de biofilm. Echter, doordat de dosering aan de proefopstelling niet gelijk is voor de drie micro-organismen (*E. coli*:  $10^{11}$  kve, *Clostridium*:  $10^9$  kve, phiX174:  $10^{11}$  pve, zie Tabel 2) is het hechtingspercentage geen goede indicatie voor het absolute aantal micro-organismen dat gebonden is aan de biofilm (Tabel 10, Figuur 23). De absolute aantallen laten zien dat het aantal gehechte phiX174 fagen per  $\text{cm}^2$  na 24 uur 0,5 log hoger is dan het aantal *Clostridium* D10 sporen. Het aantal gehechte *E. coli* bacteriën is in experiment 3 duidelijk hoger dan het aantal *Clostridium* D10 sporen (1,6 log) en het aantal phiX174 fagen (1,8 log). In experiment 2 komen de aantallen phiX174 en *E. coli* overeen, en zijn beiden ongeveer 0,5 log hoger dan *Clostridium* D10.

TABEL 10. VERDELING VAN MICRO-ORGANISMEN OVER DE WATER- EN BIOFILMFASE IN DE EERSTE 24 UUR NA DOSERING

	<i>E. coli</i>						<i>E. coli</i> (qPCR)					
	Water			Biofilm			Water			Biofilm		
Exp. 1	%	kve/ml	Totaal kve	%	kve/ $\text{cm}^2$	Totaal kve	%	Kopieën DNA/ml	Totaal kopieën DNA	%	Kopieën DNA/ $\text{cm}^2$	Totaal kopieën DNA
5 uur	99,2	$9,3 \times 10^5$	$7,4 \times 10^{10}$	0,8	$1,2 \times 10^4$	$5,9 \times 10^8$	-	-	-	-	-	-
24 uur	99,7	$4,8 \times 10^5$	$3,8 \times 10^{10}$	0,3	$2,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^8$	-	-	-	-	-	-
Exp. 2												
6 uur	99,5	$5,1 \times 10^5$	$5,6 \times 10^{10}$	0,5	$5,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^8$	99,6	$2,3 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{12}$	0,4	$1,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{10}$
24 uur	87,5	$7,0 \times 10^4$	$7,7 \times 10^9$	12,5	$1,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^9$	99,4	$1,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^{12}$	0,6	$2,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{10}$
Exp. 3												
6 uur	89,8	$7,4 \times 10^5$	$8,1 \times 10^{10}$	10,2	$1,6 \times 10^5$	$9,3 \times 10^9$	99,4	$4,1 \times 10^7$	$4,5 \times 10^{12}$	0,6	$4,9 \times 10^5$	$2,9 \times 10^{10}$
24 uur	86,3	$6,3 \times 10^5$	$6,9 \times 10^{10}$	13,7	$1,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{10}$	97,4	$1,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^{12}$	2,6	$8,7 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{10}$

Exp.	<i>Clostridium</i> D10						phiX174						
	Water			Biofilm			Water			Biofilm			
	%	kve/ml	Totaal kve	%	kve/cm <sup>2</sup>	Totaal kve	%	kve/ml	Totaal kve	%	kve/cm <sup>2</sup>	Totaal kve	
Exp. 1	5 uur	93,9	3,0x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>8</sup>	6,1	3,2x10 <sup>2</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-
	24 uur	27,0	4,6x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>7</sup>	73,0	2,0x10 <sup>3</sup>	9,8x10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-
Exp. 2	6 uur	96,3	6,6x10 <sup>3</sup>	7,3x10 <sup>8</sup>	3,7	4,8x10 <sup>2</sup>	2,8x10 <sup>7</sup>	99,5	9,5x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>11</sup>	0,5	9,3x10 <sup>3</sup>	5,4x10 <sup>8</sup>
	24 uur	72,6	6,4x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>8</sup>	27,4	4,6x10 <sup>3</sup>	2,7x10 <sup>8</sup>	99,3	1,1x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>11</sup>	0,7	1,5x10 <sup>4</sup>	8,7x10 <sup>8</sup>
Exp. 3	6 uur	95,3	1,4x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>9</sup>	4,7	1,3x10 <sup>3</sup>	7,5x10 <sup>7</sup>	99,2	5,3x10 <sup>5</sup>	5,8x10 <sup>10</sup>	0,8	8,0x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>8</sup>
	24 uur	76,2	8,6x10 <sup>3</sup>	9,5x10 <sup>8</sup>	23,8	5,1x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>8</sup>	99,7	5,0x10 <sup>5</sup>	5,4x10 <sup>10</sup>	0,3	3,2x10 <sup>3</sup>	1,9x10 <sup>8</sup>



FIGUUR 23. ABSOLUTE AANTAL MICRO-ORGANISMEN GEHECHT AAN DE BIOFILM PER CM<sup>2</sup> IN EXPERIMENT 2 EN 3 NA 6 EN 24 UUR (*E. COLI* EN *CLOSTRIDIUM* D10 IN KVE/CM<sup>2</sup>; *E. COLI* (QPCR) IN DNA KOPIEËN/CM<sup>2</sup> EN PHIX174 IN PVE/CM<sup>2</sup>).

Uit het literatuuronderzoek voorafgaand aan dit onderzoek blijkt dat 24 uur na dosering van 5,6 log phiX174 ongeveer 1 log/cm<sup>2</sup> aan een 7-maanden oude drinkwaterbiofilm bindt (Helmi *et al.*, 2008). Dit is een fors lagere concentratie op de biofilm, vergeleken met dit onderzoek op een kunstmatig gegroeide biofilm (3-4 log/cm<sup>2</sup>). Zowel de hoogte van de dosering als de soort biofilm kunnen hier aan bijdragen.

In kleine reactoren gevuld met glaspereels is op dezelfde manier als in dit onderzoek een kunstmatige biofilm gegroeid. *E. coli* vertoont in beide onderzoeken vergelijkbare hechtingskarakteristieken: ongeveer 10% van de *E. coli* was gehecht aan de biofilm (Bauman *et al.*, 2009). Echter, in een flowkamer waarin gedurende 7-10 maanden een biofilm is gegroeid op plexiglas met drinkwater in Frankrijk blijkt slechts 0,03% gehecht aan de biofilm

(bepaald met epifluorescentie microscopie; Paris *et al.*, 2009). De mate van hechting hangt dus sterk af van het milieu waarin de biofilm is gevormd, waardoor het mogelijk is dat de hechting van *E. coli* aan de biofilm per distributienet verschilt. In het Franse drinkwater is tevens een chloorresidu aanwezig, wat (mede) de verschillen met dit onderzoek veroorzaakt. Daarom verwachten we dat de hier gepresenteerde resultaten representatiever zijn voor de Nederlandse drinkwatersituatie.

In een onderzoek aan de TU Delft werden lagere hechtingspercentages gevonden, bij een vergelijkbare experimentele opzet (Yang *et al.*; 2014). Na 23 en 45 uur is respectievelijk 0,1 en 0,21% van de gedoseerde *E. coli* gehecht aan de biofilm, van de *Clostridium* D10 sporen was respectievelijk 2,41 en 10,12% gehecht. Hechting van MS2 fagen was slechts 0,0002% en 0,001%. Dit is een groot verschil met de resultaten uit dit onderzoek, met meerdere mogelijke oorzaken. Zo is het drinkwater dat is gebruikt in het onderzoek van de TU Delft afkomstig van productielocatie de Laak van Oasen, en is in dit onderzoek Tull en 't Waal water van Vitens gebruikt. Een andere mogelijkheid is dat de materialen niet overal gelijk zijn: de leidingen zijn van hetzelfde materiaal gemaakt (hard PVC), maar van het circulatievat is dit onbekend. Een andere factor is dat in dit onderzoek veel aandacht is besteed aan een juiste wijze van bemonstering en dat de water- en biofilmmonsters die zijn genomen in het onderzoek aan de TU Delft, vervoert zijn naar KWR in Nieuwegein voor analyse wat mogelijk tot verschillen kan leiden.

De US EPA heeft hechtings- en reinigingsexperimenten uitgevoerd met *Bacillus subtilis* sporen. Hiervoor is in een distributieopstelling van PVC, met daarin ringen van cement, gedurende twee weken een biofilm gegroeid waarbij extra groeistoffen zijn gedoseerd. Hieruit blijkt dat in 48 uur ongeveer  $10^3$  sporen/cm<sup>2</sup> aan de biofilm op PVC ondergrond en  $10^3$ - $10^4$  sporen/cm<sup>2</sup> aan de cementringen zijn gehecht (USEPA, 2008).

De verschillen in hechtingscapaciteit tussen de onderzoeken laten zien dat de hechting van micro-organismen sterk af hangt van het milieu waarin de biofilm is gevormd en van de hechtingskarakteristieken van het micro-organisme zelf. De verschillende onderzoeken suggereren ook dat in de eerste uren van blootstelling van de micro-organismen aan de biofilm al snel (binnen 1 tot 6 uur) een hoge mate van hechting optreedt. Na de eerste 6 uur stijgt de concentratie in de biofilm maar in beperkte mate. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat er een bepaald aantal hechtingsplaatsen per biofilm is voor elk micro-organisme, die verzadigd kunnen raken waardoor er geen hogere concentraties in de biofilm gevonden worden. Indien dit het geval is, zou het hechtingspercentage geen goede graadmeter zijn als er meer wordt gedoseerd dan het aantal beschikbare hechtingsplaatsen. Dit aantal plaatsen lijkt wel te variëren per micro-organismen, maar er is nog te weinig bekend om hier een uitspraak over te kunnen doen.

#### 4.2 Chloordesinfectie

Het gebruik van chloor om *E. coli*, *Clostridium* D10 en phiX174 in de waterfase af te doden is zeer effectief gebleken (Tabel 11). Het meest gevoelig voor chloor is phiX174. Bij dosering van 10 mg/l zijn er na 2 uur in de waterfase en na 48 uur in de biofilm geen fagen meer detecteerbaar (Tabel 11). In de eerste 2 uur van de chloordosering wordt 5,1 log *E. coli* uit de waterfase verwijderd en na 6 uur is deze niet langer detecteerbaar door middel van kweek. In de biofilm is de afdoding langzamer waarbij pas na 48 uur geen *E. coli* meer detecteerbaar is. *E. coli* zijn met kwantitatieve PCR (qPCR) na 24 uur nog detecteerbaar in zowel water als biofilm. Dit verschil wordt later in deze discussie besproken. Het meest resistent tegen chloor zijn *Clostridium* D10 sporen met 4,3 log verwijdering in 2 uur in het water en pas na 48 uur niet langer detecteerbaar. De sporen worden in de biofilm niet geheel afgedood in 48 uur.

TABEL 11. EFFECTIVITEIT VAN CHLOREN OP AFDODING VAN MICRO-ORGANISMEN IN DE WATER- EN BIOFILMFASE. GEGEVEN IS DE TIJD DAT DE MICRO-ORGANISMEN ZIJN BLOOTGESTELD AAN CHLOOR, DE HIERUIT BEREKENDE CT-WAARDE WAARBIJ IS GEREKEND MET EEN CONSTANTE CHLOORDOSERING VAN 10 MG/L EN DE GEGEVEN LOG VERWIJDERING. INDIEN EEN '>' VOOR HET GETAL STAAT, BETEKENT DIT DAT ER OP DAT TIJDSTIP GEEN MICRO-ORGANISMEN MEER GEDETECTEERD ZIJN.

	Water			Biofilm		
	Desinfectietijd	CT (mg*min/l)	Verwijdering	Desinfectietijd	CT (mg*min/l)	Verwijdering
<i>E. coli</i> (kweek)	2 uur	1200	5,1 log	1 uur	600	3 – 4 log
	6 uur	3600	>6,7 log	48 uur	28800	>6,5 log
<i>E. coli</i> (qPCR)	1 uur	600	5,6 log	1 uur	600	2,5 log
	24 uur	14400	7,2 log	24 uur	14400	2,8 log
<i>Clostridium</i> D10	2 uur	1200	4,3 log	6 uur	3600	3,0 – 3,3 log
	48 uur	28800	3,2 – >5,3 log	48 uur	28800	3,6 – 4,2 log
phiX174	1 uur	600	6,2 log	1 uur	600	1,4 log
	2 uur	1200	>6,2 log	48 uur	28800	>4,2 log
TU Delft, <i>E. coli</i> (kweek)	2,5 uur*	30000	>8,8 log	2,5 uur	30000	>9,0 log
TU Delft, <i>Clostridium</i> D10	2,5 uur*	30000	>5,9 log	2,5 uur	30000	>6,8 log
TU Delft, phiX174	2,5 uur*	30000	>8,2 log	2,5 uur	30000	>6,8 log

\*: Vrij chloorconcentratie: 200 mg/l

Deze resultaten komen overeen met de literatuur, al is het effect van chloor in deze setting minder sterk dan wat uit de literatuur verwacht werd. Uit de literatuur is bekend dat vrij gesuspendeerde *E. coli* en phiX174 zeer gevoelig zijn voor chloor. De sporen van sporevormende bacteriën, waaronder de hier gebruikte *Clostridium perfringens* D10 sporen, zijn juist zeer resistent tegen chloor. In onze experimenten en de experimenten uitgevoerd door de TU Delft blijkt dat, ondanks dat *Clostridium* het minst gevoelig is tegen chloor, de afdoding sneller is vergeleken met de literatuur (Venczel, 1997). Een mogelijke verklaring hiervoor is de leeftijd van de sporen. *Clostridium* bacteriën worden na het opkweken gedurende 3 weken bewaard in steriel leidingwater waarin de sporen gevormd worden. Ondanks dat deze sporen bestand zijn tegen pasteurisatie, is er meer tijd nodig voordat de sporen resistent worden tegen chloor. Uit UV-desinfectie studies is bekend dat jonge sporen gevoeliger zijn voor UV dan oude sporen (Hijnen *et al.*, 2004). Mogelijk geldt ditzelfde principe voor chloordesinfectie, waarbij oudere sporen, die al langer in leidingwater zitten, resistenter zouden zijn dan pas gevormde sporen.

Eenzelfde CT-waarde voor chloren kan op meerdere manieren worden bereikt: een korte blootstellingsduur met een hoge concentratie of een lange blootstellingduur met een lage concentratie. In het experiment dat is uitgevoerd door de TU Delft is een chloorconcentratie van 200 mg/l gedurende 2,5 uur gedoseerd aan het water. Dit geeft een CT-waarde van 30.000 mg\*min/l. Alle micro-organismen in het water en de biofilm worden afgedood tijdens deze chlooractie, met log verwijderingen van respectievelijk >8,8 log en >9,0 log voor *E. coli*, >5,9 log en >6,8 log voor *Clostridium* D10 en >8,2 log en >6,8 log voor de MS2 fagen. Deze verwijderingsefficiënties komen overeen met de verwijderingen die in experiment 1 en 2 zijn behaald bij lagere chloorconcentraties voor langere tijd. De inactivatiesnelheid vinkt in experiment 1 en 2 echter af in de tijd, waardoor niet gezegd kan worden of bij langere blootstelling hetzelfde effect bereikt zal worden. Er lijken daarom geen aanwijzingen dat bij hoge CT-waardes de concentratie en duur van belang zijn voor de effectiviteit van chloren. Of dit ook geldt voor lagere CT-waardes is niet bekend. In de praktijk betekent dit dat als de

aangegeven CT-waarde wordt bereikt, aangenomen mag worden dat dezelfde log verwijdering wordt behaald als in het pilot distributienet. Daarom is het belangrijk om goed te monitoren of deze CT-waarde wordt gehaald. Het eventueel meten van de aanwezigheid van andere pathogenen (anders dan de indicatorbacteriën) is minder belangrijk.

### 4.3 Effectiviteit van spuien

In dit onderzoek is tijdens alle experimenten één of meerdere malen gespuid, waarbij in totaal 6 spuiacties zijn uitgevoerd. De effectiviteit van het spuien varieert tussen de experimenten (Tabel 12). Een gedeeltelijke verklaring hiervoor zijn kleine verschillen in de opzet tussen de drie experimenten. In experiment 1 is de bemonstering 5 minuten na de herstart van de circulatie uitgevoerd. In deze 5 minuten vindt er ongeveer 1 volume verversing plaats van de distributieopstelling met water uit het circulatievat. Dit zal de concentratie in het water waarschijnlijk hebben verhoogd, zoals in experiment 3 is aangetoond bij de monsters die genomen zijn 30 minuten na herstart van circulatie, waardoor de log verwijdering in het water lager uit valt. In experimenten 2 en 3 is wel direct na het spuien, en voor de herstart van de circulatie, bemonsterd. Hierbij is het verschil echter dat in experiment 3 de eerste spuiactie een lagere snelheid kende dan experiment 2.

TABEL 12. SPUI EFFECTIVITEIT IN LOG VERWIJDERING VOOR DE MICROBIËLE VERONTREINIGING IN DE DISTRIBUTIEOPSTELLING

	<i>E. coli</i> bacteriën			<i>E. coli</i> bacteriën (qPCR)			<i>Clostridium</i> D10 sporen			phiX174 fagen		
	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal	Water	Biofilm	Totaal
Exp 1, 1,5 m/s *	1,2	2,0	1,1	-	-	-	1,1	-0,2	0,6	-	-	-
Exp 2, 1,5 m/s	1,9	1,3	1,8	2,3	0,5	0,6	2,0	0,9	1,4	2,7	1,4	2,7
Exp 3-1, 1,0 m/s	3,1	0,4	1,3	3,0	0,7	2,2	3,0	0,5	1,2	3,3	0,9	3,0
Exp 3-2, 1,5 m/s	2,2	0,7	0,9	1,8	-0,7	0,2	1,8	0,4	-0,1	2,8	0,6	0,1
Exp 3-3, 1,5 m/s	1,4	-0,6	-0,4	0,9	-0,1	-0,1	1,0	-1,0	-1,2	0,6	-3,1	-1,3
Exp 3-4, 1,5 m/s	1,0	0,2	0,2	1,4	0,2	0,2	1,1	-0,2	-1,1	2,4	0,3	-1,5
Slimmer Meten	3,0	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TU Delft	2,9	0	2,4	-	-	-	2,0	0,2	0,9	3,0**	-0,3**	3,0**
USEPA	-	-	-	-	-	-	-	-0,1***	-	-	-	-

\*: bemonsterd 5 minuten na herstart van circulatie. Hierdoor zal de gemeten concentratie hoger zijn en valt de log verwijdering waarschijnlijk lager uit dan wat het in werkelijkheid is. Het is onbekend hoeveel lager dit is.

\*\* : In deze experimenten is MS2 in plaats van phiX174 gebruikt.

\*\*\*: In dit experiment zijn *Bacillus subtilis* sporen gebruikt in plaats van *Clostridium* D10.

Interessant is dat spuien met 1,0 m/s (experiment 3-1, Tabel 12) een betere verwijdering geeft van alle micro-organismen in de waterfase dan spuien met 1,5 m/s (overige experimenten). Het gaat hier slechts om één meting, maar is niet meteen logisch te verklaren. De lagere spuisnelheid heeft als gevolg dat er langer gespuid (42 vs 61 seconden) moet worden om 3 volumeverversingen te bereiken en dat de turbulentie in de leiding minder heftig is (Reynold's getal bij 1,0 m/s: 57886 en bij 1,5 m/s: 86829). De invloed van beide parameters is niet verder onderzocht. Aangezien in de praktijk een spuisnelheid van 1,5 m/s niet altijd haalbaar is, maar 1,0 m/s wel, zou dit mogelijke verschil in effectiviteit verder kunnen worden onderzocht.

Experiment 3 laat zien dat meerdere malen achter elkaar spuien uiteindelijk een grotere verwijdering geeft van verontreiniging in de waterfase, maar dat de effectiviteit per spuiactie lager wordt. Dit effect van verminderde meeropbrengst van meerdere malen spuien geldt niet of nauwelijks voor verontreinigingen in de biofilm. De eerste spuiactie verwijdert de meeste micro-organismen die niet stevig gehecht zijn aan de biofilm, waardoor na de eerste



spuiactie alleen de goed gehechte bacteriën nog over zijn. Deze worden echter niet of nauwelijks verwijderd tijdens de volgende spuiacties. Het effect van spuien op verontreiniging in de biofilm is dus beperkt. Alle micro-organismen worden met een lage effectiviteit verwijderd wat overeenkomt met eerdere onderzoeken naar de effectiviteit van spuien.

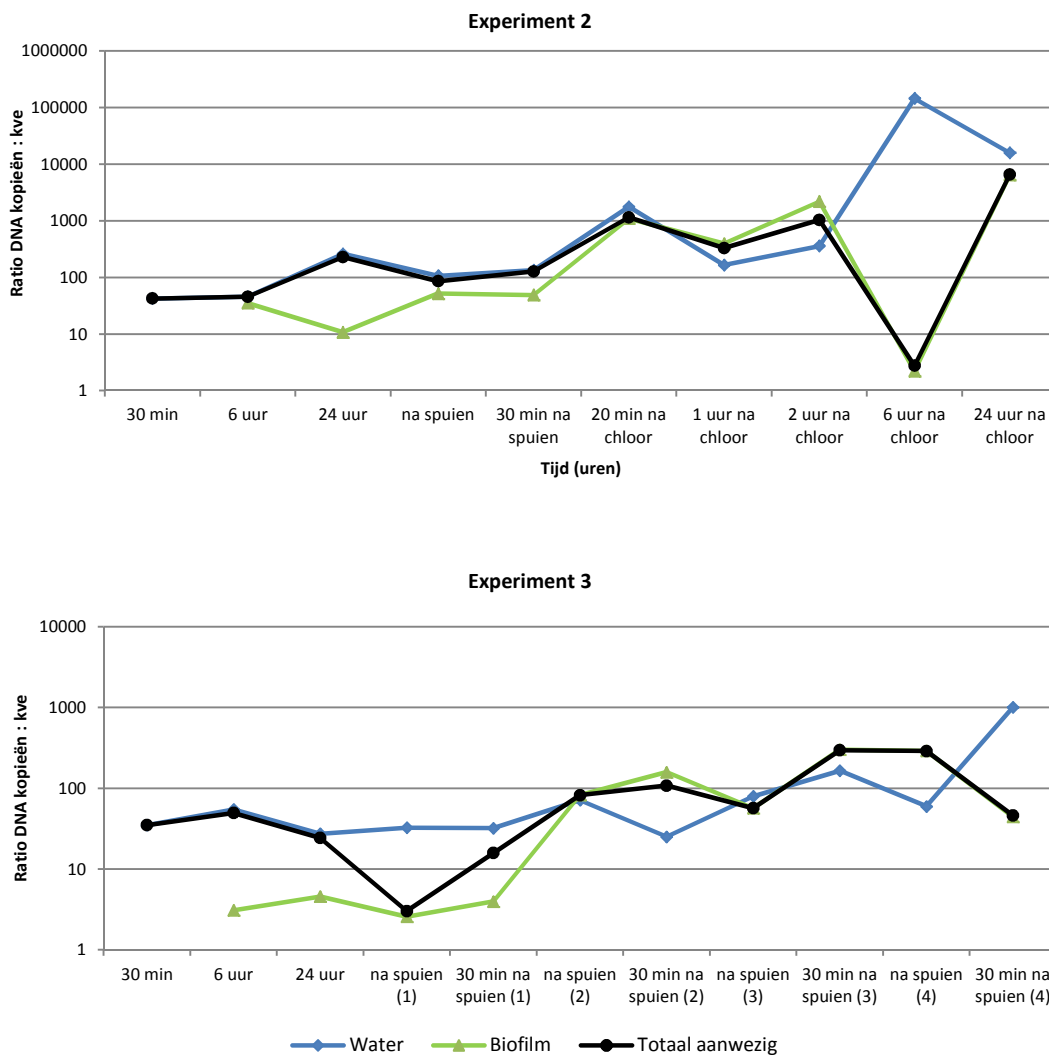
#### 4.4 VBNC *E. coli*

Van verschillende bacteriesoorten is bekend dat zij tijdens stress in een staat kunnen komen waarin zij niet langer kweekbaar zijn, terwijl zij nog wel leven en in de juiste omstandigheden weer kunnen veranderen in een kweekbare staat. VBNC bacteriën (viable but not culturable) kunnen gedetecteerd worden door middel van FISH of kwantitatieve PCR (qPCR). In dit onderzoek is de qPCR methode gebruikt waarmee *E. coli* DNA, in de vorm van het Hsp-gen, wordt aangetoond. Dit kan DNA zijn van levende en kweekbare *E. coli*, van VBNC *E. coli*, maar ook van dode *E. coli* bacteriën waarvan het DNA nog niet is afgebroken. Om deze reden is het onder andere niet bekend hoeveel Hsp-DNA kopieën één *E. coli* bacterie bevat. Dit lijkt te verschillen per situatie.

De verwachting is dat door de lange tijd dat de *E. coli* bacteriën in het water aanwezig zijn en de stress van het chloren of spuien, de *E. coli* bacteriën mogelijk VBNC worden en dus niet langer gedetecteerd worden met de standaard kweekmethode. Om deze reden is van experimenten 2 en 3 zowel met kweek als met qPCR het aantal *E. coli* bepaald.

In experiment 3 (Figuur 21) komen de resultaten van de kweek en qPCR redelijk goed overeen. Het gedrag van de verontreiniging tijdens de spuiacties en de log verwijderingen zijn vergelijkbaar. Dit is ook terug te zien in de ratio tussen het aantal DNA kopieën en het aantal kweekbare *E. coli* (Figuur 24). Deze stijgt licht gedurende de verschillende spuiacties, maar blijft beperkt tot ongeveer 0,5 log voor het water en bijna 2 log voor de biofilm. Dit houdt in dat er met name in de biofilm meer DNA kopieën per kweekbare bacterie worden gemeten en dat het aantal kweekbare bacteriën sneller daalt dan het aantal gemeten DNA kopieën. Een mogelijke verklaring is dat de bacteriën in de biofilm VBNC worden gedurende de spuiperiode, maar dat de bacteriën in de waterfase niet VBNC worden. Het uitvoeren van de vier spuiacties, met tussenliggende circulatietijd, neemt in totaal ongeveer 3 uur in beslag, wat echter vrij kort lijkt om VBNC te worden en dus niet waarschijnlijk is.

In experiment 2 (Figuur 15, Figuur 18) zijn de verschillen tussen de kweek- en qPCR resultaten groter. Terwijl kweekbare *E. coli* na 6 (water) of 48 uur (biofilm) niet langer gedetecteerd worden, is het *E. coli* DNA nog steeds aanwezig. Dit is ook te zien in de DNA:kve ratio (Figuur 24) die na het toedienen van chloor 1 log hoger ligt vergeleken met wanneer er alleen gespuid wordt, daarna blijft de ratio gelijk. Dit verschil kan, zoals hierboven beschreven, veroorzaakt worden door het VBNC worden van de bacteriën maar ook door het afdoden van de bacteriën maar nog niet afbreken van het DNA.



FIGUUR 24. RATIO VAN HET AANTAL *E. COLI* DNA KOPIEËN VERSUS HET KOLONIEGETAL (KVE). DIT GEEFT EEN INDICATIE VAN HET AANTAL DNA KOPIEËN PER KWEKBARE *E. COLI* OP DE VERSCHILLENDE MEETPUNTEN.

#### 4.5 Toepassing van spuien en chloren in de praktijk

In recent BTO-onderzoek (BTO 2016.076) zijn de concentraties coliformen, *E. coli* en *enterococci* in de sleuf bij werkzaamheden gemeten. In totaal zijn hiervoor 36 watermonsters en 70 grondmonsters geanalyseerd, verdeeld over 6 drinkwaterbedrijven. In Tabel 13 zijn hiervan de resultaten vermeld. De spreiding in het aantal *E. coli* bacteriën in het water is groot: 21 monsters hebben een *E. coli*-aantal van 0 – <10 kve/100 ml, 8x 10 – 99 kve/100 ml, 7x 100 – 1000 kve/100 ml en 1x 32000 kve/100 ml. De spreiding in de grond is beduidend minder, met in één geval een concentratie van 50 kve/gram grond, de concentratie van de overige positieve monsters bleef onder de 10 kve/gram grond.

TABEL 13. AANWEZIGHEID EN CONCENTRATIE VAN FECALE VERONTREINIGING IN WATER EN GROND BIJ WERKZAAMHEDEN IN DE SLEUF (UIT: BTO 2016.076).

	Water		Grond	
	kve/100 ml	% positieve monsters	kve/gram	% positieve monsters
Coliformen	<1 - 3,2x10 <sup>5</sup>	89	<1 - 4125	50
<i>E. coli</i>	<1 - 3,2x10 <sup>4</sup>	31	<1 - 50	17
<i>enterococcen</i>	<1 - 7,0x10 <sup>3</sup>	81	<1 - 250	36

De grootste bron van fecale verontreiniging is het (grond)water in de sleuf waarin hoge concentraties micro-organismen aanwezig kunnen zijn. Indien tijdens werkzaamheden dit water in de drinkwaterleiding terecht komt, zal dit vrijwel zeker leiden tot een fecale besmetting.

Aan de hand van bovenstaande gegevens kunnen een aantal scenario's worden opgesteld: geen of beperkte verontreiniging (0 - <10 kve/100 ml), middelmatige verontreiniging (10 - 99 kve/100 ml), een sterke verontreiniging (100 - 1000 kve/100 ml) en een zeer sterke verontreiniging (32000 kve/100 ml). Uit de experimentele resultaten en de literatuur blijkt dat ongeveer 1-10% van de *E. coli* bacteriën in de eerste 6 uur hecht aan de biofilm. Bij een verontreiniging van 100 ml water in de drinkwaterleiding, zou voor de opeenvolgende categorieën ongeveer 0 - 1 kve, 0,1 - 10 kve, 1 - 100 kve en 3200 kve hechten aan de biofilm.

Spuien volgens de richtlijn (1,0 - 1,5 m/s en 3 volumes) verwijdert 0,5 - 1 log *E. coli* uit de biofilm en gemiddeld 1,8 log uit het water. Voor verontreinigingen die in de laagste categorie (0 - <10 kve 100 ml) vallen geeft één spuiactie voldoende verwijdering waarbij *E. coli* niet meer detecteerbaar is in een 100 ml watermonster. Ook zullen er zich in de biofilm geen *E. coli* bacteriën meer bevinden. Vermoedelijk is één spuiactie ook afdoende voor een besmetting met 100 ml van de tweede categorie (10 - 99 kve/100 ml), waarbij slechts in een enkel geval *E. coli* aangetroffen zal worden in een water of biofilmmonster. De in dit project geteste verontreiniging is homogeen verdeeld en niet een propverontreiniging, zoals dat in de praktijk over het algemeen het geval zal zijn. De verwachting is dat het spuien van de propverontreiniging effectiever is. Bij een sterkere verontreiniging zal spuien niet in alle gevallen de gehele verontreiniging uit de biofilm kunnen verwijderen en is chloren noodzakelijk. Door bij werkzaamheden ook het water in de sleuf te bemonsteren kan de mate van mogelijke fecale verontreiniging via die route worden geschat. Met name bij moeilijke en/of risicovolle werkzaamheden kan het nuttig zijn om op deze manier van tevoren een inschatting van de risico's te maken. Bij meer dan 100 kve/100 ml *E. coli* in het sleuf water kan worden besloten om (preventief) chloordesinfectie toe te passen alvorens de leiding vrij te geven. Overigens is deze uitslag pas gelijktijdig met de resultaten van de reguliere waterkwaliteitscontrole bekend, dus na een eerste keer spuien. Vanuit het perspectief van risicobeheersing zou alsnog voor chloren kunnen worden gekozen, zelfs als de waterkwaliteitscontrole geen *E. coli* of *enterococcen* aantoonde. De belangrijkste maatregel tegen (fecale) verontreiniging van het drinkwater blijft uiteraard hygiënisch werken.

Om meer te weten te komen over de aanwezigheid van *E. coli* bacteriën (en dus fecale verontreiniging) in de grond en het grondwater, zouden deze monsters gedurende een periode routinematig kunnen worden genomen. Door het toenemende aantal waarnemingen krijgt de classificatie van de risicoschatting van de grond en het (grond)water meer waarde. Dit zou gecombineerd kunnen worden met aanwijzingen dat het (grond)water in de sleuf

mogelijk sterk verontreinigd is (bijvoorbeeld een nabij gelegen rioolleiding of fecale verontreiniging).

Bij werkzaamheden worden standaard *E. coli*, *enterococce*n en het koloniegetal bij 22°C gemeten. Deze dienen echter als indicatoren voor alle andere pathogene micro-organismen, waaronder virussen, protozoa en andere bacteriën. Het doel van het reinigen is het verwijderen van de pathogene micro-organismen. Dit onderzoek biedt een basis om de verwijdering van pathogene virussen en (sporen van) bacteriën door spuien en chloren te schatten. In rapport BTO2016.017 zijn de mogelijke concentraties pathogenen in de leiding na werkzaamheden geschat. Hoewel omgeven door veel onzekerheden, zijn daar in Tabel 5-11 mogelijke concentraties pathogenen genoemd. In Tabel 5-15 zijn aantallen pathogenen in een leidingsectie bepaald waarbij de kans op een infectie in het aangesloten gebied kleiner is dan 5%. Uitgaande van een leidingsectie van 4 m<sup>3</sup> kan worden geschat hoeveel verwijdering van de verschillende pathogenen nodig is onder de aanname dat het effect van spuien en desinfectie vergelijkbaar is voor fagen versus virussen en *E. coli* versus pathogene bacteriën. Voor de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* is aangenomen dat spuien een vergelijkbaar effect heeft als op *Clostridium* D10 maar geen effect van chloren. In Tabel 14 is het effect van spuien en desinfectie op de geschatte concentraties in de waterfase weergegeven. Hieruit blijkt dat bij een stevige verontreiniging met alleen spuien onvoldoende *Campylobacter* wordt verwijderd. Overigens verwacht je dan ook *E. coli* en *enterococce*n aan te treffen bij de waterkwaliteitscontrole na spuien. Deze aannames zijn gemaakt door de resultaten uit dit rapport te combineren met de resultaten uit het rapport BTO 2016.017 waarin een groot aantal aannames zijn gemaakt met een grote onzekerheid.

TABEL 14. GESCHATTE BENODIGDE EFFECT VAN REINIGEN OP PATHOGENEN EN HET AANGETOONDE EFFECT IN DE WATERFASE. DATA UIT BTO 2016.017.

	Benodigd (BTO2016.017)			Aangetoond (schatting)		
	Verontreiniging (voorspelling)	<1 infectie (95% zekerheid)	Verwijdering benodigd	Verwijdering Spuien**	Desinfectie Chloren	Totaal
	n/l	n/l	log	log	log	Log
Rotavirus/enterovirus	0,20	0,038	0,7	2,7	6,2	8,9
<i>Campylobacter</i>	25,1	0,030	2,9	1,9	5,1	7,0
<i>Cryptosporidium</i>	2,51	0,095	1,4	2,0	-	2,0
<i>Giardia</i>	31,6	1,15	1,4	2,0	<4,3	>2,0
<i>E. coli</i>	80.000	<10*	3,9	1,9	5,1	7,0
<i>enterococce</i> n	6.300	<10*	2,8	1,9	5,1	7,0

\*Voldoen aan eis bij waterkwaliteitscontrole

\*\*Verwijdering experiment 2 gebruikt in dit voorbeeld

Het effect van de uitwisseling met de biofilm is in bovenstaande schatting niet meegenomen. Op basis van het onderzoek wordt verwacht dat een deel van de pathogenen aan de biofilm zal hechten, al zijn de hechtingseigenschappen van de pathogene micro-organismen in de Nederlandse drinkwatersituatie niet bekend. Uit het onderzoek kan niet worden bepaald of de micro-organismen vanuit de biofilm weer in de waterfase terecht komen. De toename ná spuien kan worden verklaard doordat er nog organismen in het recirculatievat aanwezig waren. Deze toename is groter dan wat er vanuit de biofilm kan vrijkomen, zodat die niet kon worden waargenomen bij de experimenten. Het onderzoek laat zien dat spuien weinig effect heeft op organismen in de biofilm, maar dat chloren wel effectief is voor fagen en bacteriën in de biofilm. Chloren biedt dus wel bescherming tegen deze organismen in de biofilm na een grote verontreiniging. Voor de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* wordt echter geen effect van chloren verwacht.

## 5 Conclusies en aanbevelingen

Spuien is een geschikte reinigingsmethode voor het verwijderen van verontreinigingen met micro-organismen in de waterfase. Chloor kan bij grote verontreinigingen worden ingezet en biedt dan aanvullende desinfectie van virussen en bacteriën, maar voor chloor-resistente pathogenen zoals *Cryptosporidium* wordt geen effect verwacht. Indien de micro-organismen tijd hebben gehad om aan de biofilm te hechten zullen deze nauwelijks door spuien worden verwijderd. Met chloor worden ook virussen en bacteriën in de biofilm geïnactiveerd, maar waarschijnlijk niet de chloor-resistente organismen zoals *Cryptosporidium*. De mate van desinfectie voor bacteriesporen lijkt echter beperkt en neemt niet evenredig toe bij een langere blootstellingstijd en dus hogere CT.

Chloren met 10 mg/l doodt zeer effectief *E. coli*, *Clostridium* D10 sporen en phiX174 fagen af. Afdoding van de micro-organismen in de biofilm is langzamer vergeleken met de waterfase. *E. coli* en phiX174 worden geheel uit de biofilm verwijderd, bij de *Clostridium* D10 sporen is dit niet het geval.

Door bij werkzaamheden de concentratie *E. coli* in de grond en het grondwater te bepalen, kan (achteraf) een inschatting worden gemaakt van de mogelijke risico's bij een verontreiniging. Tevens kan worden bepaald of spuien afdoende is om de verontreiniging te verwijderen, of dat chloren noodzakelijk is (in aanvulling op de uitslag van de waterkwaliteitscontrole). Zo is bij een verontreiniging van 100 ml water met 10 kve/100 ml spuien afdoende om zowel het water als de biofilm schoon te maken. Bij grotere verontreinigingen is chloren noodzakelijk om de micro-organismen die aan de biofilm zijn gehecht ook af te doden.

Voor een eerste inschatting op basis van dit pilotonderzoek is aangenomen dat de hechtingseigenschappen van de pathogene micro-organismen overeen komen met de onderzochte test-organismen. Op basis van eerdere schattingen van de concentratie pathogenen in een leiding na werkzaamheden en de effectiviteit van reiniging in dit onderzoek wordt geschat dat de huidige praktijk van spuien en waterkwaliteitscontrole 95% zekerheid geeft dat er geen infectie optreedt na werkzaamheden. Hierbij wordt opgemerkt dat de beschikbare kennis en het aantal uitgevoerde experimenten zeer beperkt zijn, dat er veel aannames zijn gedaan en dat de variaties in voorkomen van pathogenen en de effectiviteit van reinigen zeer variabel zijn. Aanvullend onderzoek op dit gebied, in combinatie met het systematisch verzamelen van praktijkgegevens (zie BTO 2016.017) wordt aanbevolen om deze risico's goed te beheersen.

## 6 Referenties

- Bauman WJ, A Nocker, WL Jones, AK Camper. (2009). Retention of a model pathogen in a porous media biofilm. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. Vol 25, No 3, pp 229-240.
- BTO 2001.175. Hygiëncode Drinkwater. Opslag, transport en distributie. 2<sup>e</sup> editie, december 2010.
- BTO 2013.062. Strategie bij calamiteiten in het leidingnet.
- BTO 2015.058. Hechting en persistentie van indicator- en pathogene micro-organismen in biofilms in drinkwaterdistributiesystemen.
- BTO 2016.047. Slimmer Meten: effect van 12-24 uur wachttijd na spuien op microbiële verontreiniging in drinkwaterleidingen.
- BTO 2016.017. QMRA van het distributienet
- BTO 2016.076. DNA merkers voor de identificatie van fecale besmettingsbronnen bij ingrepen
- Helmi K, S Skrabber, C Gantzer, R Willame, L Hoffmann, and H-M Cauchie. (2008). Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Vaccinal Poliovirus Type 1, and Bacteriophages X174 and MS2 with a Drinking Water Biofilm and a Wastewater Biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 74, No 7, pp 2079-2088.
- Hijnen WAM, AJ van der Veer, EF Beerendonk, GJ Medema (2004). Increased resistance of environmental anaerobic spores to inactivation by UV. *Water Science and Technology: Water supply*, Vol 4, No 2, pp 55-61.
- Paris T, Skali-Lami S, Block J-C (2009). Probing young drinking water biofilms with hard and soft particles. *Wat. Res.* Vol 43, No 1, pp 117-126.
- PCD 1-4:2016. Hygiëncode Drinkwater. Opslag, transport en distributie. Januari 2016.
- USEPA. Pilot-Scale Tests and Systems Evaluation for the Containment, Treatment, and Decontamination of Selected Materials From T&E Building Pipe Loop Equipment, 2008, EPA (United States Environmental Protection Agency).
- Venczel LV., M Arrowood, M Hurd, MD Sobsey (1997). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 63, no 4 pp 1598-1601
- Yang, D. Cleaning of Bio-contaminated Drinking Water Distribution Systems; Master thesis, 2014, Delft University of Technology.

# Bijlage I Experiment 1

## *E. coli* resultaten

### *E. COLI*, WATER

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
5 min	3,5E+10				
5 uur	7,4E+10	-0,3	-0,3		
24 uur	3,8E+10	0,0	0,3		
na spuien	2,4E+09	1,2	1,2		1,2
2.5 uur na chloor	1,0E+02	7,6	6,5		
3.5 uur na chloor	1,0E+02	7,6	0,0	6,5	
7 uur na chloor	1,0E+02	7,6	0,0	6,5	
24 uur na chloor	1,0E+02	7,6	0,0	6,5	
48 uur na chloor	1,0E+02	7,6	0,0	6,5	

\* Rode waardes zijn handmatig op 1,0E+02 gesteld, aangezien de metingen onder de detectiegrens liggen.

### *E. COLI*, BIOFILM

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
5 uur	5,9E+08				
24 uur	1,3E+08	0,7	0,7		
na spuien	5,9E+07	1,0	0,3		0,3
5 min na chloor	5,7E+06	2,0	1,0		
1 uur na chloor	4,4E+03	5,1	3,1		
6 uur na chloor	6,8E+04	3,9	-1,2	4,1	
24 uur na chloor	1,0E+02	6,3	2,4	5,3	
48 uur na chloor	1,0E+02	6,3	0,0	5,3	

### *E. COLI*, TOTAAL (WATER + BIOFILM)

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
5 min	3,5E+10				
5 uur	7,5E+10	-0,3	-0,3		
24 uur	3,9E+10	0,0	0,3		

na spuien	2,5E+09	1,1	1,2		1,2
5 min - 2.5 uur na chloor	5,7E+06	3,8	2,6		
1 - 3.5 uur na chloor	4,4E+03	6,9	3,1		
6 - 7 uur na chloor	6,8E+04	5,7	-1,2	5,7	
24 uur na chloor	1,0E+02	7,5	1,8	6,4	
48 uur na chloor	1,0E+02	7,5	0,0	6,4	

*E. COLI*, % HECHTING AAN DE BIOFILM

	<i>E. coli</i>	
	water	biofilm
5 min	100,0	
5 uur	99,2	0,8
24 uur	99,7	0,3
na spuien	97,6	2,4
2.5 uur na chloor	0,0	100,0
3.5 uur na chloor	0,0	100,0
7 uur na chloor	0,0	100,0
24 uur na chloor	0,0	0,0
48 uur na chloor	0,0	0,0

*Clostridium perfringens* D10 resultaten*CLOSTRIDIUM* D10, WATER

Water	kve totaal	t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
5 min	1,4E+08				
5 uur	2,4E+08	-0,2	-0,2		
24 uur	3,6E+07	0,6	0,8		
na spuien	1,1E+07	1,1	0,5		0,5
7 uur na chloor	6,7E+03	4,3	3,2	3,2	
24 uur na chloor	1,0E+02	5,2	0,9	4,1	
48 uur na chloor	7,3E+03	4,3	-1,0	3,2	

*CLOSTRIDIUM* D10, BIOFILM

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
5 uur	1,6E+07				
24 uur	9,8E+07	-0,8	-0,8		
na spuien	2,3E+07	-0,2	0,6		0,6



6 uur na chloor	1,2E+04	3,1	3,3	3,3	
24 uur na chloor	1,0E+02	4,0	0,9	4,1	
48 uur na chloor	1,4E+03	4,1	0,1	4,2	

#### CLOSTRIDIUM D10, TOTAAL (WATER + BIOFILM)

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
5 min	1,4E+08				
5 uur	2,6E+08	-0,3	-0,3		
24 uur	1,3E+08	0,0	0,3		
na spuien	3,4E+07	0,6	0,6		0,6
6-7 uur na chloor	1,9E+04	3,9	3,3	3,3	
24 uur na chloor	1,0E+02	4,7	0,9	4,1	
48 uur na chloor	8,7E+03	4,2	-0,6	3,6	

#### CLOSTRIDIUM D10, % HECHTING AAN DE BIOFILM

	D10	
	water	biofilm
5 min	100,0	
5 uur	93,9	6,1
24 uur	27,0	73,0
na spuien	32,7	67,3
7 uur na chloor	35,3	64,7
24 uur na chloor	0,0	0,0
48 uur na chloor	83,9	16,1

## Bijlage II Experiment 2

### *E. coli* resultaten

#### *E. COLI*, WATER

Water	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	6,3E+10				
6 uur	5,6E+10	0,0	0,0		
24 uur	7,7E+09	0,9	0,9		
na spuien	9,2E+07	2,8	1,9		1,9
30 min na spuien	5,4E+08	2,1	-0,8		1,2
20 min na chloor	3,9E+04	6,2	4,1	4,1	
1 uur na chloor	3,2E+04	6,3	0,1	4,2	
2 uur na chloor	4,0E+03	7,2	0,9	5,1	
6 uur na chloor	1,0E+02	8,8	1,6	6,7	
24 uur na chloor	1,0E+02	8,8	0,0	6,7	
48 uur na chloor	1,0E+02	8,8	0,0	6,7	

#### *E. COLI*, BIOFILM

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min					
6 uur	3,0E+08				
24 uur	1,1E+09	-0,6	-0,6		
na spuien	5,8E+07	0,7	1,3		1,3
30 min na spuien	4,9E+07	0,8	0,1		1,4
20 min na chloor	4,9E+05	2,8	2,0	2,0	
1 uur na chloor	8,1E+04	3,6	0,8	2,8	
2 uur na chloor	2,3E+03	5,1	1,5	4,3	
6 uur na chloor	2,6E+06	2,1	-3,1	1,3	
24 uur na chloor	2,3E+03	5,1	3,1	4,3	
48 uur na chloor	1,0E+02	6,5	1,4	5,7	

*E. COLI*, TOTAAL

Totaal aanwezig	kve totaal	Logverwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	6,3E+10				
6 uur	5,6E+10	0,0	0,0		
24 uur	8,8E+09	0,9	0,8		
na spuien	1,5E+08	2,6	1,8		1,8
30 min na spuien	5,9E+08	2,0	-0,6		1,2
20 min na chloor	5,2E+05	5,1	3,0	3,0	
1 uur na chloor	1,1E+05	5,7	0,7	3,7	
2 uur na chloor	6,3E+03	7,0	1,3	5,0	
6 uur na chloor	2,6E+06	4,4	-2,6	2,4	
24 uur na chloor	2,3E+03	7,4	3,1	5,4	
48 uur na chloor	1,0E+02	8,5	1,1	6,5	

*E. COLI*, % HECHTING AAN DE BIOFILM

	water (%)	biofilm (%)
30 min	100,0	
6 uur	99,5	0,5
24 uur	87,5	12,5
na spuien	61,5	38,5
30 min na spuien	91,7	8,3
20 min na chloor	7,3	92,7
1 uur na chloor	28,3	71,7
2 uur na chloor	63,1	36,9
6 uur na chloor	0,0	100,0
24 uur na chloor	0,0	100,0
48 uur na chloor	50,0	50,0

*E. coli* (qPCR) resultaten*E. COLI* (QPCR), WATER

	DNA kopieën totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	2,7E+12				
6 uur	2,5E+12	0,0	0,0		
24 uur	2,0E+12	0,1	0,1		
na spuien	9,9E+09	2,4	2,3		
30 min na spuien	7,2E+10	1,6	-0,9		2,2
20 min na chloor	6,8E+07	4,6	3,0	3,0	1,4

1 uur na chloor	5,2E+06	5,7	1,1	4,1
2 uur na chloor	1,4E+06	6,3	0,6	4,7
6 uur na chloor	1,4E+06	6,3	0,0	4,7
24 uur na chloor	1,6E+05	7,2	1,0	5,7

*E. COLI* (QPCR), BIOFILM

	DNA kopieën totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min					
6 uur	1,0E+10				
24 uur	1,2E+10	-0,1	-0,1		
na spuien	3,0E+09	0,5	0,6		
30 min na spuien	2,4E+09	0,6	0,1		0,6
20 min na chloor	5,3E+08	1,3	0,6	0,6	0,7
1 uur na chloor	3,2E+07	2,5	1,2	1,9	
2 uur na chloor	5,1E+06	3,3	0,8	2,7	
6 uur na chloor	5,7E+06	3,3	-0,1	2,6	
24 uur na chloor	1,5E+07	2,8	-0,4	2,2	

*E. COLI* (QPCR), TOTAAL AANWEZIG

	DNA kopieën totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	2,7E+12				
6 uur	2,6E+12	0,0	0,0		
24 uur	2,0E+12	0,1	0,1		
na spuien	1,3E+10	2,3	2,2		
30 min na spuien	7,5E+10	1,6	-0,8		2,2
20 min na chloor	6,0E+08	3,6	2,1	2,1	1,4
1 uur na chloor	3,7E+07	4,9	1,2	3,3	
2 uur na chloor	6,5E+06	5,6	0,8	4,1	
6 uur na chloor	7,2E+06	5,6	0,0	4,0	
24 uur na chloor	1,5E+07	5,2	-0,3	3,7	

*E. COLI* (QPCR), % HECHTING AAN DE BIOFILM

	water (%)	biofilm (%)
30 min	100,0	
6 uur	99,6	0,4
24 uur	99,4	0,6
na spuien	76,7	23,3

30 min na spuien	96,8	3,2
20 min na chloor	11,3	88,7
1 uur na chloor	14,1	85,9
2 uur na chloor	21,9	78,1
6 uur na chloor	20,1	79,9
24 uur na chloor	1,0	99,0

### Clostridium D10 resultaten

#### CLOSTRIDIUM D10, WATER

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	8,4E+08				
6 uur	7,3E+08	0,1	0,1		
24 uur	7,0E+08	0,1	0,0		
na spuien	7,2E+06	2,1	2,0		2,0
30 min na spuien	2,1E+07	1,6	-0,5		1,5
1 uur na chloor	6,6E+03	5,1	3,5	3,5	
2 uur na chloor	9,9E+02	5,9	0,8	4,3	
6 uur na chloor	1,0E+02	5,9	0,0	4,3	
24 uur na chloor	1,0E+02	6,9	1,0	5,3	
48 uur na chloor	1,1E+02	6,9	-4,0	5,3	

#### CLOSTRIDIUM D10, BIOFILM

	kve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
6 uur	2,8E+07				
24 uur	2,7E+08	-1,0	-1,0		
na spuien	3,6E+07	-0,1	0,9		0,9
30 min na spuien	3,9E+07	-0,1	0,0		0,8
1 uur na chloor	7,5E+05	1,6	1,7	1,7	
2 uur na chloor	2,5E+04	3,0	1,5	3,2	
6 uur na chloor	3,7E+04	2,9	-0,2	3,0	
24 uur na chloor	2,3E+03	4,1	1,2	4,2	
48 uur na chloor	1,0E+04	3,4	-0,7	3,6	

*CLOSTRIDIUM D10, TOTAAL (WATER + BIOFILM)*

	kve totaal	t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	8,4E+08				
6 uur	7,5E+08	0,0	0,0		
24 uur	9,7E+08	-0,1	-0,1		
na spuien	4,3E+07	1,3	1,4		1,4
30 min na spuien	6,0E+07	1,1	-0,1		1,2
1 uur na chloor	7,6E+05	3,0	1,9	1,9	
2 uur na chloor	2,6E+04	4,5	1,5	3,4	
6 uur na chloor	3,7E+04	4,4	-0,1	3,2	
24 uur na chloor	2,3E+03	5,5	1,2	4,4	
48 uur na chloor	1,1E+04	4,9	-0,6	3,8	

*CLOSTRIDIUM D10, % HECHTING AAN DE BIOFILM*

	water (%)	biofilm (%)
30 min	100,0	
6 uur	96,3	3,7
24 uur	72,6	27,4
na spuien	16,6	83,4
30 min na spuien	35,0	65,0
1 uur na chloor	0,9	99,1
2 uur na chloor	3,7	96,3
6 uur na chloor	0,0	100,0
24 uur na chloor	0,0	100,0
48 uur na chloor	1,0	99,0

**phiX174 resultaten***PHIX174, WATER*

	pve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	1,0E+11				
6 uur	1,0E+11	0,0	0,0		
24 uur	1,2E+11	-0,1	-0,1		
na spuien	2,2E+08	2,7	2,7		2,7
30 min na spuien	1,9E+09	1,7	-0,9		1,8
20 min na chloor	3,3E+03	7,5	5,8	5,8	
1 uur na chloor	1,1E+03	8,0	0,5	6,2	
2 uur na chloor	1,0E+02	8,0	0,0	6,2	

6 uur na chloor	1,0E+02	8,0	0,0	6,2	
24 uur na chloor	1,0E+02	8,0	0,0	6,2	
48 uur na chloor	1,0E+02	8,0	0,0	6,2	

## PHIX174, BIOFILM

	pve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
6 uur	5,4E+08				
24 uur	8,7E+08	-0,2	-0,2		
na spuien	3,5E+07	1,2	1,4		1,4
30 min na spuien	3,5E+07	1,2	0,0		1,4
20 min na chloor	4,5E+04	4,1	2,9	2,9	
1 uur na chloor	1,3E+06	2,6	-1,5	1,4	
2 uur na chloor	2,3E+03	5,4	2,8	4,2	
6 uur na chloor	4,2E+05	3,1	-2,3	1,9	
24 uur na chloor	1,9E+05	3,4	0,3	2,3	
48 uur na chloor	1,0E+02	5,4	1,9	4,2	

## PHIX174, TOTAAL (WATER + BIOFILM)

	pve totaal	Log verwijdering			
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt	t.o.v. start chloor	t.o.v. 24 uur
30 min	1,0E+11				
6 uur	1,0E+11	0,0	0,0		
24 uur	1,2E+11	-0,1	-0,1		
na spuien	2,6E+08	2,6	2,7		2,7
30 min na spuien	2,0E+09	1,7	-0,9		1,8
20 min na chloor	4,8E+04	6,3	4,6	4,6	
1 uur na chloor	1,3E+06	4,9	-1,4	3,2	
2 uur na chloor	2,3E+03	7,6	2,8	5,9	
6 uur na chloor	4,2E+05	5,4	-2,3	3,7	
24 uur na chloor	1,9E+05	5,7	0,3	4,0	
48 uur na chloor	2,0E+02	8,7	3,0	7,0	

## PHIX174, % HECHTING AAN DE BIOFILM

	phiX174 fagen	
	water	biofilm
30 min	100,0	
6 uur	99,5	0,5
24 uur	99,3	0,7

na spuien	86,2	13,8
30 min na spuien	98,2	1,8
20 min na chloor	6,8	93,2
1 uur na chloor	0,1	99,9
2 uur na chloor	0,0	100,0
6 uur na chloor	0,0	100,0
24 uur na chloor	0,0	100,0
48 uur na chloor	50,0	50,0



## Bijlage III Experiment 3

### *E. coli* resultaten

#### *E. COLI*, WATER

	kve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	7,9E+10		
6 uur	8,1E+10	0,0	0,0
24 uur	6,9E+10	0,1	0,1
na spuien (1)	6,2E+07	3,1	3,1
30 min na spuien (1)	2,5E+09	1,5	-1,6
na spuien (2)	1,8E+07	3,7	2,2
30 min na spuien (2)	2,5E+08	2,5	-1,2
na spuien (3)	9,5E+06	3,9	1,4
30 min na spuien (3)	3,3E+07	3,4	-0,5
na spuien (4)	3,3E+06	4,4	1,0
30 min na spuien (4)	3,3E+06	4,4	0,0

#### *E. COLI*, BIOFILM

	kve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min			
6 uur	9,3E+09		
24 uur	1,1E+10	-0,1	-0,1
na spuien (1)	4,2E+09	0,3	0,4
30 min na spuien (1)	3,5E+09	0,4	0,1
na spuien (2)	7,5E+08	1,1	0,7
30 min na spuien (2)	4,2E+08	1,3	0,3
na spuien (3)	1,5E+09	0,8	-0,6
30 min na spuien (3)	6,9E+08	1,1	0,3
na spuien (4)	4,2E+08	1,3	0,2
30 min na spuien (4)	1,9E+09	0,7	-0,6

#### *E. COLI*, TOTAAL

	kve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	7,9E+10		
6 uur	9,1E+10	-0,1	-0,1
24 uur	8,0E+10	0,0	0,1

na spuien (1)	4,2E+09	1,3	1,3
30 min na spuien (1)	6,0E+09	1,1	-0,2
na spuien (2)	7,7E+08	2,0	0,9
30 min na spuien (2)	6,7E+08	2,1	0,1
na spuien (3)	1,5E+09	1,7	-0,4
30 min na spuien (3)	7,3E+08	2,0	0,3
na spuien (4)	4,2E+08	2,3	0,2
30 min na spuien (4)	1,9E+09	1,6	-0,6

### *E. COLI*, % HECHTING AAN DE BIOFILM

	<i>E. coli</i>	
	water	biofilm
30 min	100,0	
6 uur	89,8	10,2
24 uur	86,3	13,7
na spuien (1)	1,5	98,5
30 min na spuien (1)	42,2	57,8
na spuien (2)	2,3	97,7
30 min na spuien (2)	37,8	62,2
na spuien (3)	0,6	99,4
30 min na spuien (3)	4,5	95,5
na spuien (4)	0,8	99,2
30 min na spuien (4)	0,2	99,8

### *E. coli* (qPCR) resultaten

#### *E. COLI* (QPCR), WATER

	DNA kopieën totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	2,8E+12		
6 uur	4,5E+12	-0,2	-0,2
24 uur	1,9E+12	0,2	0,4
na spuien (1)	2,0E+09	3,1	3,0
30 min na spuien (1)	8,1E+10	1,5	-1,6
na spuien (2)	1,3E+09	3,3	1,8
30 min na spuien (2)	6,3E+09	2,6	-0,7
na spuien (3)	7,5E+08	3,6	0,9
30 min na spuien (3)	5,5E+09	2,7	-0,9
na spuien (4)	2,0E+08	4,1	1,4
30 min na spuien (4)	3,3E+09	2,9	-1,2

*E. COLI* (QPCR), BIOFILM

	DNA kopieën totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min			
6 uur	2,9E+10		
24 uur	5,0E+10	-0,2	-0,2
na spuien (1)	1,1E+10	0,4	0,7
30 min na spuien (1)	1,4E+10	0,3	-0,1
na spuien (2)	6,2E+10	-0,3	-0,7
30 min na spuien (2)	6,6E+10	-0,4	0,0
na spuien (3)	8,5E+10	-0,5	-0,1
30 min na spuien (3)	2,1E+11	-0,9	-0,4
na spuien (4)	1,2E+11	-0,6	0,2
30 min na spuien (4)	8,2E+10	-0,5	0,2

*E. COLI*, TOTAAL

	DNA kopieën totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	2,8E+12		
6 uur	4,5E+12	-0,2	-0,2
24 uur	1,9E+12	0,2	0,4
na spuien (1)	1,3E+10	2,3	2,2
30 min na spuien (1)	9,5E+10	1,5	-0,9
na spuien (2)	6,3E+10	1,6	0,2
30 min na spuien (2)	7,2E+10	1,6	-0,1
na spuien (3)	8,6E+10	1,5	-0,1
30 min na spuien (3)	2,2E+11	1,1	-0,4
na spuien (4)	1,2E+11	1,4	0,2
30 min na spuien (4)	8,5E+10	1,5	0,2

*E. COLI* (QPCR), % HECHTING AAN DE BIOFILM

	water	biofilm
30 min	100,0	
6 uur	99,4	0,6
24 uur	97,4	2,6
na spuien (1)	15,7	84,3
30 min na spuien (1)	85,5	14,5
na spuien (2)	2,0	98,0
30 min na spuien (2)	8,8	91,2
na spuien (3)	0,9	99,1
30 min na spuien (3)	2,5	97,5

na spuien (4)	0,2	99,8
30 min na spuien (4)	0,2	99,8

### *Clostridium* D10 resultaten

#### *CLOSTRIDIUM* D10, WATER

	kve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	2,0E+09		
6 uur	1,5E+09	0,1	0,1
24 uur	9,5E+08	0,3	0,2
na spuien (1)	8,8E+05	3,4	3,0
30 min na spuien (1)	3,9E+07	1,7	-1,6
na spuien (2)	6,2E+05	3,5	1,8
30 min na spuien (2)	3,5E+06	2,8	-0,8
na spuien (3)	3,2E+05	3,8	1,0
30 min na spuien (3)	2,0E+06	3,0	-0,8
na spuien (4)	1,4E+05	4,1	1,1
30 min na spuien (4)	1,1E+06	3,3	-0,9

#### *CLOSTRIDIUM* D10, BIOFILM

	kve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
6 uur	7,5E+07		
24 uur	3,0E+08	-0,6	-0,6
na spuien (1)	9,8E+07	-0,1	0,5
30 min na spuien (1)	9,8E+07	-0,1	0,0
na spuien (2)	3,6E+07	0,3	0,4
30 min na spuien (2)	3,6E+06	1,3	1,0
na spuien (3)	3,3E+07	0,4	-1,0
30 min na spuien (3)	2,9E+07	0,4	0,1
na spuien (4)	4,2E+07	0,3	-0,2
30 min na spuien (4)	3,1E+07	0,4	0,1

#### *CLOSTRIDIUM* D10, TOTAAL

	kve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	2,0E+09		
6 uur	1,6E+09	0,1	0,1
24 uur	1,2E+09	0,2	0,1

na spuien (1)	9,9E+07	1,3	1,2
30 min na spuien (1)	1,4E+08	1,2	0,3
na spuien (2)	3,6E+07	1,7	-0,1
30 min na spuien (2)	7,2E+06	2,4	1,1
na spuien (3)	3,3E+07	1,8	-1,2
30 min na spuien (3)	3,1E+07	1,8	1,5
na spuien (4)	4,2E+07	1,7	-1,1
30 min na spuien (4)	3,2E+07	1,8	1,3

#### CLOSTRIDIUM D10, % HECHTING AAN DE BIOFILM

	D10	
	water	biofilm
30 min	100,0	
6 uur	95,3	4,7
24 uur	76,2	23,8
na spuien (1)	0,9	99,1
30 min na spuien (1)	28,1	71,9
na spuien (2)	1,7	98,3
30 min na spuien (2)	49,1	50,9
na spuien (3)	1,0	99,0
30 min na spuien (3)	6,4	93,6
na spuien (4)	0,3	99,7
30 min na spuien (4)	3,4	96,6

#### phiX174 resultaten

##### PHIX174, WATER

	pve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	5,4E+10		
6 uur	5,8E+10	0,0	0,0
24 uur	5,4E+10	0,0	0,0
na spuien (1)	2,5E+07	3,3	3,3
30 min na spuien (1)	1,4E+09	1,6	-1,7
na spuien (2)	2,3E+06	4,4	2,8
30 min na spuien (2)	6,1E+07	3,0	-1,4
na spuien (3)	1,4E+07	3,6	0,6
30 min na spuien (3)	3,3E+07	3,2	-0,4
na spuien (4)	1,2E+05	5,7	2,4
30 min na spuien (4)	2,9E+07	3,3	-2,4

## PHIX174, BIOFILM

	pve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
6 uur	4,6E+08		
24 uur	1,9E+08	0,4	0,4
na spuien (1)	2,1E+07	1,3	0,9
30 min na spuien (1)	4,6E+07	1,0	-0,3
na spuien (2)	1,2E+07	1,6	0,6
30 min na spuien (2)	6,4E+06	1,9	0,3
na spuien (3)	7,5E+09	-1,2	-3,1
30 min na spuien (3)	1,5E+07	1,5	2,7
na spuien (4)	6,9E+06	1,8	0,3
30 min na spuien (4)	2,5E+07	1,3	-0,6

## PHIX174, TOTAAL

	pve totaal	Log verwijdering	
		t.o.v. start	t.o.v. vorige punt
30 min	5,4E+10		
6 uur	5,9E+10	0,0	0,0
24 uur	5,5E+10	0,0	0,0
na spuien (1)	4,6E+07	3,0	3,0
30 min na spuien (1)	1,4E+09	1,6	-1,4
na spuien (2)	1,4E+07	1,7	0,1
30 min na spuien (2)	6,7E+07	3,0	1,2
na spuien (3)	7,5E+09	1,7	-1,3
30 min na spuien (3)	4,8E+07	3,2	1,5
na spuien (4)	7,1E+06	1,7	-1,5
30 min na spuien (4)	5,4E+07	3,3	1,6

## PHIX174, % HECHTING AAN DE BIOFILM

	phiX174 fagen	
	water	biofilm
30 min	100,0	
6 uur	99,2	0,8
24 uur	99,7	0,3
na spuien (1)	54,3	45,7
30 min na spuien (1)	96,8	3,2
na spuien (2)	16,0	84,0
30 min na spuien (2)	90,6	9,4
na spuien (3)	0,2	99,8
30 min na spuien (3)	68,5	31,5
na spuien (4)	1,7	98,3
30 min na spuien (4)	53,1	46,9