

BTO 2018.090 | November 2018

BTO rapport

Invloed van
stroomsnelheid op de
verdeling van bacteriën
in biofilm en water

BTO

Invloed van stroomsnelheid op de verdeling van bacteriën in biofilm en water

BTO 2018.090 | November 2018

Opdrachtnummer

400554-221-005

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Anthony Verschoor & Paul van der Wielen

Auteur

Kimberly Learbuch

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie

Kimberly Learbuch

T +31 (0)30 60 69 599

E kimberly.learbuch@kwrwater.nl

Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

F +31 (0)30 60 61 165

E info@kwrwater.nl

I www.kwrwater.nl

The logo for KWR (Watercycle Research Institute) features the letters 'KWR' in a bold, blue, sans-serif font. The 'K' and 'R' have a stylized, rounded appearance, while the 'W' is composed of two 'V' shapes.

Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.090 | November 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Keywords

BTO Managementsamenvatting

Stroomsnelheid niet van invloed op de verdeling van micro-organismen in biofilm en water

Auteur Kimberly Learbuch MSc.

Verschillen in hydraulische regimes zorgen niet voor verschillende samenstellingen in bacteriepopulaties in water en biofilm. Dit blijkt uit een studie waarin met de proefinstallatie KIVODIS vier verschillende hydraulische regimes zijn geanalyseerd. Van water- en biofilmmonsters zijn de ATP-concentraties bepaald, KG25-aantallen, specifieke qPCR genkopieën en de bacteriële populatie (met *Next Generation Sequencing*, afgekort NGS). Kennis over de biofilm op de buiswand in het distributiesysteem is belangrijk voor het waarborgen van de microbiologische waterkwaliteit aan de tap, omdat de waterkwaliteit wordt beïnvloed door de mate van nagroei. Uitwisseling tussen waterfase en biofilm lijkt beperkt.



Proefinstallatie KIVODIS (*KWR in vitro distributiesysteem*) bij KWR

Belang: meer zicht krijgen op verdeling van bacteriën in biofilm en water en de effecten van hydraulica hierop

In hoeverre de verdeling van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm op buiswand in het distributiesysteem van invloed is op de microbiologische waterkwaliteit, is onbekend. Evenals wat het effect is van hydraulica. Voor waterbedrijven is het belangrijk te weten of opportunistische pathogenen en wettelijke parameters voor nagroei in het drinkwater voorkomen. De mate van nagroei heeft mogelijk invloed op de microbiologische waterkwaliteit aan de tap. Met deze studie is onder verschillende hydraulische regimes meer zicht verkregen op de verdeling van micro-organismen tussen water en biofilm.

Aanpak: analyse vier verschillende hydraulische regimes in dynamisch systeem KIVODIS

Met de proefinstallatie KIVODIS zijn vier verschillende hydraulische regimes geanalyseerd. Van de water- en biofilmmonsters zijn de ATP-concentraties bepaald, evenals KG25-aantallen, specifieke qPCR genkopieën (*Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. en Schimmel) en samenstelling van de bacteriële populatie aan de hand van NGS.

Resultaten: verschillende hydraulisch regimes vertonen overeenkomstige micro-organismen samenstelling

De verschillende hydraulische regimes hebben geen invloed op de ATP-concentratie in water. Bij lagere snelheid treedt meer biomassa-vorming op dan bij hogere snelheid en variabele flows. De onderzochte hydraulische regimes hebben geen invloed op KG25-aantallen in het water en de biofilm. De biofilm bevat

percentueel de meeste aantallen (*Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. en Schimmels 16S/18S rRNA genkopieën). NGS toonde aan dat bij verschillende hydraulische regimes dezelfde groepen samen clusteren. De resultaten leiden tot de conclusie dat de hier onderzochte hydraulische regimes een vergelijkbare invloed hebben op de microbiële populatie.

Implementatie: verdeling lijkt niet te worden beïnvloed door hydraulica

Verskillende hydraulische regimes leiden tot vergelijkbare dichtheidsverdelingen van micro-organismen tussen water en biofilm, en tot vergelijkbare microbiologische clusters.

Uitwisseling tussen waterfase en biofilm lijkt beperkt.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *Invloed van hydraulica op de uitwisseling van bacteriën tussen biofilm en water* (BTO-2018.090).

Andere relevant rapport:

- Invloed van leidingmateriaal op de uitwisseling van bacteriën tussen biofilm en water (BTO 2018.032).

Meer informatie

Kimberly Learbuch

T +31 (0)30 60 69 599

E kimberly.learbuch@kwrwater.nl

KWR

PO Box 1072

3430 BB Nieuwegein

The Netherlands



Watercycle
Research
Institute

Samenvatting

De microbiologische waterkwaliteit aan de tap wordt onder andere beïnvloed door de mate van nagroei in het drinkwaterdistributiesysteem. Het is onduidelijk wat de mate van uitwisseling is van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en wat het effect van hydraulica hierop is. Er is altijd aangenomen dat de uitwisseling van micro-organismen tussen biofilm en waterfase dusdanig groot is, dat de microbiële populatie in het drinkwater aan de tap grotendeels bestaat uit organismen uit de biofilm. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de dominante bacteriepopulatie in het drinkwater aan de tap vergelijkbaar is met de bacteriepopulatie af pompstation. Hieruit volgt de vraag in hoeverre biofilmvorming in het distributiesysteem een negatieve invloed heeft op de microbiologische waterkwaliteit aan de tap. Dergelijke informatie is van belang voor drinkwaterbedrijven omdat deze uitwisseling, voor een deel, bepaalt of opportunistische pathogenen (bv *Legionella pneumophila*) en wettelijke parameters voor nagroei (KG22, *Aeromonas* en *Legionella*) in het drinkwater voorkomen. Deze informatie kan bruikbaar zijn om aan te geven in hoeverre microbiologische waterkwaliteitsparameters gemeten aan de tap bepaald worden door de biofilmconcentratie en – samenstelling in het distributiesysteem (en de drinkwaterinstallatie). Zo wordt het bijvoorbeeld mogelijk om op een gerichtere manier de microbiologische waterkwaliteit op probleemlocaties te verbeteren, omdat duidelijk wordt of beheersmaatregelen zich op de waterfase, de biofilmfase of beide moeten richten. In dit onderzoek is daarom de verdeling van micro-organismen over de biofilm- en waterfase bepaald voor vier verschillende hydraulische regimes in KIVODIS. Van de water en biofilm monsters zijn de ATP concentraties bepaald, KG25 aantallen, specifieke qPCR's genkopieën en de bacteriële populatie (NGS).

De verschillende hydraulische regimes hebben geen invloed op de ATP-concentratie in water. Een lagere stroomsnelheid veroorzaakt meer biofilmvorming, in vergelijking met hogere snelheid en variabele flows. De verschillende hydraulische regimes hebben geen invloed op KG25-aantallen in het water en de biofilm. Percentueel bevinden de meeste aantallen (*Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. en Schimmels 16S/18S rRNA genkopieën) zich in de biofilm. Met NGS werd gevonden dat bij verschillende hydraulische regimes dezelfde groepen samen clusteren. Op basis hiervan kunnen we concluderen dat de verschillende hydraulische regimes geen invloed hebben op de microbiële populatie.

Het lijkt er dus op dat uitwisseling niet beïnvloed wordt door verschillende hydraulische regimes die in dit onderzoek zijn geanalyseerd.

Inhoud

Samenvatting	2
Inhoud	3
1 Inleiding	4
1.1 Aanleiding	4
1.2 Doel van de studie	4
2 Materiaal en methoden	5
2.1 Proefinstallatie	5
2.2 Schoonmaken coupons	7
2.3 Schoonmaken proefinstallatie	7
2.4 Spuien	7
2.5 Monsternamen	7
2.6 Analyses	8
2.7 Aanpassing KIVODIS systeem na experiment 1	9
3 Resultaten	10
3.1 BPP-test verstrekt en onverstrekt PVC-U	10
3.2 Algemene parameters	10
3.3 ATP	14
3.4 KG25	22
3.5 Koolhydraten	27
3.6 qPCR	27
3.7 NGS	43
4 Discussie	57
4.1 ATP en KG25	57
4.2 qPCR's	58
4.3 Effect van spuien	58
4.4 NGS	59
4.5 Uitwisseling	61
5 Conclusies en aanbevelingen	63
5.1 Conclusies	63
5.2 Aanbevelingen	63
6 Referenties	64
Bijlage I Uitgebreide schoonmaakprocedure set-up en coupons 65	
Bijlage II Simdeum patronen	68
Bijlage III Gemiddelde concentraties qPCR's	70

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

De microbiologische waterkwaliteit aan de tap wordt onder andere beïnvloed door de mate van nagroei in het drinkwaterdistributiesysteem. Het is onduidelijk wat de mate van uitwisseling is van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en wat het effect van hydraulica hierop is.

Er waren altijd sterke vermoedens dat de uitwisseling van micro-organismen tussen biofilm en waterfase dusdanig groot is, dat de microbiële populatie in het drinkwater aan de tap grotendeels bestaat uit organismen uit de biofilm. Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat de dominante bacteriepopulatie in het drinkwater aan de tap vergelijkbaar is met de bacteriepopulatie af pompstation (Roeselers et al., 2015). Hieruit volgt de vraag in hoeverre biofilmvorming in het distributiesysteem een negatieve invloed heeft op de microbiologische waterkwaliteit aan de tap. Dergelijke informatie is van belang voor drinkwaterbedrijven omdat deze uitwisseling, voor een deel, bepaalt of opportunistische pathogenen (bv *Legionella pneumophila*) en wettelijke parameters voor nagroei (KG22, *Aeromonas* en *Legionella*) in het drinkwater voorkomen. Deze informatie kan bruikbaar zijn om aan te geven in hoeverre microbiologische waterkwaliteitsparameters gemeten aan de tap bepaald worden door de biofilmconcentratie en –samenstelling in het distributiesysteem (en de drinkwaterinstallatie). Zo wordt het bijvoorbeeld mogelijk om op een gerichtere manier de microbiologische waterkwaliteit op probleemlocaties te verbeteren, omdat duidelijk wordt of beheersmaatregelen zich op de waterfase, de biofilm fase of beide moeten richten.

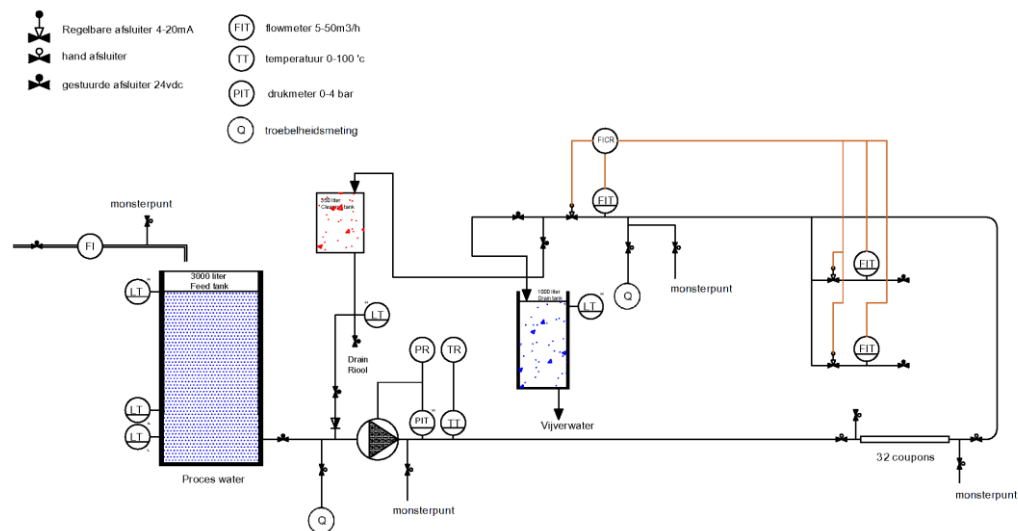
1.2 Doel van de studie

Het doel van deze studie is om het effect van hydraulica op de uitwisseling van micro-organismen tussen waterfase en biofilm te bepalen in een proefopstelling zonder sediment.

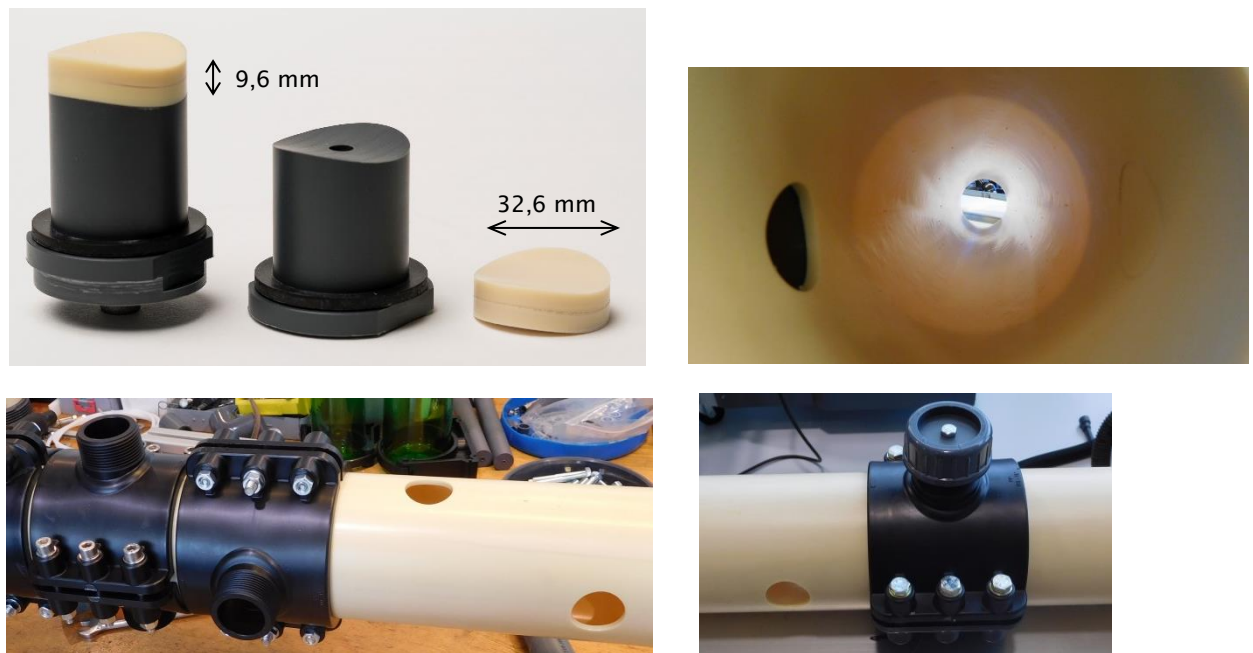
2 Materiaal en methoden

2.1 Proefinstallatie

Om het effect van hydraulica op de mate van uitwisseling van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm te onderzoeken, werd gebruikt gemaakt van een proefopstelling. De proefopstelling bestaat uit twee aparte loops, die elk bestaan uit minimaal 12 meter recht PVC-U leidingmateriaal met een diameter van 110 mm. Een schematische tekening en foto van de proefopstelling zijn te zien in Figuur 1. In de tekening worden de diverse sensoren weergegeven, zoals een temperatuurmeter, flowmeter, troebelheidsmeter en drukmeter. Verder heeft iedere loop heeft een eigen pomp en watertank van 3 m³, zodat er voldoende water beschikbaar is om de benodigde debieten in de leidingen te krijgen. Deze tanks worden automatisch bijgevuld mocht het niveau te laag worden. Daarnaast zijn de twee tanks ook gekoppeld aan elkaar. Er wordt gebruik gemaakt van het drinkwater van het pompstation 't Tull en Waal. Het water stroomt continue door het systeem en het water circuleert dus niet. Voor biofilmbemonsteringen wordt gebruik gemaakt van coupons, zoals te zien in Figuur 2. Deze coupons bevinden zich aan het einde van het rechte stuk van de 12 meter lange PVC-U leiding. Er zitten 32 coupons per loop, om de beurt boven en onder en aan de zijkanten van de van de buis (Boven, Onder, Voor en Achter).



FIGUUR 1 TECHNISCHE TEKENING EN FOTO PROEFOPSTELLING.



FIGUUR 2 ONTWERP VAN COUPONS, DE COUPON IS $\pm 32,6$ MM IN DOORSNEDE EN $\pm 9,6$ MM HOOG.

Verschillende hydraulische regimes die algemeen voorkomen in het drinkwater distributienetwerk, zijn geanalyseerd (pers. com. M. Blokker). In Tabel 1 is een overzicht weergegeven van de vier onderzochte snelheden. Elk experiment duurde drie maanden.

TABEL 1 OVERZICHT HYDRAULISCHE REGIMES

Loop	Experiment 1	Experiment 2
1	Constance snelheid (0,04 m/s)	Dag/nacht ritme 100 huizen
2	Constance snelheid (0,20 m/s)	Lage gevarieerde snelheid (0,04 - 0,50 m/s)

De gemiddelde verblijftijden per snelheid staan in Tabel 2. Voor het dag/nacht ritme en lage gevarieerde snelheid is de gemiddelde snelheid gebruikt om de verblijftijd te berekenen. Gemiddeld was de verblijftijd in de loop tijdens de lage constante snelheid en dag/nacht ritme vijf keer zo hoog dan bij de andere twee snelheden, in de watertank was dit vier keer zo hoog.

TABEL 2 GEMIDDELDE VERBLIJFTIJDEN PER EXPERIMENT

Snelheid	Verblijftijd in loop (min)	Verblijftijd in watertank (min)
Constance snelheid (0,04 m/s)	11	101
Constance snelheid (0,20 m/s)	2	20
Dag/nacht ritme 100 huizen	10	91
Lage gevarieerde snelheid (0,04 - 0,50 m/s)	2	21

2.2 Schoonmaken coupons

Voor gebruik werden de coupons schoongemaakt. De coupons werden in een glazen bekeerglas gebracht met daarin SDS (10 g/l natrium dodecylsulfaat). Daarna werd het bekeerglas in een waterbad gezet van 100°C gedurende 15 min. Vervolgens werden de coupons verdeeld over meerdere bekeerglazen en voor 10 min in het ultrasoonbad gezet en daarna gespoeld voor 15 min. De coupons zijn na het spoelen gedurende 15 min in citroenzuur (30 g/l) geplaatst. Vervolgens werden ze weer gespoeld voor 15 min en gedroogd in de droogstoof totdat de coupons droog waren. Dit is allemaal gedaan volgens KWR-huisvoorschrift LMB-072. Daarna zijn de coupons gespoeld volgens KWR-huisvoorschrift LMB-006:

- Plaats de coupons in een bekeerglas en spoel gedurende 60 ± 5 min (1 tot 3 m/min)
- Laat de coupons vervolgens gedurende 24 ± 1 uur in het water bij kamertemperatuur staan
- Spoel de coupons nogmaals gedurende 60 ± 5 min (1 tot 3 m/min)
- Laat de coupons staan in het water tot gebruik.

2.3 Schoonmaken proefinstallatie

Voorgaand aan het eerste experiment, en na ieder experiment werd de proefinstallatie schoongemaakt met 200 mg/l natriumhypochloriet, dat werd gecirculeerd gedurende 2,5 uur. Aangenomen wordt dat met een hoge chloordosering een groot deel van de nog aanwezige micro-organismen worden gedood. Om de biofilm te verwijderen is achtereenvolgens 10 g/l SDS en 30 g/l citroenzuur gedurende 30 minuten gedoseerd in de proefopstelling. Tussendoor werd het systeem doorspoeld gedurende 30 minuten met drinkwater, zodat er geen chemische stoffen achterblijven in het systeem (van Bel, 2018). Daarna staat het systeem 24 ± 1 uur stil en werd daarna voor 60 ± 5 min gespoeld. Een uitgebreide uitleg is te vinden in bijlage I. De tank is niet schoongemaakt.

2.4 Spuien

Na ieder experiment van 12 weken is er 3 minuten gespuid met een snelheid van 44,1 m³/h (1,5 m/s). Daarna wordt de installatie stopgezet en worden er direct watermonsters en biofilmmonsters genomen.

2.5 Monstername

Er zijn drie verschillende watermonsters (500 ml) genomen, zie Figuur 1:

- Watermonster in tank: water wat in de buffertank gaat
- Watermonster na coupons: water na de coupons en voor de bocht (na 12 m)
- Watermonster uit loop: water aan het einde van de 24 m

Tijdens couponbemonstering werd het deel met de coupons geïsoleerd door de twee afsluiters dicht te zetten. Vervolgens liep het water uit dit gedeelte weg in het riool. De vier coupons werden uitgenomen en vervangen door schone coupons. Na bemonstering werd de afsluiter het dichtst bij de bocht weer open gezet, daarna werd het programma gestart en vervolgens werd de andere afsluiter langzaam open gezet.

Op de laatste dag van het experiment zijn er na het spuien (3 minuten met een snelheid van 44,1 m³/h (1,5 m/s)), water,- en biofilmmonsters genomen. Voor en na het spuien zijn dubbele hoeveelheden coupons uitgenomen.

2.5.1 Coupon bemonstering

De coupon uit de set-up wordt in een volume van 60 ml steriel leidingwater (gefiltreerd over 0,22 µm) gebracht. Vervolgens werd alleen het gedeelte wat in contact staat met het water in de proefinstallatie schoon gemaakt met een tandenborstel. Daarna werd de biofilm verder losgemaakt door middel van Hoge Energetische Sonficatie (HES).

2.6 Analyses

2.6.1 ATP

ATP is aanwezig in alle levende organismen en wordt in de cel gevormd bij de oxidatie van energiebronnen en vervolgens gebruikt bij de synthese van nieuw celmateriaal. De ATP bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (een foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de bepaling bij direct onderzoek van drinkwater bedraagt ca. 1 ng ATP l⁻¹. Op basis van gemiddelde waarden voor het ATP-gehalte per bacteriecel kan met het ATP-gehalte een schatting worden gemaakt van de concentratie aan actieve (levende) bacteriën. De ATP-bepaling wordt gebruikt voor de bepaling van de biomassaconcentratie in leidingwater en in biofilms en in testen voor de bepaling van de biologische (in)stabiliteit van water en de groeibevorderende eigenschappen van materialen in contact met leidingwater.

De ATP-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-002.

2.6.2 Koloniegetal bij 25°C (KG25)

Het koloniegetal bij 25°C (KG25) is een maat voor het aantal heterotrofe bacteriën dat in staat is te groeien op R2A medium, geïncubeerd voor 10 dagen bij 25°C. Het R2A medium bevat lage concentraties voedingstoffen en benadert daardoor goed de voedselarme conditie van drinkwater.

De KG25-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-014.

2.6.3 BPP-test

De groeipotentie van de verschillende materialen is bepaald met de BPP-test zoals beschreven in NEN-EN16421. De materialen zijn daarbij in stukken met de juiste oppervlakte (25 cm²) gesneden en zes stukken (totaal oppervlakte 150 cm²) zijn toegevoegd aan flessen met 900 ml drinkwater. De stukken zijn omwonden met een roestvrijstalen draad, zodat de materialen niet aan elkaar blijven plakken. De flessen zijn vervolgens geïncubeerd bij 30°C en wekelijks ververs met drinkwater. Na 8, 12 en 16 weken is de ATP concentratie bepaald van de biofilm op de materiaalstukjes, en van het water. De biofilm wordt losgemaakt door middel van HES in een klein volume water (2.5.1).

De KG25-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-006.

2.6.4 DNA

Elk water en biofilm monster werd gefiltreerd gebruik makend van een 0,22µm filter, waarna de filters met DNA van een interne controle werden opgeslagen bij -20°C. Later werd DNA uit deze filters geïsoleerd met de PowerBiofilm™ DNA Isolation kit (MoBio).

De DNA isolatie is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-069.

2.6.5 qPCR

Het aantal genkopieën van de qPCR's genoemd in Tabel 3 werden bepaald.

TABEL 3 LIJST VAN QPCR'S GEBRUIKT IN DIT ONDERZOEK

	Doelgen	KWR-huisvoorschrift	Bron
16S	16S rRNA		Pers. Com. Gabriela Paulus
<i>Legionella</i> spp.	16S rRNA	LMB-068, bijlage 01	(Heijnen et al., 2002)
<i>Mycobacterium</i> spp.	16S rRNA	LMB-065, bijlage 20	(van der Wielen et al., 2014)
Schimmels	18S rRNA	LMB-065, bijlage 29	(Van der Kooij et al., 2006; Wullings et al., 2005)

De berekening van de percentuele verdeling rust op de aanname dat er in één loop 224 liter zit en een heeft oppervlakte van 7690 cm².

2.6.6 NGS

Gebarcodeerde fragmenten van het 16S rRNA gen (~300bp), gericht op het V4 hypervariabele regio, werden geamplificeerd van het geïsoleerde DNA, gebruik makend van de primers 515F en 806R. Negatieve controles (blanco) zijn meegenomen. Gezuiverde PCR producten zijn gesequenced met de Illumina MiSeq bij KWR. Deze DNA-sequenties zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van het computerprogramma Mothur, zie voor uitleg 3.7. De figuren zijn vervolgens gemaakt met online beschikbaar script voor analyses in het statistisch softwareprogramma R (phyloseq).

2.6.7 Koolhydraten

Koolhydraten worden bepaald met behulp van D(+)-glucose en spectrometrie. De adsorptie wordt gemeten door een spectrometer die licht door het monster heen stuurt op een golflengte van 490 nm en het licht vervolgens opvangt in de detector en dan uitrekent hoeveel licht er geadsorbeerd is.

De koolhydraten analyse isolatie is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LAM-075 en is gebaseerd op de Dubois methode (Dubois et al., 1956)

2.7 Aanpassing KIVODIS systeem na experiment 1

Na het runnen van experiment 1 (10 januari – 4 april 2018) zijn er aanpassingen in het systeem doorgevoerd om de benodigde lage snelheden voor experiment 2 te halen. Gedurende experiment 1 was de snelheid die kon worden ingesteld 1,5 – 46 m³/h. Er zijn twee extra kleppen toegevoegd zodat snelheden 0 – 0,250 m³/h en 0,250 – 1,5 m³/h kunnen worden gehaald.

3 Resultaten

3.1 BPP-test verstrekt en onverstrekt PVC-U

In de proefinstallatie is onverstrekt PVC-U verwerkt, dit is veelvuldig toegepast in het distributiesysteem in de afgelopen jaren. Tegenwoordig gaat de voorkeur uit naar verstrekt PVC-U (pers. com. George Mesman). Het verschil tussen deze twee materialen zit in het feit dat verstrekt PVC-U wordt gemaakt door onverstrekt PVC-U uit elkaar te trekken. De gevolgen zijn dat de wanddikte van verstrekt PVC-U dunner is in vergelijking met onverstrekt PVC-U. Door het uit elkaar trekken proces wordt het materiaal ook gladder. Er is daarom een BPP-test uitgevoerd om de twee materialen te vergelijken.

De resultaten van de BPP-test, Tabel 4, laten zien dat t.a.v. BPP-waarden er geen significant verschil is tussen verstrekt en onverstrekt PVC-U.

TABEL 4 BPP VAN ONVERSTREKT EN VERSTREKT PVC-U (GECORRIGEERD VOOR GLAS).

Materiaal	BPP (pg ATP/cm ²)	
	Gem	Stdev
Onverstrekt PVC-U (4,2 mm dik)	29	4
Verstrekt PVC-U (3,0 mm dik)	33	6

3.2 Algemene parameters

Gedurende experiment 1 was de constante snelheid in loop 1 0,04 m/s (1,16 m³/h) en in loop 2 was de constante snelheid 0,2 m/s (5,9 m³/h). Experiment 1 liep gedurende 10 januari 2018 – 4 april 2018.

Gedurende experiment 2 liep er een dag en nacht ritme gebaseerd op 100 huizen in loop 1 en was de gemiddelde snelheid 0,045 m/s (1,3 m³/h) en varieerde de snelheid in loop 2 van 0,04 m/s tot 0,5 m/s (1,17 – 14,7 m³/h). De maximale snelheid van loop 1 was 17,4 m³/h en van loop 2 15,7 m³/h. Zowel het dag en nacht ritme en de variabele flow had stappen van 5 min. Het dag en nacht ritme komt uit Simdeum (zie bijlage II voor de memo voor meer informatie over het patroon). Experiment 2 liep gedurende 23 mei 2018 – 14 augustus 2018.

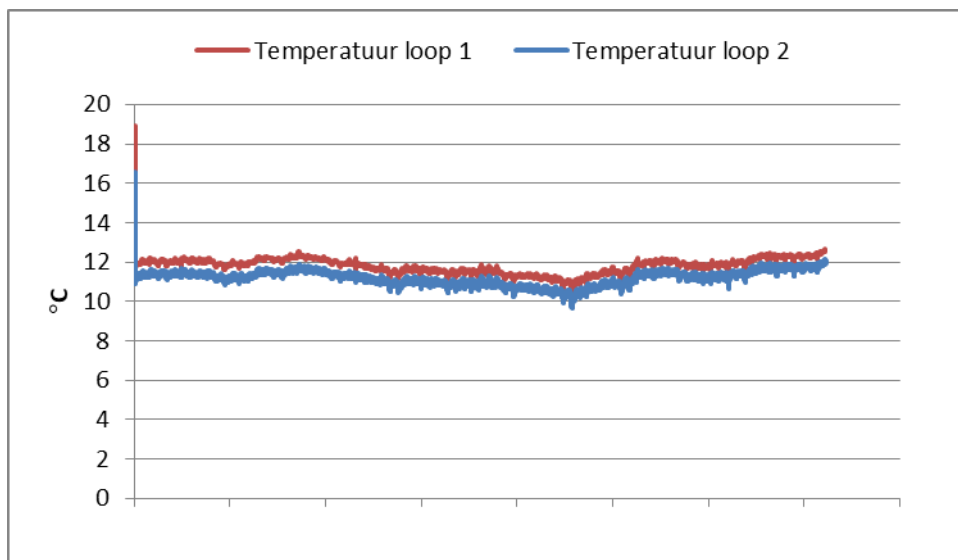
Op 2 augustus is de klep kapot gegaan die de snelheid regelde van 0 tot 0,250 m³/h. Dit zorgde ervoor dat er vanaf 2 augustus geen stroming was (=0 m³/h) wanneer de ingestelde snelheid kleiner was dan 0,250 m³/h.

Het bemonsteringschema is te vinden in Tabel 5.

TABEL 5 BEMONSTERINGSHEMA GEDURENDE EXPERIMENT 1 EN 2.

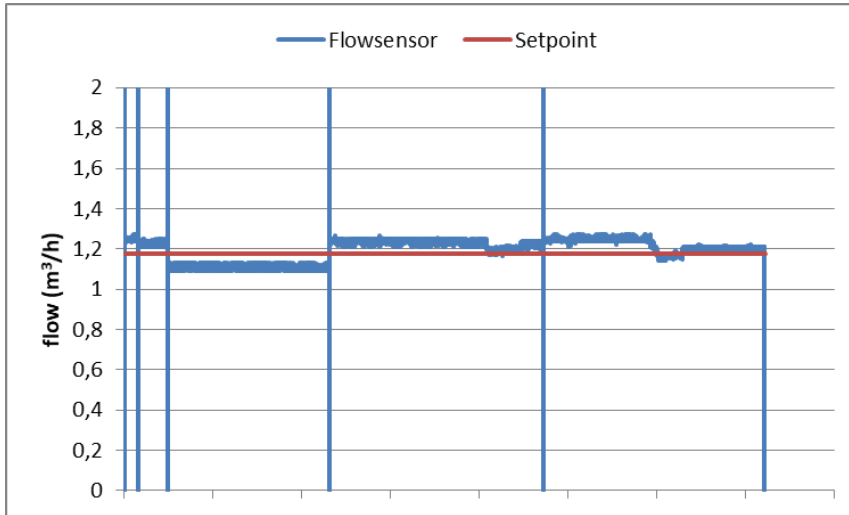
			Experiment 1				Experiment 2	
			water	biofilm			water	biofilm
week 1	dag 0	10-1-2018	x	x	dag 0	23-5-2018	x	x
	dag 2	12-1-2018	x		dag 2	25-5-2018	x	
week 2	dag 6	16-1-2018	x	x	dag 6	29-5-2018	x	x
week 3	dag 13	23-1-2018	x		dag 13	5-6-2018	x	
week 4	dag 20	30-1-2018	x		dag 20	12-6-2018	x	
week 5	dag 27	6-2-2018	x	x	dag 27	19-6-2018	x	x
week 6	dag 34	13-2-2018	x		dag 34	26-6-2018	x	
week 7	dag 41	20-2-2018	x		dag 41	3-7-2018	x	
week 8	dag 48	27-2-2018	x		dag 48	10-7-2018	x	
week 9	dag 55	6-3-2018	x	x	dag 55	17-7-2018	x	x
week 10	dag 63	14-3-2018	x		dag 62	24-7-2018	x	
week 11	dag 69	20-3-2018	x		dag 69	31-7-2018	x	
week 12	dag 76	27-3-2018	x		dag 76	7-8-2018	x	
week 12 na spuien	dag 84	4-4-2018	x	x	dag 83	14-8-2018	x	x
	dag 84	4-4-2018	x	x	dag 83	14-8-2018	x	x

De temperatuur van loop 1 schommelde gedurende experiment 1 tussen de 10,4 en 12,6°C, zie Figuur 3. De temperatuur van loop 2 schommelde gedurende experiment 1 tussen de 9,7 en 13,4°C, zie Figuur 3. De gemiddelde temperatuur van loop 1 was 11,8°C, de gemiddelde van loop 2 was 11,2°C.

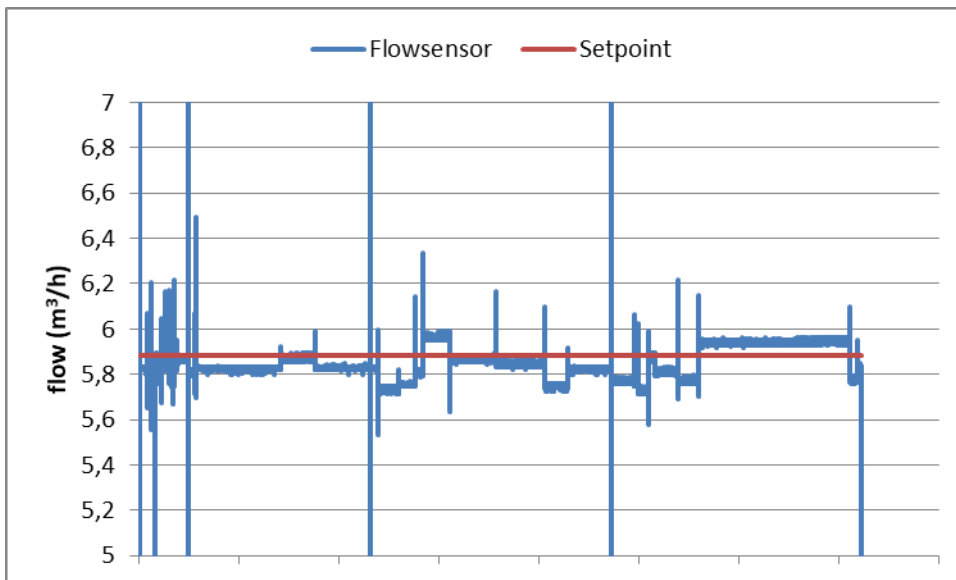


FIGUUR 3 TEMPERAATUUR TIJDENS EXPERIMENT 1 LOOP 1 EN 2 (10 JANUARI T/M 4 APRIL 2018).

De stroomsnelheid van loop 1 tijdens experiment 1 staat in Figuur 4 en voor loop 2 staat in Figuur 5. De setpoint (rode lijn) geeft aan wat de ingestelde snelheid is en de flowsensor (blauwe lijn) geeft de daadwerkelijke snelheid weer. De verticale lijnen geven weer wanneer het programma is gestopt en coupons zijn uitgenomen. De reden dat de gemeten flow soms boven of onder de setpoint ligt, komt door de instellingen van de klep.

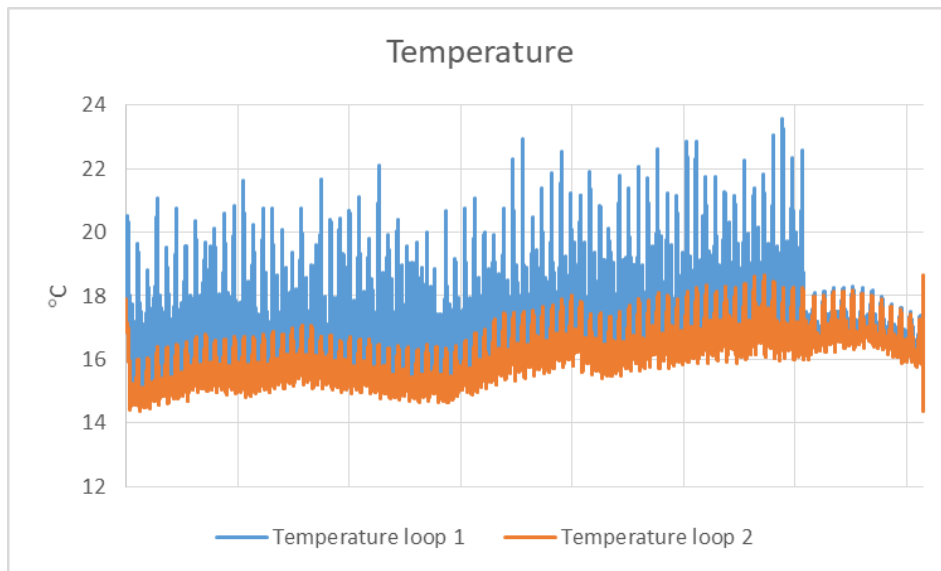


FIGUUR 4 FLOWSNELHEID TIJDENS EXPERIMENT 1 LOOP 1 (10 JANUARI - 4 APRIL 2018) 0,04 M/S (1,16 M³/H).



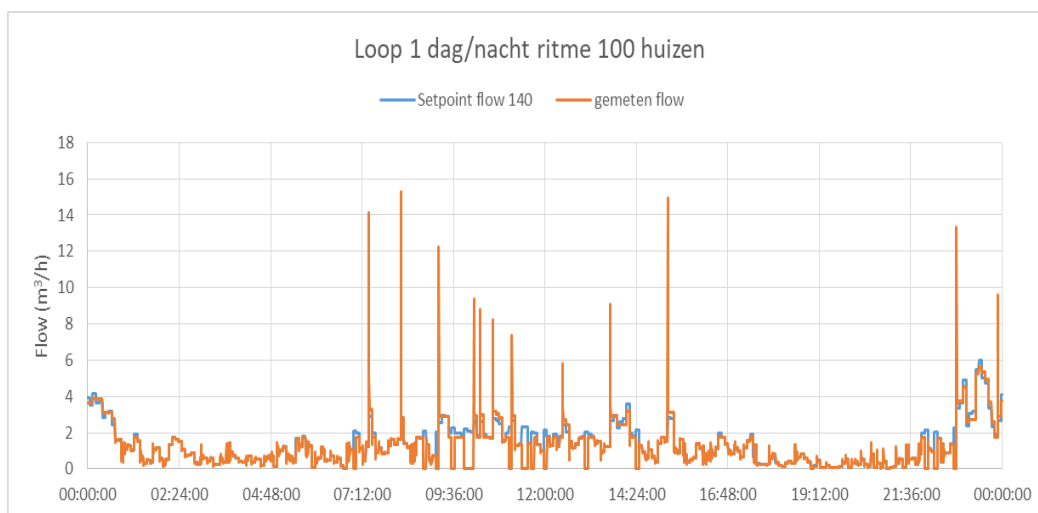
FIGUUR 5 FLOWSNELHIED IN LOOP 2 TIJDENS EXPERIMENT 1 LOOP 2 (10 JANUARI - 4 APRIL 2018) 0,2 M/S (5,9 M³/H).

De temperatuur van loop 1 schommelde gedurende experiment 2 tussen de 14,7 en 23,6°C, zie Figuur 6. De temperatuur van loop 2 schommelde gedurende experiment 1 tussen de 14,3 en 18,6°C (Figuur 6). De gemiddelde temperatuur van loop 1 was 17,0°C, de gemiddelde van loop 2 was 16,2°C. Vanaf halverwege mei werd de temperatuur in loop 1 stabiel en werden er minder hoge uitschieters aangetroffen.



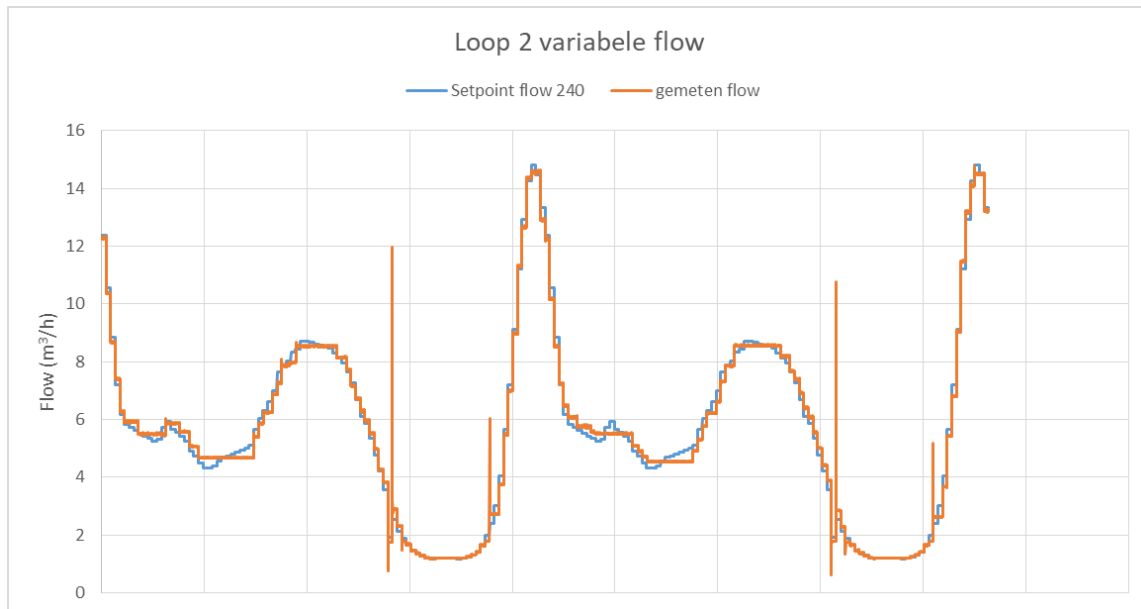
FIGUUR 6 TEMPERAATUUR TIJDENS EXPERIMENT 2 VAN LOOP 1 EN 2 (23 MEI - 14 AUGUSTUS 2018).

In loop 1 werd een dag/nacht ritme gerund en dat patroon was iedere dag anders, in Figuur 7 is een flow patroon van één dag weergegeven. Te zien is dat de gemeten flow en de ingestelde flow goed overeenkomen, met een enkele piek als er wordt gewisseld van kleine naar hoge flow en andersom.



FIGUUR 7 DAG/NACHT RITME IN LOOP 1 GEDURENDE 24 UUR TIJDENS EXPERIMENT 2 (23 MEI - 14 AUGUSTUS 2018).

In loop 2 werd een variabele flow patroon gerund en dat patroon was iedere dag hetzelfde, zie Figuur 8. Te zien is dat de gemeten flow en de ingestelde flow goed overeenkomen, met een enkele piek als er wordt gewisseld van kleine naar hoge flow en andersom.

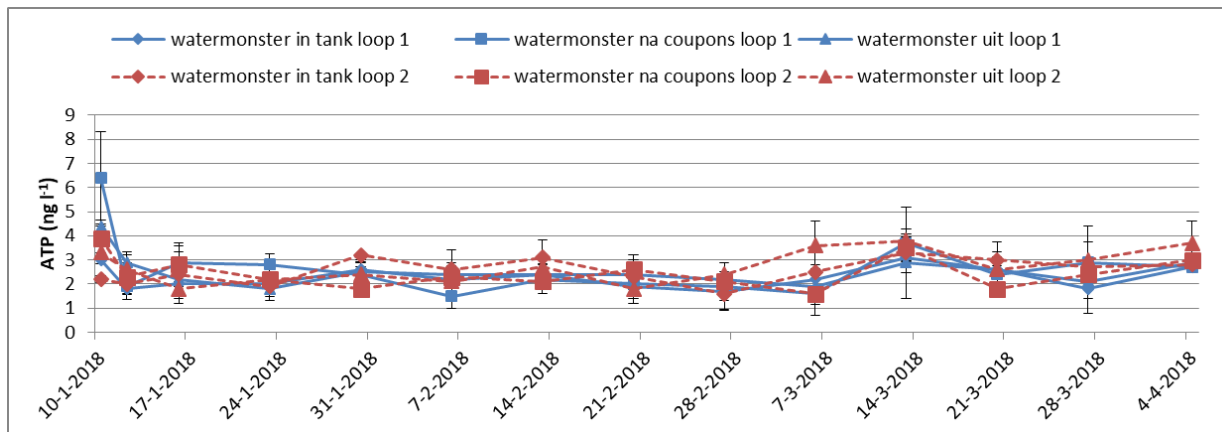


FIGUUR 8 VARIABELE FLOW IN LOOP 2 GEDURENDE 24 UUR TIJDENS EXPERIMENT 2 (23 MEI - 14 AUGUSTUS 2018).

3.3 ATP

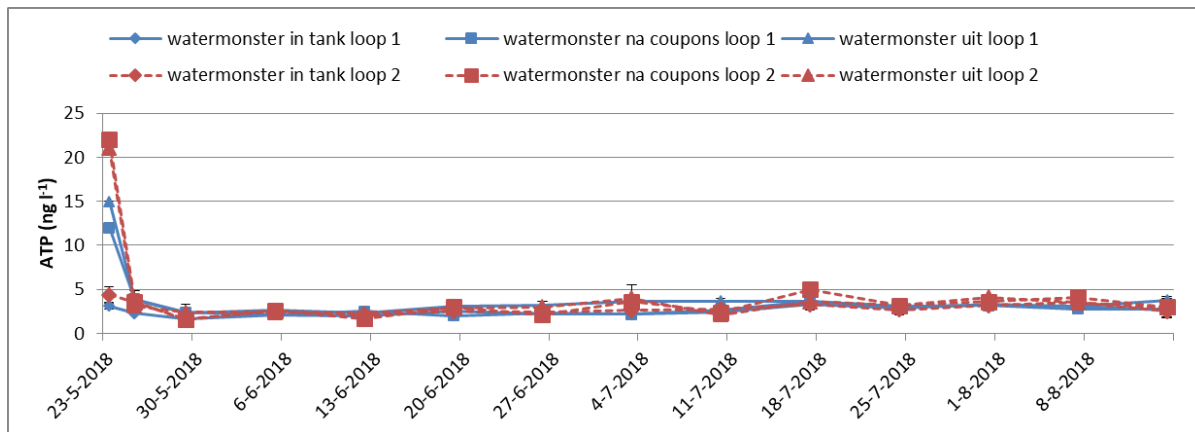
3.3.1 Water

De ATP resultaten van het water van loop 1 en 2 van experiment 1 staan in Figuur 9. De ATP concentraties van dag 0 waren wat hoger dan vanaf dag 3. Op 14-3-18 (week 9) wordt er een verhoging in de ATP concentratie gevonden, deze verhoging correleerde met een lichte stijging in de temperatuur. De gemiddelde ATP concentratie in beide loops is 2,5 ng/l (Tabel 6).



FIGUUR 9 ATP CONCENTRATIE VAN LOOP 1 (0,04 M/S) EN LOOP 2 (0,2 M/S) VAN EXPERIMENT 1 (10-01-2018 T/M 04-04-2018).

De ATP resultaten van het water van loop 1 en 2 van experiment 2 staan in Figuur 10. De ATP concentraties van dag 0 waren hoger dan vanaf dag 3. De ATP concentraties zijn in beide loops stabiel in de tijd. De gemiddelde ATP concentratie in beide loops is 3,6 ng/l (Tabel 6).



FIGUUR 10 ATP CONCENTRATIE VAN LOOP 1 (DAG/NACHT RITME EN LOOP 2 (VARIABELE FLOW) VAN EXPERIMENT 2 (23-05-2018 T/M 14-08-2018).

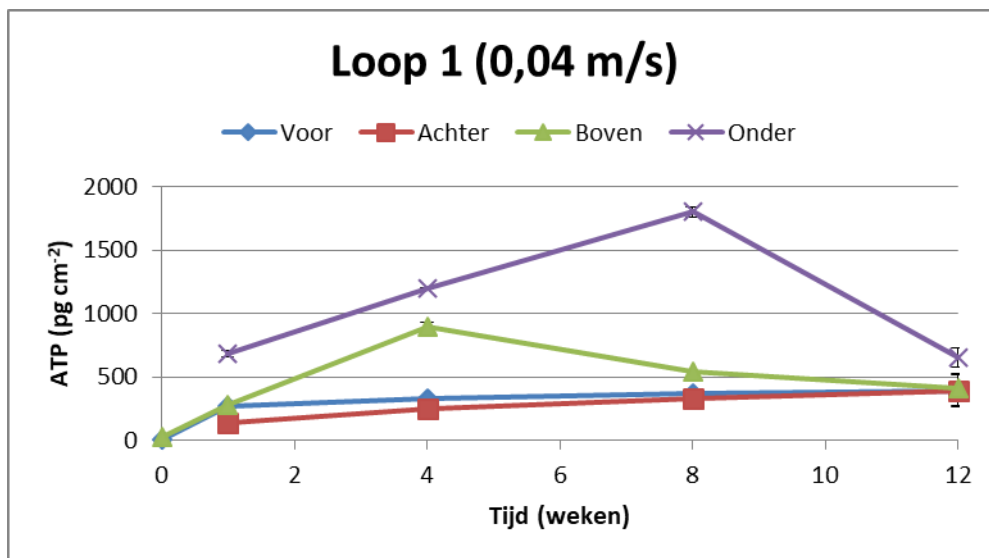
De ATP concentraties in het inkomende en uitgaande water van beide snelheden gedurende experiment 1 zijn vergelijkbaar, rond de 2,5 ng/l (Tabel 6). Terwijl gedurende experiment 2 in beide loops de ATP concentratie hoger zijn dan in het inkomende water. Daarnaast zijn de ATP concentraties ook hoger dan tijdens experiment 1, gemiddelde rond 3,6 ng/l (Tabel 6).

TABEL 6 GEMIDDELDE ATP-CONCENTRATIES VAN DE WATERMONSTERS (NG/L) GEDURENDE DE EXPERIMENTEN

	Experiment 1				Experiment 2			
	Zonder spuien		Met spuien		Zonder spuien		Met spuien	
	Gem	Stdev	Gem	stdev	gem	stdev	gem	stdev
watermonster in tank loop 1	2,29	0,46			2,55	0,51		
watermonster na coupons loop 1	2,66	1,23	2,79	1,28	3,41	2,54	3,51	2,48
watermonster uit loop 1	2,54	0,64			4,12	3,31		
watermonster in tank loop 2	2,54	0,51			2,84	0,69		
watermonster na coupons loop 2	2,46	0,65	2,63	0,93	4,39	5,15	4,36	4,97
watermonster uit loop 2	2,71	0,67			4,32	4,84		

3.3.2 Biofilm Loop 1 0,04 m/s (1,16 m³/h) experiment 1

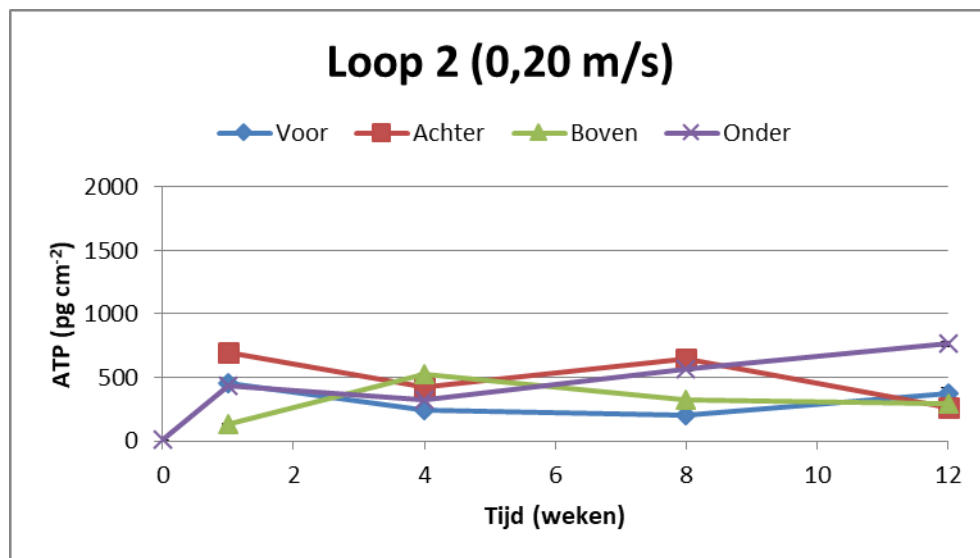
De ATP resultaten van de biofilm van loop 1 staan in Figuur 11. De ATP concentratie van de coupons op de locaties voor en achter zijn vergelijkbaar met elkaar en stijgen licht in de tijd, er is een lichte toename van 270 pg/cm² na 1 week naar 395 pg/cm² na 12 weken op de coupon Voor. De coupon Achter heeft een ATP concentratie van 140 pg/cm² na 1 week en 395 pg/cm² na 12 weken. De ATP concentratie op de coupon op de Boven locatie begint bij 280 pg/cm² na 1 week, heeft na 4 weken een piekconcentratie van 900 pg/cm² om vervolgens weer te dalen naar 410 pg/cm² na 12 weken. De ATP concentratie van de coupon op de Onder locatie heeft na 1 week een hogere ATP concentratie dan de andere locaties (680 pg/cm²). Vervolgens stijgt de ATP concentratie na 8 weken tot 1800 pg/cm², om daarna weer te dalen naar 655 pg/cm².



FIGUUR 11 ATP CONCENTRATIES IN DE BIOFILM VAN COUPONS VAN LOOP 1 (0,04 M/S), EXPERIMENT 1.

3.3.3 Biofilm Loop 2 0,2 m/s (5,9 m³/h) experiment 1

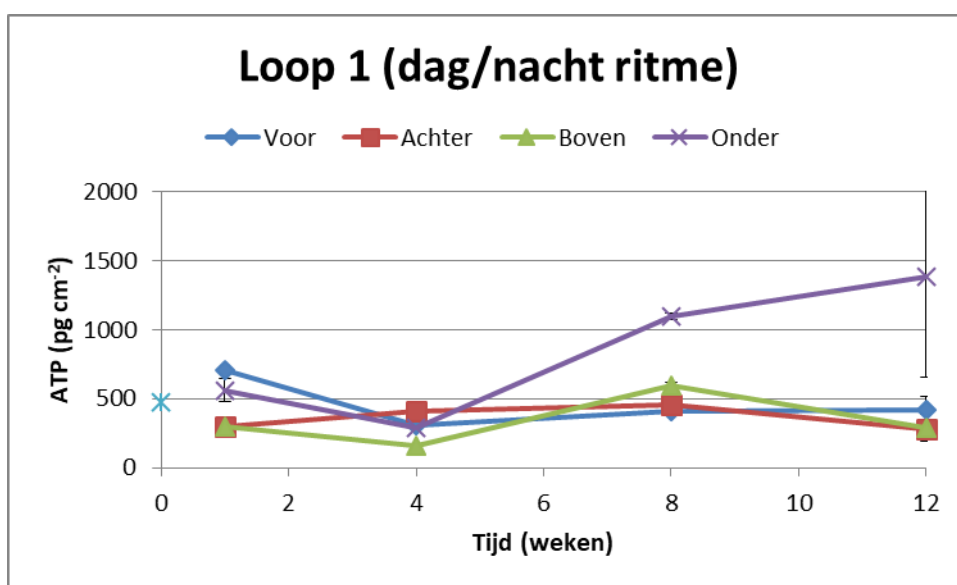
De ATP resultaten van de biofilm van loop 2 staan in Figuur 12. De ATP concentratie van de coupons op de locatie Voor is 460 pg/cm² na 1 week, daalt in de volgende weken naar 240 pg/cm² (week 4) en 200 pg/cm² (week 8) om vervolgens weer te stijgen naar 375 pg/cm² na 12 weken. De coupon Achter heeft een ATP concentratie van 700 pg/cm² na 1 week en fluctueert vervolgens en heeft na 12 weken een concentratie van 265 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de Boven locatie begint bij 130 pg/cm² na 1 week, en fluctueert ook in de tijd en heeft na 12 weken een ATP concentratie van 295 pg/cm². De ATP concentratie van de coupon op de Onder locatie heeft na 1 week een ATP concentratie van 440 pg/cm². Vervolgens stijgt de ATP concentratie en na 12 weken is de ATP concentratie 765 pg/cm².



FIGUUR 12 ATP CONCENTRATIE IN DE BIOFILM VAN COUPONS VAN LOOP 2 (0,2 M/S), EXPERIMENT 1.

3.3.4 Biofilm Loop 1 dag/nacht ritme van 100 huizen experiment 2

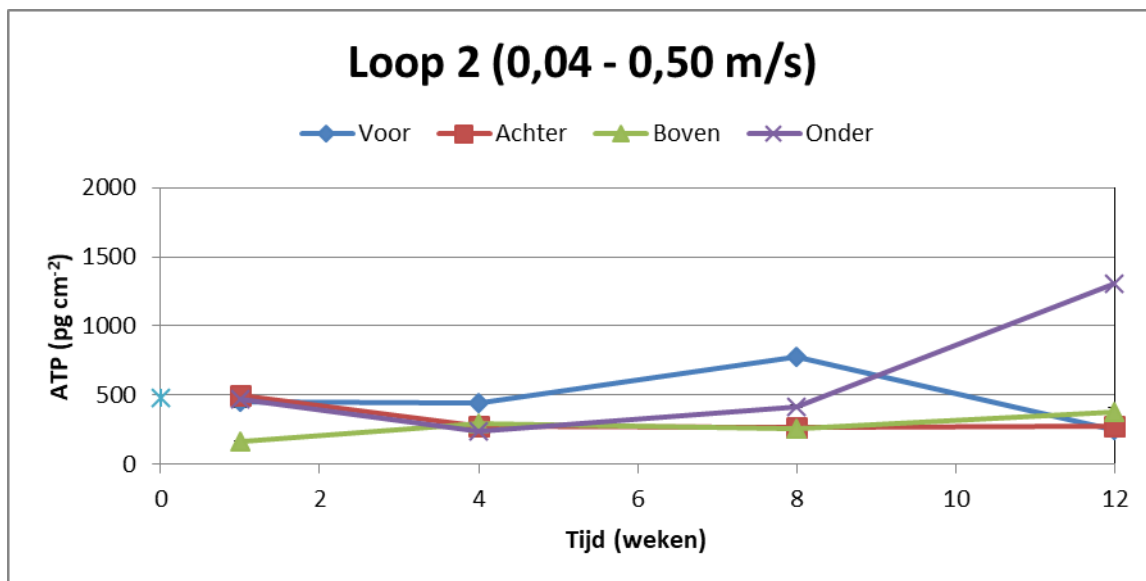
De ATP resultaten van de biofilm van loop 1 staan in Figuur 13. De coupon Onder heeft een ATP concentratie van 560 pg/cm² na 1 week, na 4 weken is de concentratie 290 pg/cm² om vervolgens te stijgen naar 1385 pg/cm² na 12 weken. De ATP concentratie van de coupon op de Voor locatie heeft na 1 week een hogere ATP concentratie dan de andere locaties (710 pg/cm²). Vervolgens daalt de ATP concentratie na 1 week tot 310 pg/cm², om vervolgens te stijgen naar 410 pg/cm² na 8 weken en na 12 weken is de concentratie 420 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de Achter locatie begint bij 300 pg/cm² na 1 week, heeft na 8 weken een piekconcentratie van 460 pg/cm² om vervolgens weer te dalen naar 285 pg/cm² na 12 weken. De ATP concentratie op de coupon op de Boven locatie begint bij 300 pg/cm² na 1 week, heeft na 8 weken een piekconcentratie van 600 pg/cm² om vervolgens weer te dalen naar 290 pg/cm² na 12 weken.



FIGUUR 13 ATP CONCENTRATIE IN DE BIOFILM VAN COUPONS VAN LOOP 1, EXPERIMENT 2 (DAG/NACHT RITME).

3.3.5 Biofilm Loop 2 0,04 - 0,5 m/s (1,17 - 14,7 m³/h) experiment 2

De ATP resultaten van de biofilm van loop 2 staan in Figuur 14. De coupon Onder heeft een ATP concentratie van 470 pg/cm² na 1 week en 1305 pg/cm² na 12 weken. De ATP concentratie van de coupon op de Voor locatie is na 1 week 450 pg/cm². Na 8 weken is de concentratie 780 pg/cm², om vervolgens te dalen naar 250 pg/cm² na 12 weken. De ATP concentratie op de coupon op de Achter locatie begint bij 500 pg/cm² na 1 week, en daalt vervolgens naar 280 pg/cm² in de weken erna. De ATP concentratie op de coupon op de Boven locatie begint bij 170 pg/cm² na 1 week, stijgt naar 300 pg/cm² na 4 weken en is na 8 weken 260 pg/cm² en na 12 weken 375 pg/cm².



FIGUUR 14 ATP CONCENTRATIE IN DE BIOFILM VAN COUPONS VAN LOOP 2, EXPERIMENT 2 (VARIABLE FLOW 0,04 - 0,50 M/S).

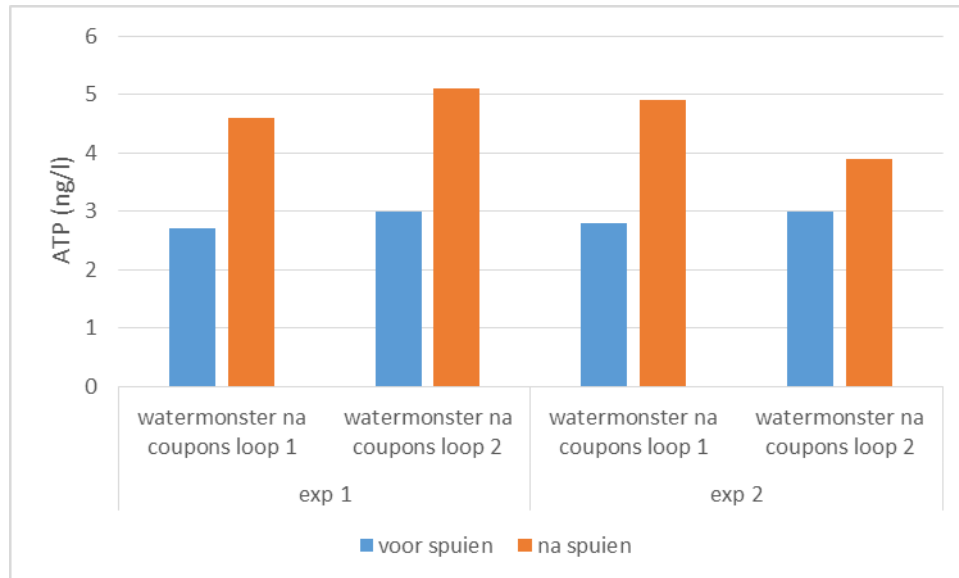
In Tabel 7 zijn de gemiddelde ATP-concentraties van de biofilmmonsters van allebei de experimenten te vinden. Te zien is dat de ATP-concentraties van de coupons op de verschillende locaties tijdens de verschillende experimenten rond dezelfde ordegrrootte liggen. De ATP-concentratie op de coupon op de Onder locatie is echter vaak hoger in vergelijking met de andere coupons, dit is vooral duidelijk te zien bij loop 1 van zowel experiment 1 als 2.

TABEL 7 GEMIDDELDE ATP-CONCENTRATIE (PG/CM²) VAN DE BIOFILMMONSTERS GEDURENDE DE EXPERIMENTEN (EXCLUSIEF RESULTATEN NA HET SPUIEN).

		Experiment 1			Experiment 2		
			gem	stdev		gem	stdev
Loop 1	Voor	Constante snelheid 0,04 m/s	341,25	54,52	Dag nacht ritme 100 huizen	462,50	172,31
	Achter		278,75	109,88		363,75	84,99
	Boven		532,50	267,00		337,50	186,26
	Onder		1083,75	539,56		833,75	498,45
Loop 2	Voor	Constante snelheid 0,2 m/s	318,75	120,30	Variabele flow 0,04 - 0,5 m/s	480,00	220,15
	Achter		508,75	203,16		332,50	111,77
	Boven		318,75	164,13		276,25	85,38
	Onder		523,75	190,50		608,75	474,56

3.3.6 Spuien

De ATP-concentraties in het water na het spuien tijdens de twee experimenten is weergegeven in Figuur 15. Te zien is dat voor zowel loop 1 & 2 en experiment 1 & 2 de ATP concentratie in het water 1,7 x hoger is dan voor het spuien. Alleen voor loop 2 van experiment 2 is de ATP-concentratie na het spuien 1,3 x hoger.



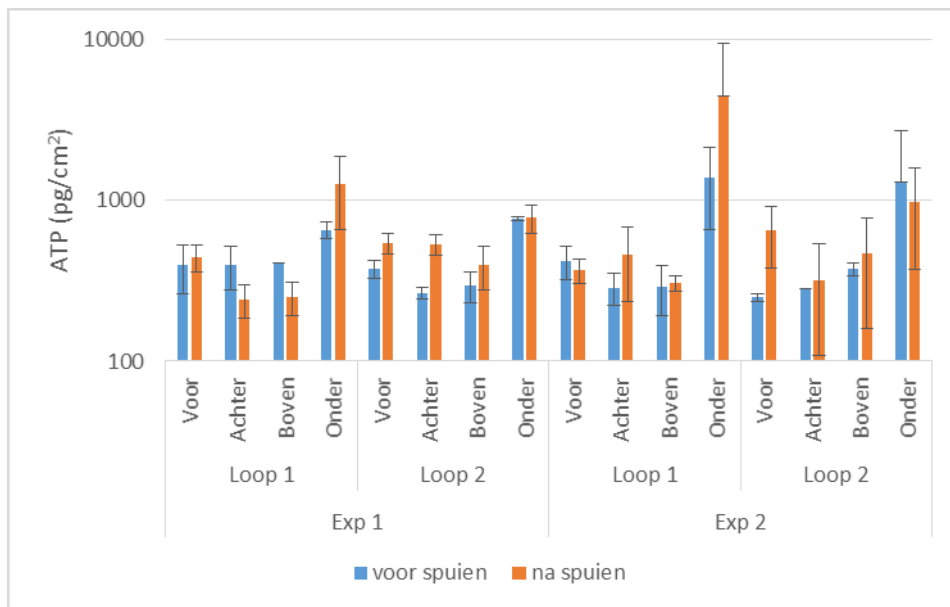
FIGUUR 15 ATP-CONCENTRATIES (NG/L) VAN DE WATERMONSTERS VOOR EN NA SPUIEN (WEEK 12) VOOR BEIDE EXPERIMENTEN.

De ATP-concentraties in de biofilm voor en na het spuien tijdens de twee experimenten is weergegeven in Figuur 16 en Tabel 8. De ATP concentratie in de biofilm van experiment 1 en loop 1 van de coupon Voor is na 12 weken 395 pg/cm², na het spuien wordt er een iets hogere ATP concentratie waargenomen van 440 pg/cm². De coupon Achter heeft een ATP concentratie van 395 pg/cm² na 12 weken en na het spuien is de ATP concentratie gedaald naar 240 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de Boven is na 12 weken 410 pg/cm² na 12 weken, na het spuien is deze gedaald naar 250 pg/cm². De ATP concentratie van de coupon op de Onder locatie is na 12 weken 655 pg/cm², na het spuien wordt er een bijna 2x zo hoge ATP concentratie waargenomen van 1270 pg/cm², echter de standaarddeviatie is ook groot.

De ATP concentratie in de biofilm van experiment 1 en loop 2 van de coupon Voor is na 12 weken 375 pg/cm², na spuien wordt er een hogere ATP concentratie waargenomen van 545 pg/cm². De coupon Achter heeft na 12 weken een concentratie van 265 pg/cm², na het spuien is de ATP concentratie gestegen naar 535 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de Boven heeft na 12 weken een ATP concentratie van 295 pg/cm², na het spuien is de concentratie 395 pg/cm². De ATP concentratie van de coupon op de Onder locatie is na 12 weken 765 pg/cm², na het spuien wordt er een lichte stijging waargenomen naar 780 pg/cm².

De ATP concentratie in de biofilm van experiment 2 loop 1 van de coupon Voor is na 12 weken 420 pg/cm², na het spuien is de ATP concentratie gedaald naar 365 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de Achter locatie is 285 pg/cm² na 12 weken, na het spuien is de concentratie 460 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de Boven locatie is 290 pg/cm² na 12 weken, na het spuien is de concentratie 305 pg/cm². De coupon Onder heeft een ATP concentratie van 1385 pg/cm² na 12 weken, na het spuien is de ATP concentratie gestegen naar 4425 pg/cm².

De ATP concentratie in de biofilm van experiment 2 loop 2 van de coupon Voor is 250 pg/cm² na 12 weken, na het spuien is de ATP concentratie gestegen naar 650 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de achter locatie is 280 pg/cm² na 12 weken, na het spuien is de concentratie 320 pg/cm². De ATP concentratie op de coupon op de Boven locatie is na 12 weken 375 pg/cm², na het spuien is de concentratie 470 pg/cm². De coupon Onder heeft een ATP concentratie van 1305 pg/cm² na 12 weken, na het spuien is de ATP concentratie gedaald naar 975 pg/cm².

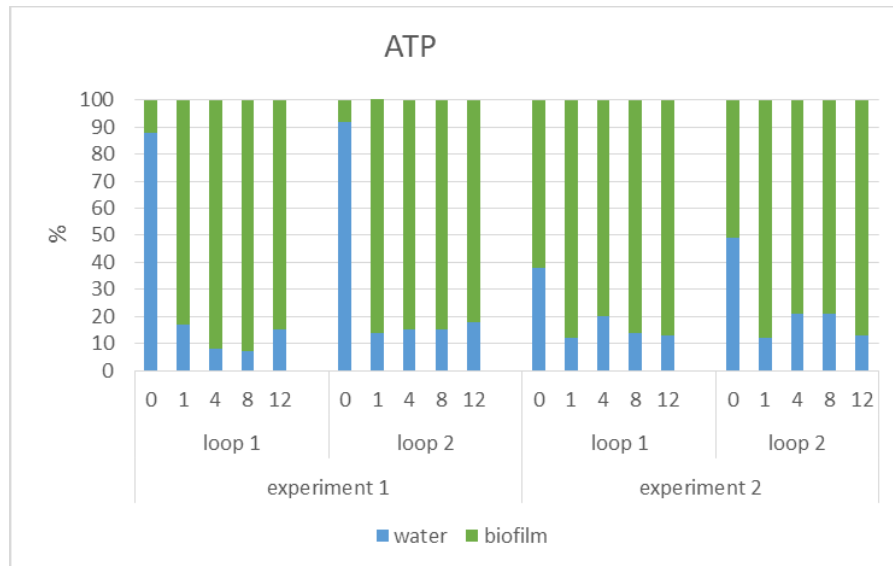


FIGUUR 16 ATP-CONCENTRATIES (PG/CM²) IN DE BIOFILM VOOR EN NA SPUIEN (WEEK 12) VOOR BEIDE EXPERIMENTEN.

TABEL 8 ATP CONCENTRATIES (PG/CM²) IN DE BIOFILM VOOR EN NA SPUIEN VOOR BEIDE EXPERIMENTEN.

		Loop 1				Loop 2			
		Voor	Achter	Boven	Onder	Voor	Achter	Boven	Onder
Exp 1	voor spuien	395	395	410	655	375	265	295	765
	na spuien	440	240	250	1270	545	535	395	780
Exp 2	voor spuien	420	285	290	1385	250	280	375	1305
	na spuien	365	460	305	4425	650	320	470	975

De percentuele verdeling van ATP is bepaald over de twee verschillende matrices water en biofilm (Figuur 17). Om de ATP-concentratie in water te kunnen vergelijken met biofilm zijn de ATP-concentraties voor water omgerekend naar ATP-concentraties per cm² materiaal. Dezelfde omrekening is ook uitgevoerd voor de andere microbiologische parameters die later worden besproken. Tijdens alle experimenten is het aandeel ATP in water tijdens dag 0 het hoogst (38-88%). Vervolgens neemt het aandeel ATP in de tijd af tot 12-21%.

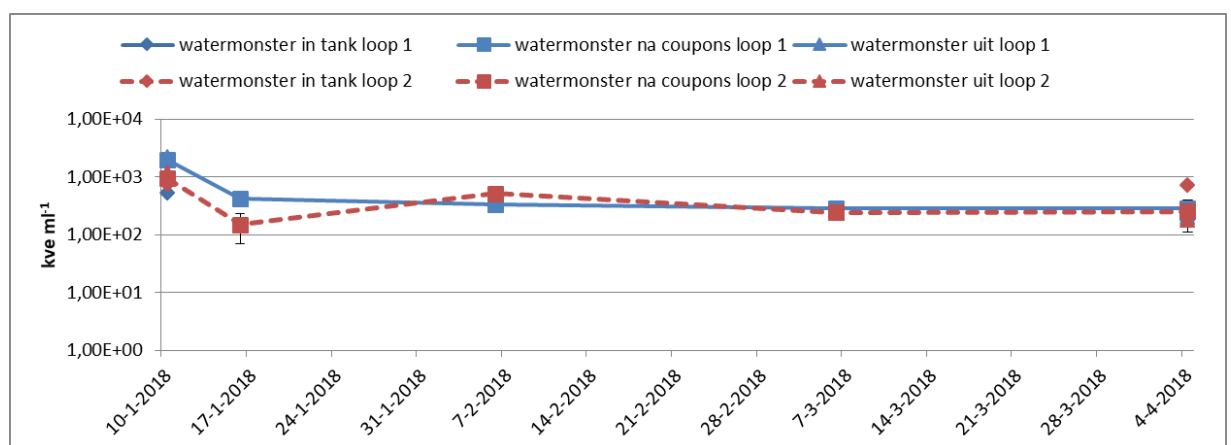


FIGUUR 17 PERCENTAGE VAN BIOMASSA IN WATER EN BIOFILM PER EXPERIMENT EN LOOP IN DE TIJD.

3.4 KG25

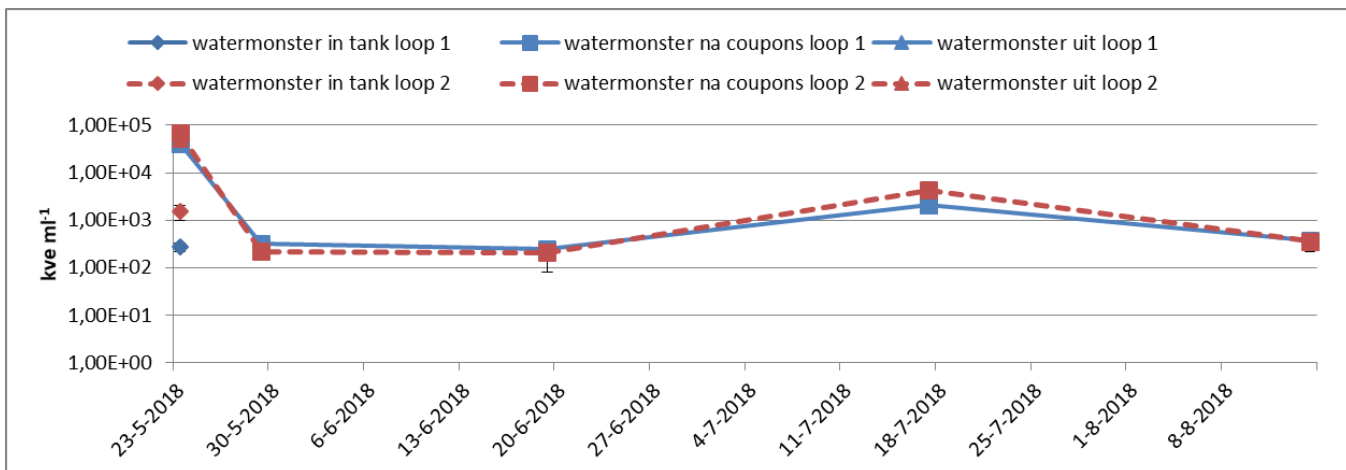
3.4.1 Water

De aantallen heterotrofe bacteriën gegroeid bij 25°C (KG25) gemeten in het water van loop 1 en 2 van experiment 1 worden weergegeven in Figuur 18. De KG25-aantallen gevonden in het water van dag 0 waren hoger dan de aantallen in het water vanaf week 1. De KG25-aantallen in week 1 t/m 12 zijn stabiel in de tijd: in beide loops gemiddeld rond de 350 kve/ml.



FIGUUR 18 KG25 AANTALLEN GEDURENDE EXPERIMENT 1 (10-01-2018 T/M 04-04-2018).

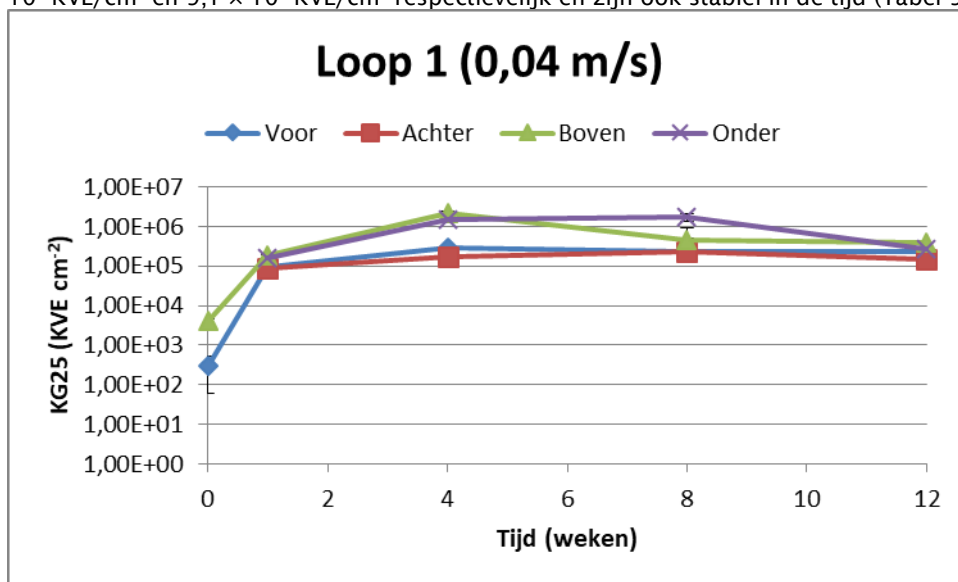
De KG25-aantallen gemeten in het water van loop 1 en 2 van experiment 2 worden weergegeven in Figuur 19. De KG25-aantallen gevonden in het water van dag 0 waren hoger dan de aantallen in het water vanaf week 1. De KG25-aantallen in week 1 t/m 12 zijn stabiel: in de tijd in beide loops gemiddeld rond de 1100 kve/ml.



FIGUUR 19 KG25 AANTALLEN GEDURENDE EXPERIMENT 2 (23-05-2018 T/M 14-08-2018).

3.4.2 Loop 1 0,04 m/s (1,16 m³/h), experiment 1

De KG25-aantallen in de biofilm van de coupons van loop 1 van experiment 1 staan in Figuur 20. De KG25-aantallen in de biofilm van de Voor en Achter coupons zijn stabiel in de tijd, met gemiddelde aantallen van $1,7 \times 10^5$ KVE/cm² en $1,6 \times 10^5$ KVE/cm² respectievelijk (Tabel 9). De KG25-aantallen in de biofilm van de Boven en Onder coupons zijn iets hoger met $6,5 \times 10^5$ KVE/cm² en $9,1 \times 10^5$ KVE/cm² respectievelijk en zijn ook stabiel in de tijd (Tabel 9).

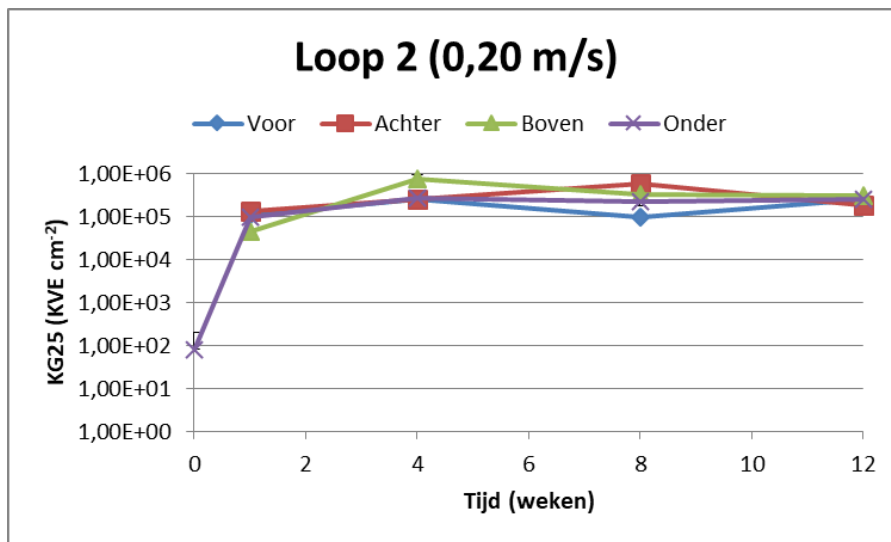


FIGUUR 20 KG25-AANTALLEN LOOP 1 EXPERIMENT 1 (0,04 M/S).

3.4.3 Loop 2 0,2 m/s (5,9 m³/h), experiment 1

DE KG25-AANTALLEN IN DE BIOFILM VAN DE COUPONS VAN LOOP 2 VAN EXPERIMENT 1 STAAN IN

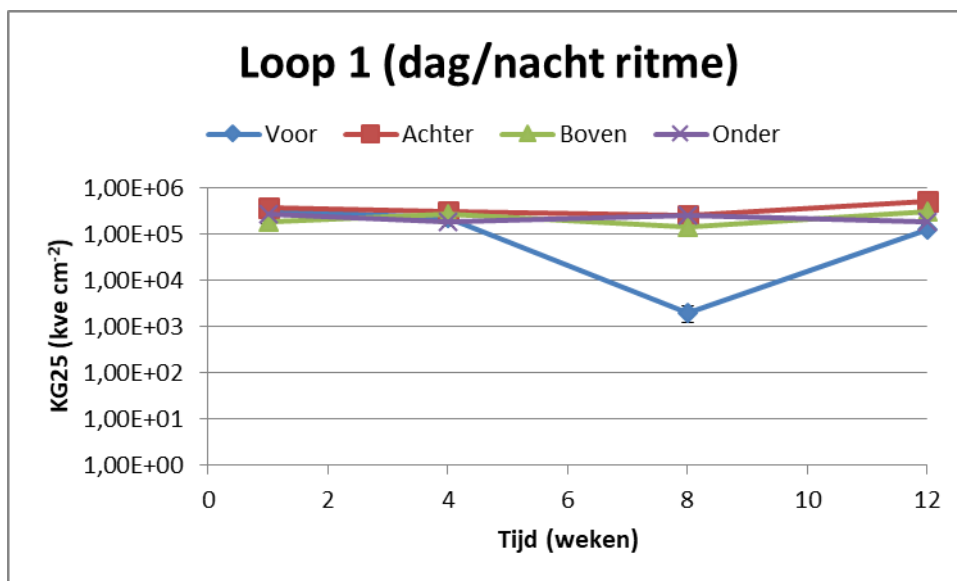
Figuur 21. De KG25-aantallen in de biofilm van de coupons zijn stabiel in de tijd en de KG25-aantallen van verschillende locaties van de coupons zijn vergelijkbaar. De aantallen liggen tussen de $1,7 \times 10^5$ KVE/cm² en $3,6 \times 10^5$ KVE/cm² (Tabel 9).



FIGUUR 21 KG25-AANTALLEN LOOP 2 EXPERIMENT 1 (0,2 M/S).

3.4.4 Loop 1 dag/nacht ritme van 100 huizen, experiment 2

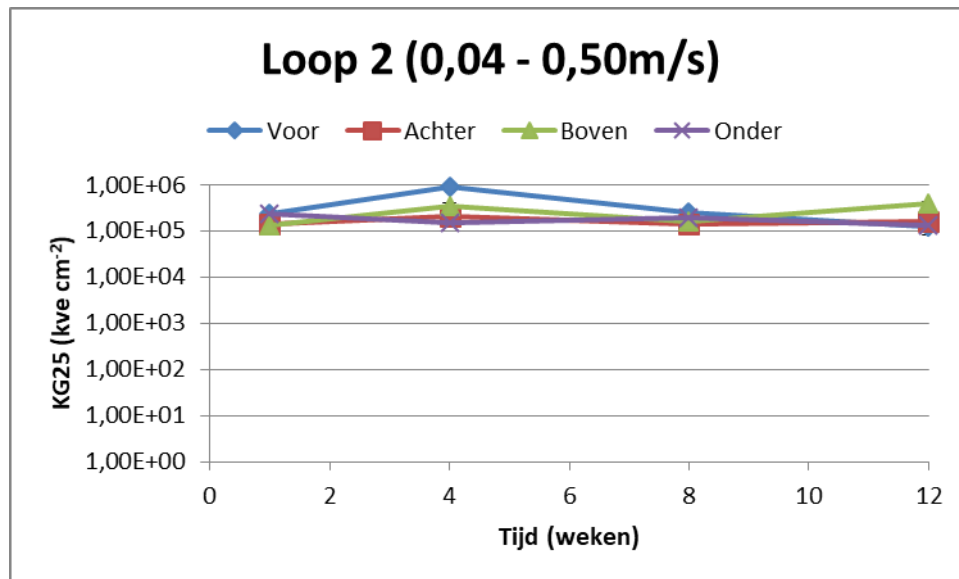
De KG25-aantallen in de biofilm van de coupons van loop 1 van experiment 2 staan in Figuur 22. De KG25-aantallen in de biofilm van de coupons zijn stabiel in de tijd en de KG25-aantallen van verschillende locaties van de coupons zijn vergelijkbaar. Alleen de KG25-aantallen in de biofilm van coupon Voor van week 8 wijkt af en is 2 log lager dan de andere concentraties. De aantallen liggen tussen de $1,7 \times 10^5$ KVE/cm² en $3,7 \times 10^5$ KVE/cm² (Tabel 9).



FIGUUR 22 KG-25 AANTALLEN IN DE BIOFILM VAN LOOP 1 EXPERIMENT 2 (DAG/NACHT RITME).

3.4.5 Loop 2 0,04 - 0,5 m/s (1,17 - 14,7 m³/h), experiment 2

De KG25-aantallen in de biofilm van de coupons van loop 2 van experiment 2 staan in Figuur 23. De KG25-aantallen in de biofilm van de coupons zijn stabiel in de tijd en de KG25-aantallen van verschillende locaties van de coupons zijn vergelijkbaar. De aantallen liggen tussen de $1,6 \times 10^5$ KVE/cm² en $3,7 \times 10^5$ KVE/cm².



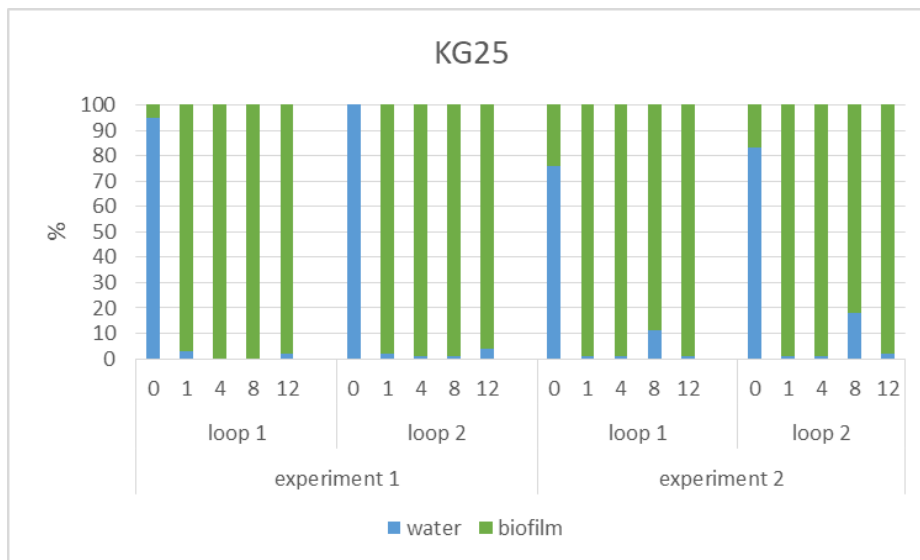
FIGUUR 23 KG25-AANTALLEN IN DE BIOFILM VAN LOOP 2 EXPERIMENT 2 (VARIABELE FLOW).

In Tabel 9 zijn de gemiddelde KG25-aantallen van de biofilmmonsters van allebei de experimenten te vinden. Te zien is dat de KG25-aantallen van de coupons op de verschillende locaties tijdens de verschillende experimenten rond dezelfde orde grootte liggen.

TABEL 9 GEMIDDELDE KG25-AANTALLEN (KVE/CM²) VAN WEEK 1 T/M 12 (EXCLUSIEF SPUIEN) VAN BEIDE EXPERIMENTEN.

		Experiment 1		Experiment 2			
			gem	stdev	gem	stdev	
Loop 1	Voor	Constante snelheid 0,04 m/s	1,69E+05	1,17E+05	Dag nacht	1,71E+05	1,39E+05
	Achter		1,62E+05	6,34E+04	ritme 100	3,68E+05	1,11E+05
	Boven		6,49E+05	8,86E+05	huizen	2,28E+05	8,22E+04
	Onder		9,05E+05	8,08E+05		2,23E+05	4,43E+04
Loop 2	Voor	Constante snelheid 0,2 m/s	1,80E+05	8,68E+04	Variabele	3,73E+05	3,43E+05
	Achter		2,90E+05	2,00E+05	flow 0,04 -	1,60E+05	2,83E+04
	Boven		3,64E+05	3,01E+05	0,5 m/s	2,60E+05	1,35E+05
	Onder		1,67E+05	1,15E+05		1,78E+05	4,86E+04

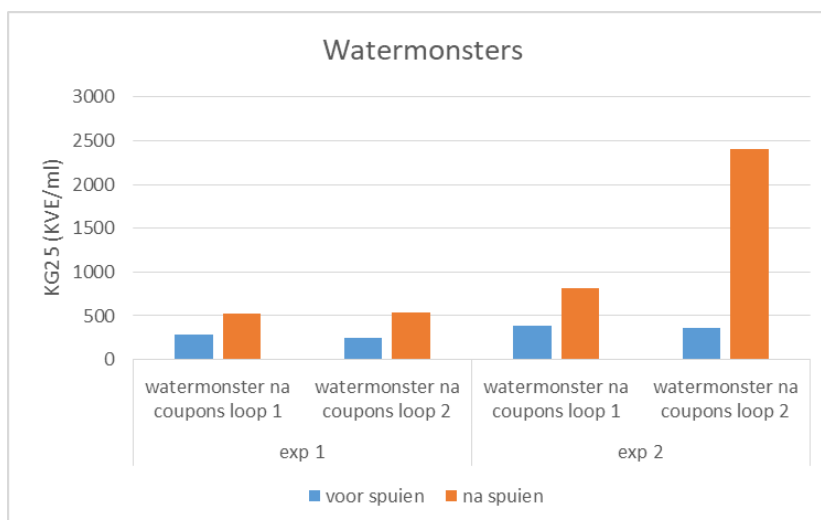
De percentuele verdeling van de KG25-aantallen is bepaald over de twee verschillende matrices water en biofilm (Figuur 24). Tijdens alle experimenten is het aandeel ATP in water tijdens dag 0 het hoogst (76-100%). Vervolgens neemt het aandeel ATP af tot 1-4% in de tijd. In week 8 van experiment 2 is het aandeel KG25-aantallen in water hoger 11-18%, om vervolgens in week 12 weer te dalen tot 1-2%.



FIGUUR 24 PERCENTUELE VERDELING KG25 AANTALLEN IN WATER OF BIOFILM PER EXPERIMENT EN LOOP IN DE TIJD.

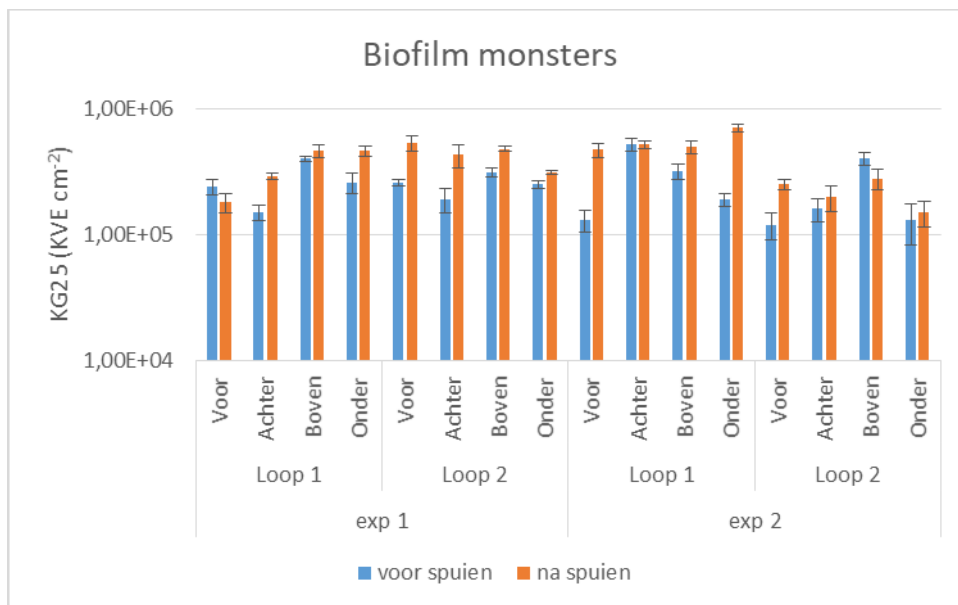
3.4.6 Spuien

De KG25-aantallen in het water na het spuien tijdens de twee experimenten is weergegeven in Figuur 25. Te zien is dat voor zowel loop 1 & 2 en experiment 1 & 2 de KG25 concentratie in het water 2 x hoger is dan voor het spuien. Alleen voor loop 2 van experiment 2 zijn de KG25-aantallen na het spuien 6,7 x hoger.



FIGUUR 25 KG-25 AANTALLEN (KVE/ML) IN DE WATERMONSTERS VOOR EN NA SPIJEN VOOR BEIDE EXPERIMENTEN.

De KG25-aantallen in de biofilm voor en na het spuien tijdens de twee experimenten is weergegeven Figuur 26. De KG25 aantallen in de biofilm na het spuien zijn gemiddeld 1,7 x hoger dan voor het spuien, op 2 uitzonderingen na waar de KG25-aantallen na het spuien lager zijn. (experiment 1, loop 1 Voor en experiment 2, loop 2 Boven).



FIGUUR 26 KG-25 AANTALLEN (KVE/CM²) IN DE BIOFILM VOOR EN NA SPUIEN VOOR BEIDE EXPERIMENTEN.

3.5 Koolhydraten

Gedurende de hele looptijd van experiment 1 was de koolhydraat concentratie van de watermonsters beneden het detectielimiet van 0,8 mg C/l. Hetzelfde geldt voor de koolhydraat concentratie in de biofilmmonsters, die waren beneden het detectielimiet van 0,002 mg C/cm². Naar aanleiding van deze resultaten zijn voor de monsters van experiment 2 geen koolhydraten gemeten.

3.6 qPCR

Tijdens de DNA isolatie van de monsters van week 4 en 8 van experiment 1, is er iets mis gegaan waardoor er geen DNA is geïsoleerd van deze monsters.

De gemiddelde concentraties van de verschillende qPCR's zijn te vinden in Bijlage III.

3.6.1 16S

In alle watermonsters van experiment 1 werden 16S rRNA genkopieën waargenomen (Figuur 27). De aantallen in loop 1 variëren van $1,7 \times 10^7$ tot $2,2 \times 10^8$ genkopieën/l. De aantallen in loop 2 varieerden van $1,9 \times 10^7$ tot $1,8 \times 10^8$ genkopieën/l. In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën waargenomen (Figuur 27). De aantallen in loop 1 varieerden van $3,6 \times 10^4$ tot $6,5 \times 10^6$ genkopieën/cm². De aantallen in loop 2 variëren van $4,3 \times 10^4$ tot $6,2 \times 10^6$ genkopieën/cm².



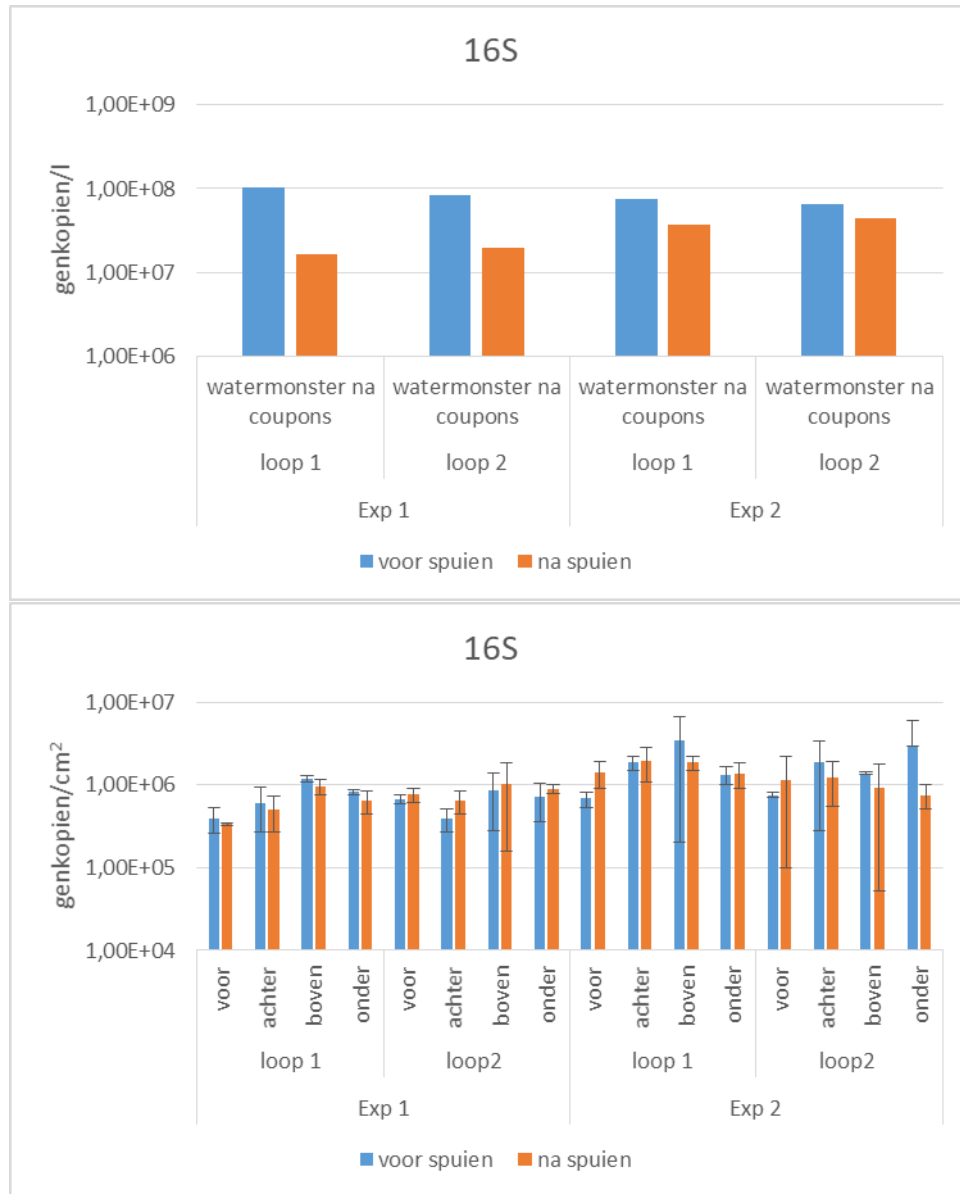
FIGUUR 27 DE 16S GENKOPIEËN IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 11 EN 12) IN WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 1.

In alle watermonsters van experiment 2 werden 16S rRNA genkopieën waargenomen. Figuur 28. De aantal genkopieën van 16S blijven redelijk constant in de tijd. De aantallen in loop 1 variëren van $2,6 \times 10^7$ tot $6,5 \times 10^8$ genkopieën/l. De aantallen in loop 2 variëren van $2,0 \times 10^7$ tot $1,2 \times 10^9$ genkopieën/l. In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën waargenomen (Figuur 28). De aantallen in loop 1 variëren van $6,9 \times 10^5$ tot $1,7 \times 10^7$ genkopieën/cm². De aantallen in loop 2 variëren van $6,8 \times 10^5$ tot $2,8 \times 10^7$ genkopieën/cm².



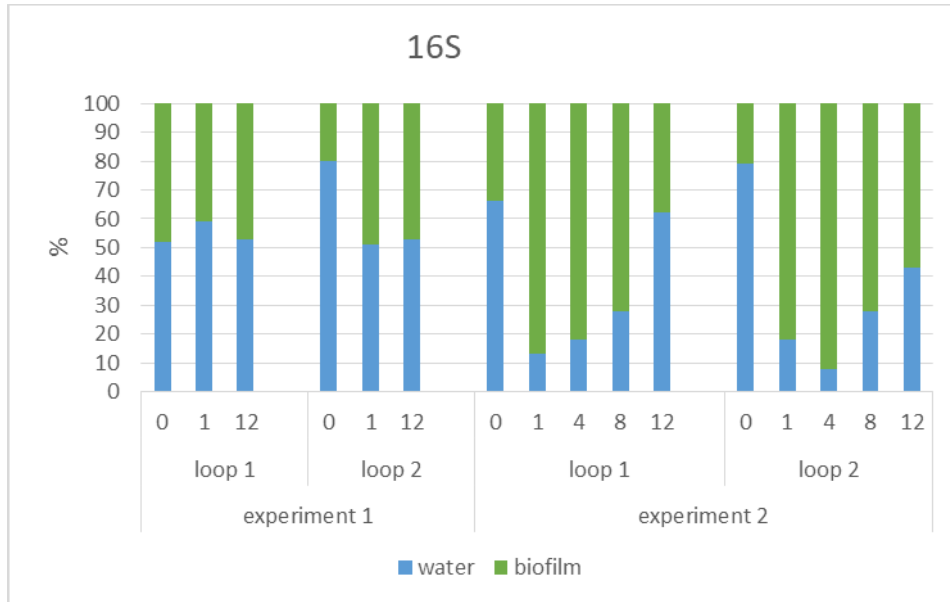
FIGUUR 28 DE 16S RRNA GENKOPIEEN IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 4, 8 EN 12) IN HET WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 2.

In de watermonsters zijn het aantal 16S rRNA genkopieën na het spuien lager dan voor het spuien (Figuur 29). In de biofilmmonsters is in de helft van de gevallen het aantal 16S rRNA genkopieën na het spuien lager dan voor het spuien, er is geen trend te ontdekken (Figuur 29).



FIGUUR 29 DE 16S RRNA GENKOPIEEN IN WATER EN BIOFILM TIJDENS WEEK 12 VOOR EN NA SPUIEN VAN EXPERIMENT 1 EN 2.

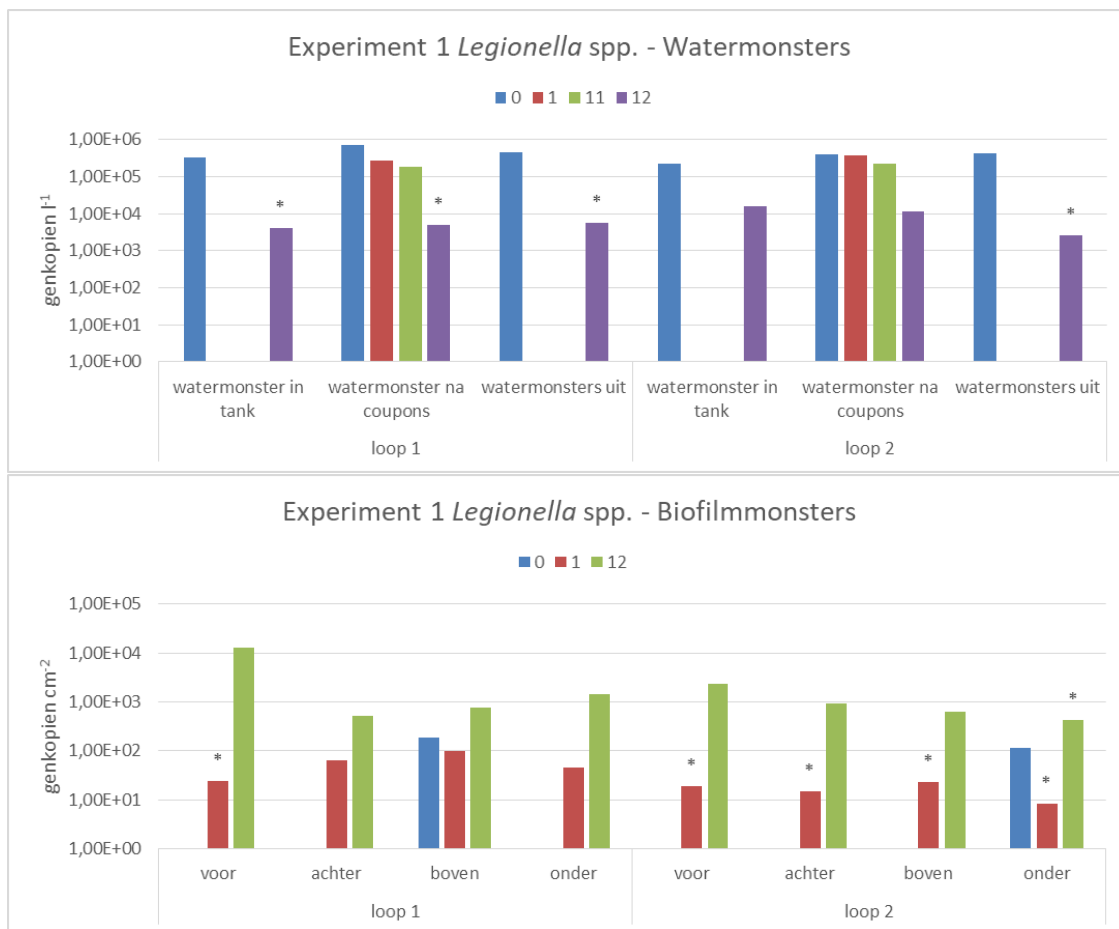
De percentuele verdeling van het aantal 16S rRNA genkopieën (per cm²) over de twee verschillende matrices water en biofilm is weergegeven in Figuur 30. De verdeling 16S genkopieën was tijdens experiment 1 ongeveer gelijk over beide matrices. Tijdens experiment 2 bevinden zich percentueel gezien meer 16S genkopieën in de waterfase in week 0 (66% en 79% voor loop 1 en 2), maar in week 1 is dit gedaald naar rond de 15% en in de tijd neemt het aandeel in water weer toe tot 62% voor loop 1 en 43% voor loop 2.



FIGUUR 30 PERCENTAGE VAN 16S GENKOPIE-AANTALLEN IN WATER OF BIOFILM PER EXPERIMENT EN LOOP, VOOR DE WEKEN 0, 1 EN 12 (EXPERIMENT 1) EN WEKEN 0, 1, 4, 8 EN 12 (EXPERIMENT 2) ACHTEREENVOLGENS.

3.6.2 Legionella spp.

In bijna alle watermonsters van experiment 1 werden 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. waargenomen (Figuur 31). De aantallen hiervan namen af in de tijd, tot onder de detectielimiet in week 12. De aantallen in loop 1 varieerden van $4,0 \times 10^3$ tot $2,8 \times 10^5$ genkopieën/l. De aantallen in loop 2 variëren van $2,5 \times 10^3$ tot $3,8 \times 10^5$ genkopieën/l. In bijna alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. waargenomen (Figuur 31). De aantallen waren in week 1 veelal onder de detectielimiet en namen toe in de tijd. De aantallen in loop 1 variëren van $2,4 \times 10^1$ tot $1,3 \times 10^4$ genkopieën/cm². De aantallen in loop 2 varieerden van $8,3 \times 10^0$ tot $1,2 \times 10^4$ genkopieën/cm².



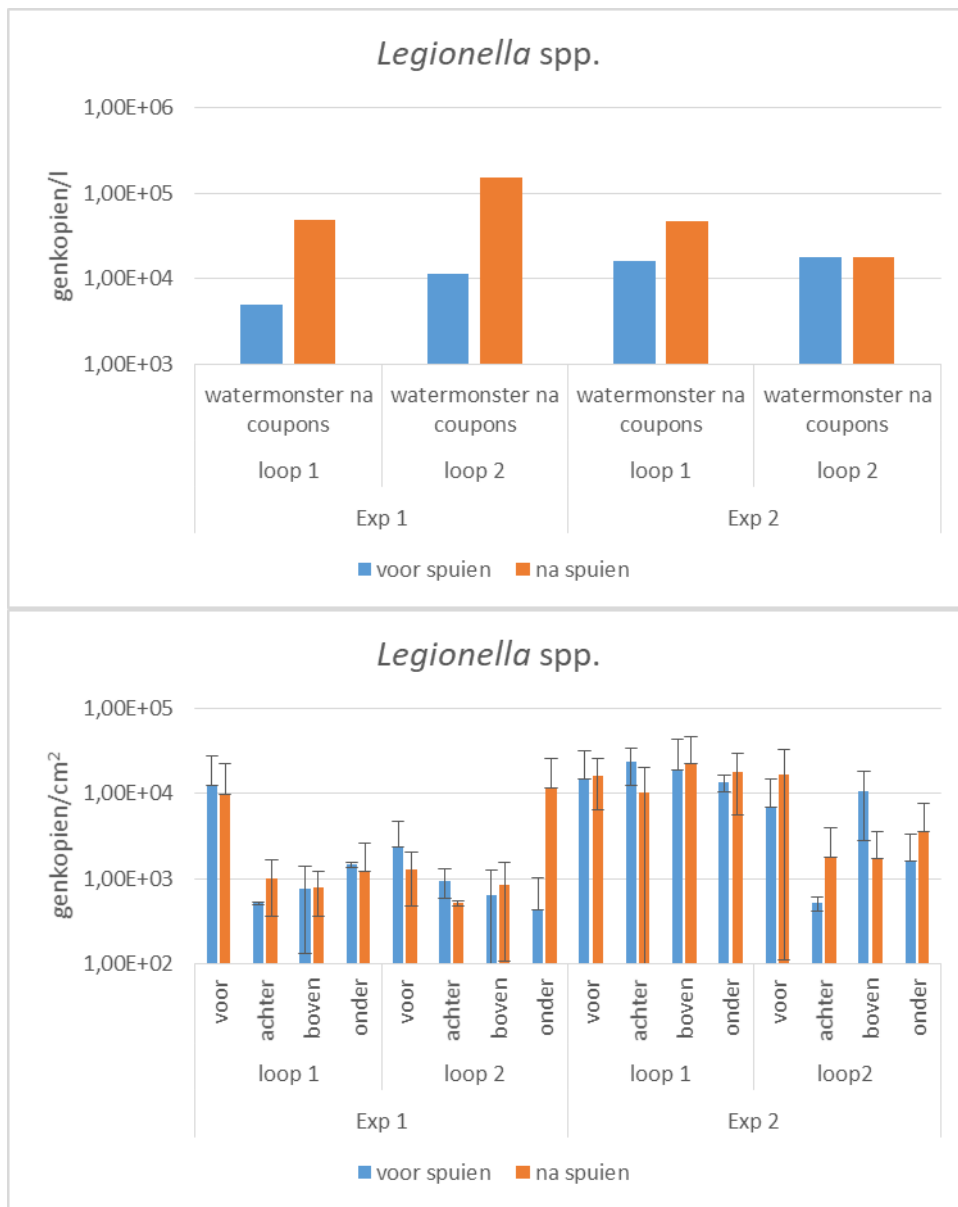
FIGUUR 31 DE 16S RRNA GENKOPIEEN VAN LEGIONELLA SPP. IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 11 EN 12) IN WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 1. *=DETECTIELIMIET

In alle watermonsters van experiment 2 werden 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. waargenomen (Figuur 32). De aantallen op dag 0 waren in alle watermonsters hoger in vergelijking met de andere data. De aantallen namen toe tot week 8 en daalden vervolgens weer. De aantallen in loop 1 varieerden van $5,4 \times 10^1$ tot $1,9 \times 10^5$ genkopieën/l. De aantallen in loop 2 varieerden van $4,7 \times 10^1$ tot $2,4 \times 10^5$ genkopieën/l. In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. waargenomen, met uitzondering voor loop1, week 4 Boven en loop 2, week 4 Onder (Figuur 32). In de tijd nam het aantal genkopieën in loop 1 toe tot week 8, dit was het sterkst voor de coupon Onder, en zakte daarna voor alle locaties tot 10^4 . De aantallen in loop 1 varieerden van $7,4 \times 10^1$ tot $1,9 \times 10^5$ genkopieën/cm². Het aantal genkopieën van *Legionella* spp. in loop 2 vertoonde meer variatie, maar in loop 2 werden de hoogste aantallen in week 8 gevonden om daarna weer te dalen. De aantallen varieerden van $3,4 \times 10^1$ tot $1,4 \times 10^5$ genkopieën/cm².



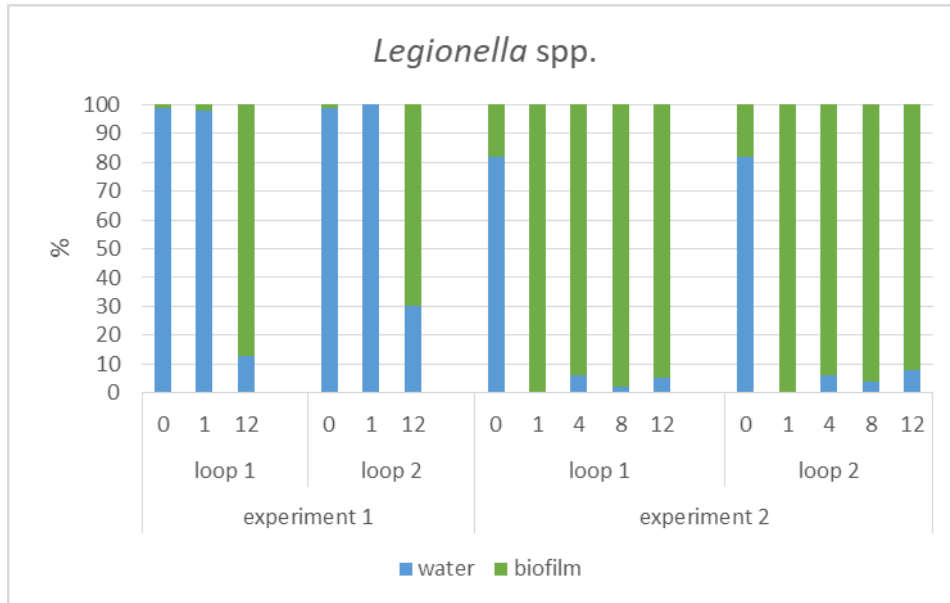
FIGUUR 32 DE 16S RRNA GENKOPIEEN VAN LEGIONELLA SPP. IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 4, 8 EN 12) IN HET WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 2. *=DETECTIELIMIET

In de watermonsters was het aantal 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. na het spuien hoger dan voor het spuien, dit was sterker bij experiment 1 dan bij experiment 2 (Figuur 33). In de biofilmmonsters was in 10 van de 16 gevallen het aantal 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. na het spuien hoger dan voor het spuien, hierin was geen duidelijke trend te ontdekken.



FIGUUR 33 DE 16S RRNA GENKOPIEN VAN LEGIONELLA SPP. IN WATER EN BIOFLM TIJDENS WEEK 12 VOOR EN NA SPUEN VAN EXPERIMENT 1 EN 2.

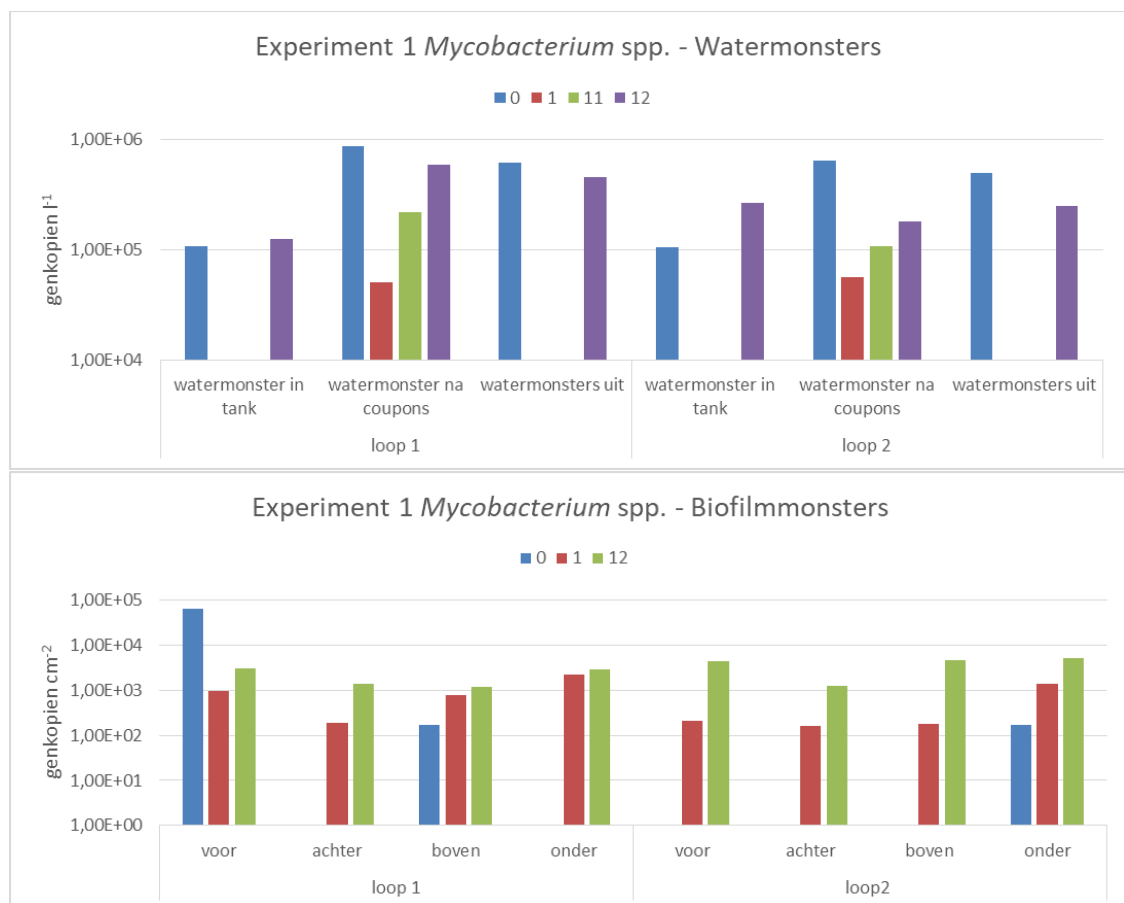
De percentuele verdeling van het aantal *Legionella* spp. 16S rRNA genkopieën (per cm²) over de twee verschillende matrices water en biofilm staat weergegeven in Figuur 34. De meeste *Legionella* spp. bevonden zich tijdens experiment 1 in week 0 en 1 in de waterfase. Na 12 weken bevonden de meeste *Legionella* spp. in de biofilm. Tijdens experiment 2 bevonden de meeste *Legionella* spp. zich in week 0 in het water, maar in week 1 bevonden alle *Legionella* spp. zich in de biofilm. In de loop van de tijd bevond het grootste aandeel *Legionella* spp. zich in de biofilm (>90%).



FIGUUR 34 PERCENTAGE GENKOPIEËN VAN LEGIONELLA SPP. IN WATER OF BIOFILM PER EXPERIMENT EN LOOP, VOOR DE WEKEN 0, 1 EN 12 (EXPERIMENT 1) EN WEKEN 0, 1, 4, 8 EN 12 (EXPERIMENT 2) ACHTEREENVOLGENS.

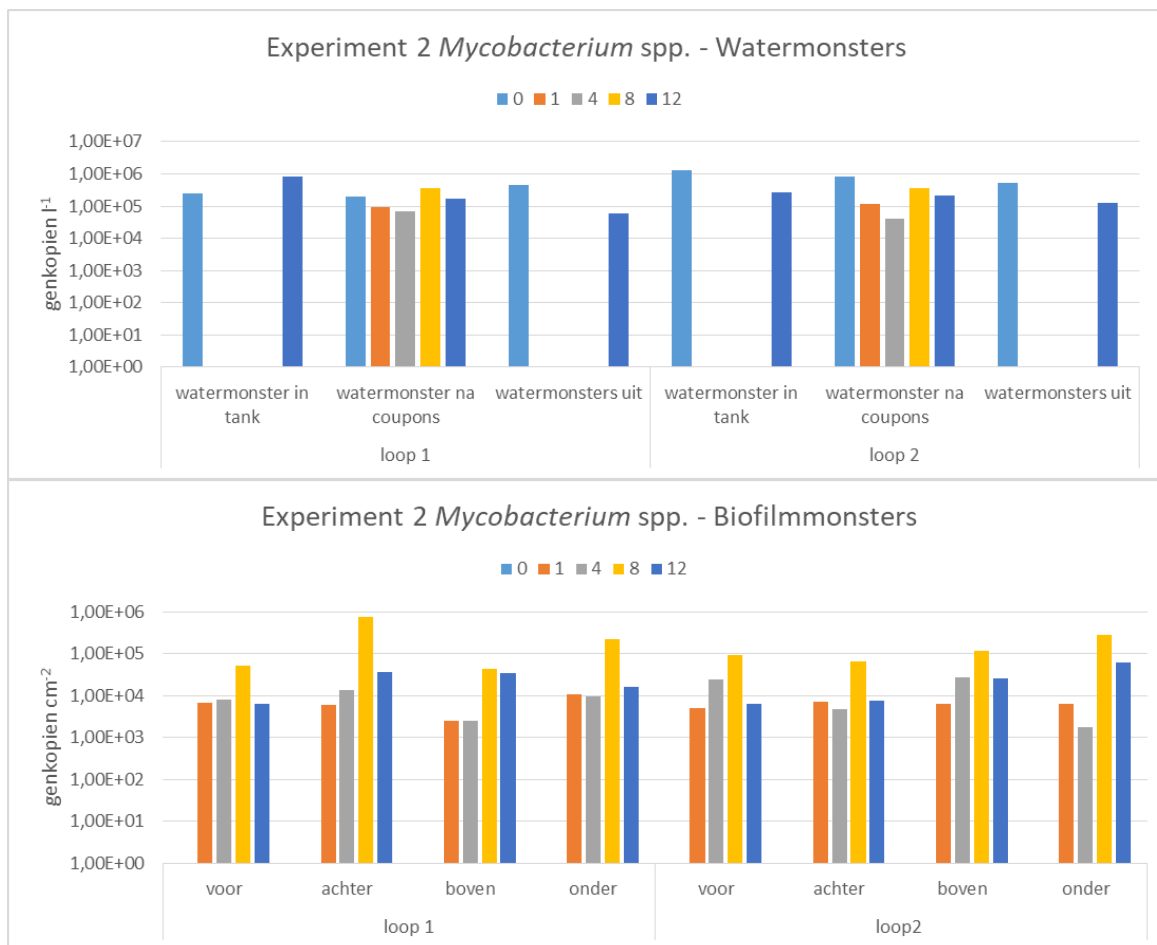
3.6.3 *Mycobacterium* spp.

In alle watermonsters van experiment 1 werden 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. waargenomen (Figuur 35). De aantallen op dag 0 waren hoger dan de overige meetmomenten. De aantallen in loop 1 varieerden van $5,1 \times 10^4$ tot $8,7 \times 10^5$ genkopieën/l. De aantallen in loop 2 varieerden van $5,6 \times 10^4$ tot $6,5 \times 10^5$ genkopieën/l. In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. waargenomen (Figuur 35). De aantallen in week 12 waren vaak hoger dan op andere tijdstipmomenten. De aantallen in loop 1 varieerden van $1,7 \times 10^2$ tot $6,3 \times 10^4$ genkopieën/cm². De aantallen in loop 2 varieerden van $1,6 \times 10^2$ tot $1,1 \times 10^4$ genkopieën/cm².



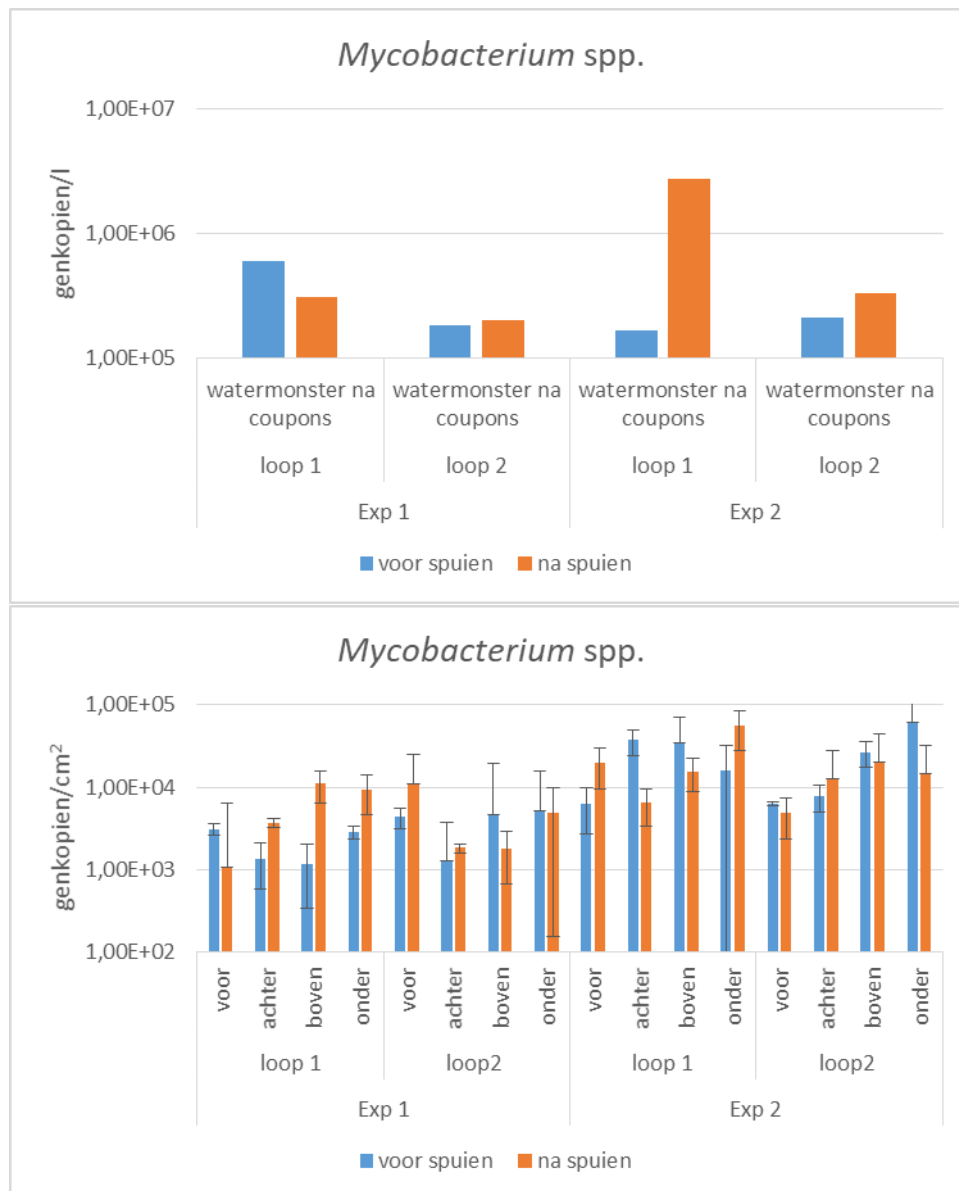
FIGUUR 35 DE 16S RRNA GENKOPIEEN VAN MYCOBACTERIUM SPP. IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 11 EN 12) IN WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 1.

In alle watermonsters van experiment 2 werden 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. waargenomen (Figuur 36). De aantal genkopieën van *Mycobacterium* spp. bleven redelijk constant in de tijd. De aantallen in loop 1 varieerden van $5,8 \times 10^4$ tot $2,7 \times 10^6$ genkopieën/l. In loop 2 varieerden de aantallen van $3,9 \times 10^4$ tot $1,3 \times 10^6$ genkopieën/l. In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. waargenomen (Figuur 36). De aantallen genkopieën van *Mycobacterium* spp. namen toe tot aan week 8 en daalden vervolgens weer. De aantallen in loop 1 varieerden van $2,5 \times 10^3$ tot $7,5 \times 10^5$ genkopieën/cm². De aantallen in loop 2 varieerden van $1,8 \times 10^3$ tot $2,8 \times 10^5$ genkopieën/cm².



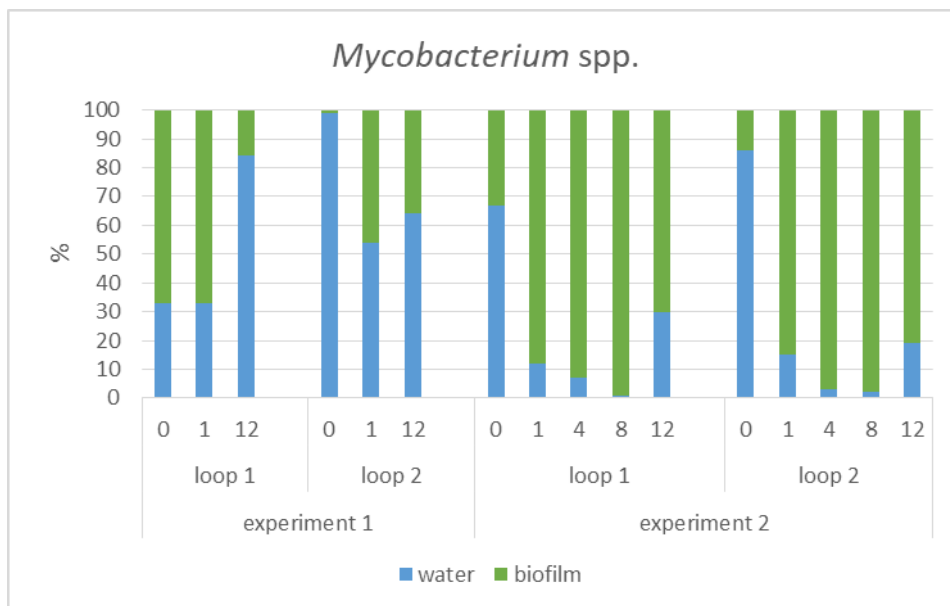
FIGUUR 36 DE 16S RRNA GENKOPIEEN VAN MYCOBACTERIUM SPP. IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 4, 8 EN 12) IN WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 2.

In de watermonsters was het aantal 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. na het spuien lager (loop 1) of nagenoeg gelijk (loop 2) dan voor het spuien (Figuur 37). Tijdens experiment 2 zijn de aantal genkopieën in beide loops hoger na het spuien dan voor het spuien. In de biofilmmonsters is het in de helft van de gevallen het aantal 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. na het spuien hoger dan voor het spuien, er is geen trend te ontdekken.



FIGUUR 37 DE 16S RRNA GENKOPIEËN VAN MYCOBACTERIUM SPP. IN WATER (BOVEN) EN BIOFILM (ONDER) TIJDENS VOOR EN NA SPUIEN IN WEEK 12 VAN EXPERIMENT 1 EN 2.

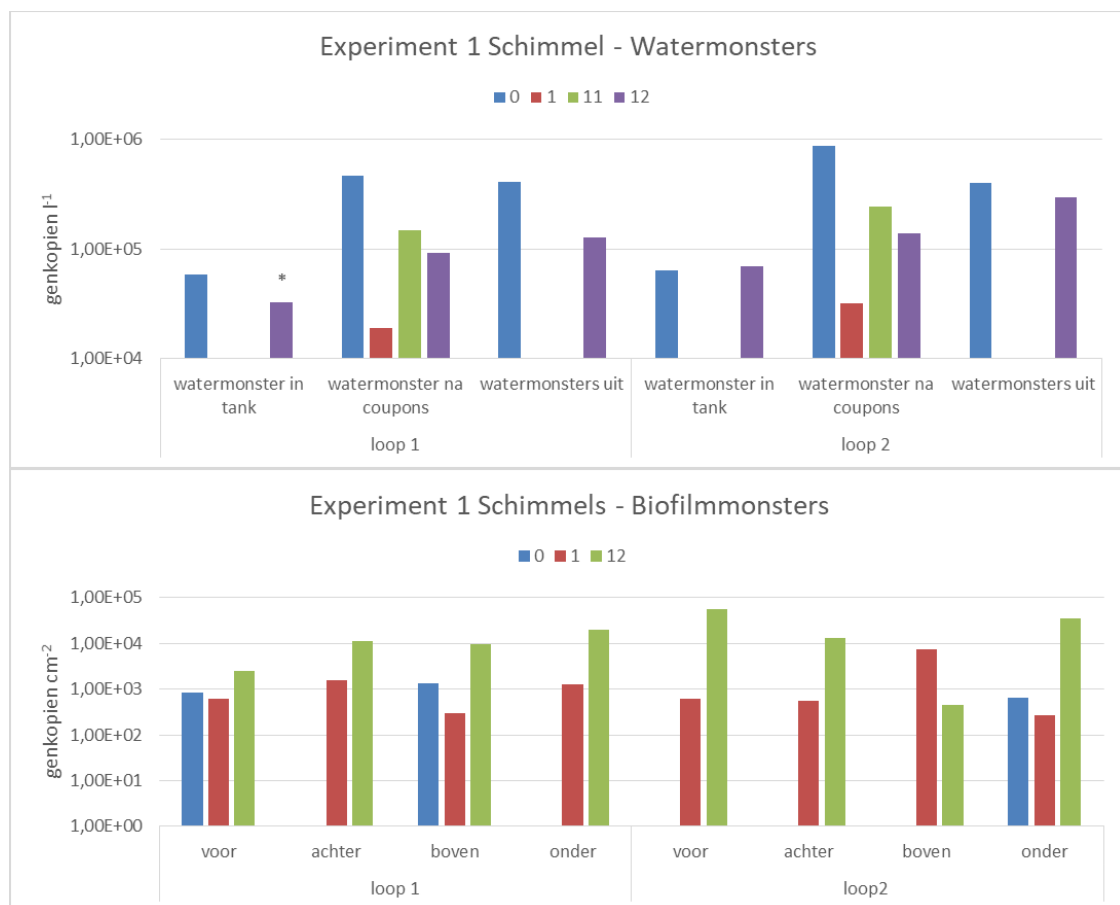
De percentuele verdeling van het aantal *Mycobacterium* spp. 16S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm wordt weergegeven in Figuur 38. Tijdens experiment 1, loop 1 bevond zich in week 0 en 1 rond de 30% van *Mycobacterium* spp. zich in de waterfase. Na 12 weken was dit gestegen naar 80%. In loop 2 werden bijna alle *Mycobacterium* spp. in de waterfase aangetroffen, na 1 en 12 weken lag dit percentage rond de 60%. Tijdens experiment 2 werden in beide loops in week 0 de meeste *Mycobacterium* spp. aangetroffen in het water. Na 1 week was dit percentage gedaald tot rond de 10%, verder gedaald in week 8 tot 1%, en vervolgens weer toegenomen tot rond de 25% in week 12.



FIGUUR 38 PERCENTAGE VAN MYCOBACTERIUM SPP. GENKOPIEËN IN WATER OF BIOFILM PER EXPERIMENT EN LOOP, VOOR DE WEKEN 0, 1 EN 12 (EXPERIMENT 1) EN WEKEN 0, 1, 4, 8 EN 12 (EXPERIMENT 2) ACHTEREENVOLGENS.

3.6.4 Schimmels

In alle watermonsters van experiment 1, behalve week 12 in loop 1, werden 18S rRNA genkopieën van schimmels waargenomen (Figuur 39). De aantallen in week 1 en 11 waren hoger dan de overige meetmomenten. De aantallen in loop 1 varieerden van $1,9 \times 10^4$ tot $4,7 \times 10^5$ genkopieën/l. De aantallen in loop 2 varieerden van $3,2 \times 10^4$ tot $8,6 \times 10^5$ genkopieën/l. In alle biofilmmonsters werden 18S rRNA genkopieën van schimmels waargenomen (Figuur 39). De aantallen in loop 1 varieerden van $2,9 \times 10^2$ tot $2,7 \times 10^4$ genkopieën/cm². De aantallen in loop 2 varieerden van $2,6 \times 10^2$ tot $6,8 \times 10^4$ genkopieën/cm².



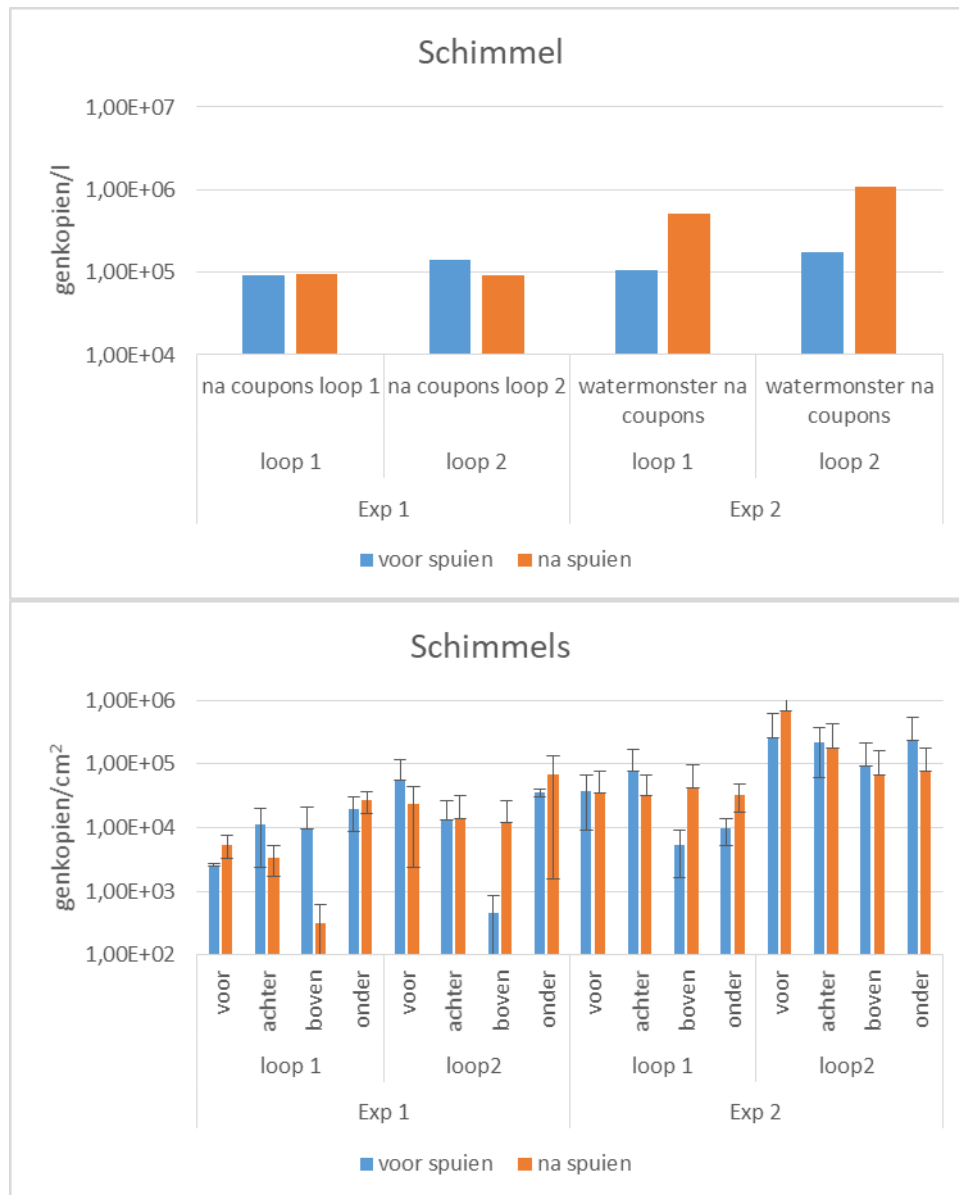
FIGUUR 39 DE 18S RRNA GENKOPIEEN VAN SCHIMMELS IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 11 EN 12) IN HET WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 1. *=DETECTIELIMIET

In alle watermonsters van experiment 2 werden 18S rRNA genkopieën van schimmels waargenomen (Figuur 40). De aantallen genkopieën van Schimmel bleven redelijk constant in de tijd. Na spuien werden de aantallen hoger. De aantallen in loop 1 varieerden van $2,6 \times 10^4$ tot $5,1 \times 10^5$ genkopieën/l. De aantallen in loop 2 varieerden van $3,2 \times 10^4$ tot $1,1 \times 10^6$ genkopieën/l. In alle biofilmmonsters werden 18S rRNA genkopieën van schimmels waargenomen (Figuur 40). De aantallen in loop 1 varieerden van $8,2 \times 10^2$ tot $8,1 \times 10^4$ genkopieën/cm². De aantallen in loop 2 varieerden van $3,8 \times 10^3$ tot $1,7 \times 10^6$ genkopieën/cm².



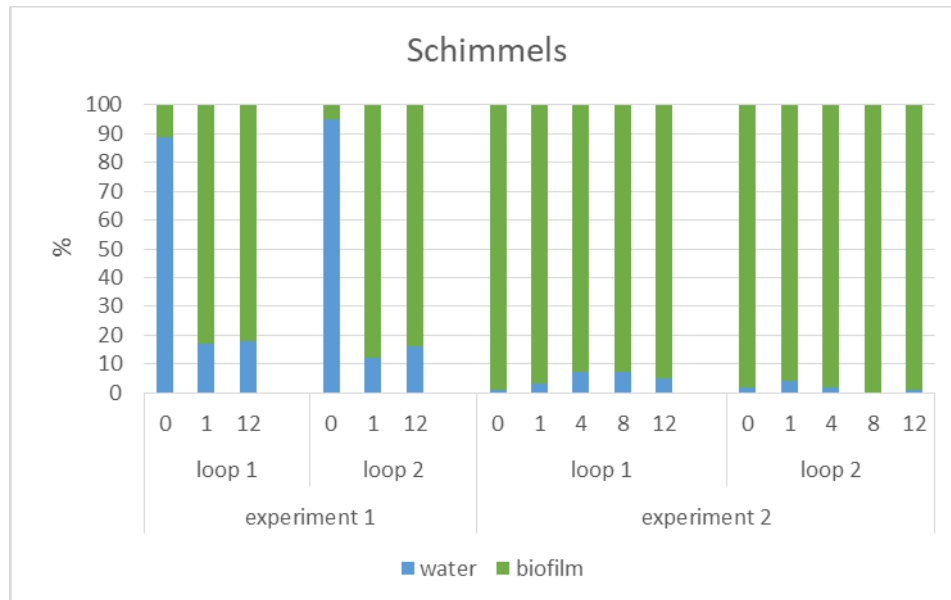
FIGUUR 40 DE 18S RRNA GENKOPIEEN VAN SCHIMMELS IN DE TIJD (DAG 0, WEEK 1, 4, 8 EN 12) IN HET WATER EN BIOFILM VAN EXPERIMENT 2.

In de watermonsters zijn het aantal 18S rRNA genkopieën van Schimmel na het spuien nagenoeg gelijk dan voor het spuien tijdens experiment 1 (Figuur 41). Tijdens experiment 2 zijn de aantal genkopieën in beide loops hoger na het spuien dan voor het spuien. In de biofilmmonsters is het in de helft van de gevallen het aantal 18S rRNA genkopieën van Schimmel na het spuien hoger dan voor het spuien, er is geen trend te ontdekken.



FIGUUR 41 DE 18S rRNA GENKOPIEEN VAN SCHIMMELS IN WATER EN BIOFILM TIJDENS WEEK 12 VOOR EN NA SPUIEN VAN EXPERIMENT 1 EN 2.

De percentuele verdeling van het aantal schimmel 18S rRNA kopieën over de twee verschillende matrices water of biofilm is weergegeven in Figuur 42. De meeste schimmels bevonden zich percentueel gezien in de biofilm, behalve tijdens week 0 van experiment 1, wanneer rond de 90% van schimmels teruggevonden werd in de waterfase. Tijdens week 1 en 12 kwam het percentage schimmels in de waterfase niet boven de 20%. Voor experiment 2 komt het percentage schimmels in de waterfase niet boven de 10%.

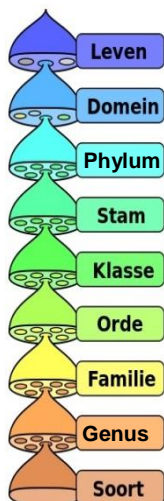


FIGUUR 42 PERCENTAGE VAN SCHIMMELAANTALLEN IN WATER OF BIOFILM PER EXPERIMENT EN LOOP, VOOR DE WEKEN 0, 1 EN 12 (EXPERIMENT 1) EN WEKEN 0, 1, 4, 8 EN 12 (EPXERIMENT 2) ACHTEREENVOLGENS.

3.7 NGS

Er zijn 133 monsters geanalyseerd met NGS. De NGS analyses geven een uitgebreid beeld van de samenstelling van de bacteriepopulatie die in een monster aanwezig is. Om te bepalen welke bacteriële groepen in de monsters aanwezig zijn, is gebruik gemaakt van het programma MOTHUR (Schloss et al. 2009). Dit programma zorgt voor verbetering van de sequentiedata door eerst een aantal stappen uit te voeren waarin eventuele fouten uit de sequentiedata worden verwijderd, vervolgens wordt een programma toegepast waarmee chimere sequenties (artefacten die t.g.v. de PCR-reacties kunnen ontstaan) worden verwijderd. Na deze verbeteringsstappen worden sequenties ingedeeld in "Operational Taxonomic Units" (OTU's) waarbij alle 16S rRNA gensequenties met een sequentie-overeenkomst van minimaal 97% ingedeeld worden binnen één OTU. Ten slotte gaat het programma in een database op zoek naar 16S rRNA gensequenties van geïdentificeerde bacteriën die overeenkomen met de sequenties van de OTU's uit de dataset en gebruikt deze vergelijking voor taxonomische identificatie van de 16S rRNA gensequenties (Figuur 43). Bij fylogenering wordt elke sequentie vergeleken met een referentiesequentiedatabase die internationaal beschikbaar is en vervolgens ingedeeld of op naam gebracht op basis van de gelijkheid met de referentiesequentie. Het taxonomisch niveau waarop de sequentie op naam kan worden gebracht hangt af van de aanwezigheid van overeenkomende sequenties in de referentiedatabase. Indien op bijvoorbeeld genusniveau een overeenkomende referentiesequentie ontbreekt, maar op familieniveau wel een overeenkomende referentiesequentie aanwezig is, dan zal de sequentie op genusniveau als "onbekend/unclassified" worden getypeerd, maar op familieniveau wel tot een familienaam kunnen worden benoemd. De betrouwbaarheid en volledigheid van fylogenering hangt af van

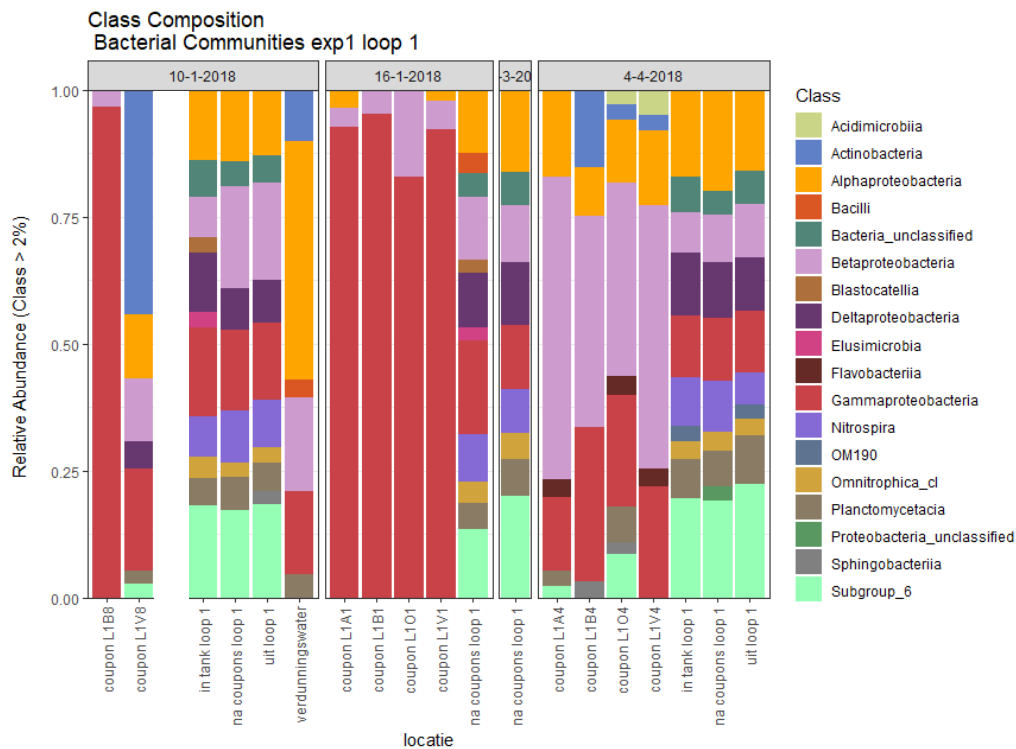
de beschikbare referentiedatabase. Voor het geanalyseerde 16S rRNA genfragment is de referentiedatabase goed en is de identificatie van de sequenties betrouwbaar. Identificatie tot genusniveau is vaak niet mogelijk door het (nog) ontbreken van overeenkomende soorten in de database. Daarnaast is het geanalyseerde stuk 16S rRNA gen te kort om de sequenties tot soortniveau in te kunnen delen. Er zijn totaal 17997 unieke OTU's in de monsters aangetroffen. Na opschoning heeft de NGS analyses in dit onderzoek geresulteerd in gemiddeld 38.396 DNA-sequenties per monster van hoge kwaliteit met een spreiding van 26.235, een maximum aantal van 101.598 sequenties per monster en een minimum aantal van 78 sequenties per monster.



FIGUUR 43 DE HIERARCHIE VAN DE ACHT BELANGRIJKSTE TAXONOMISCHE RANGEN. TUSSENLIJGENDE RANGEN ZIJN NIET AFGEBEELD.

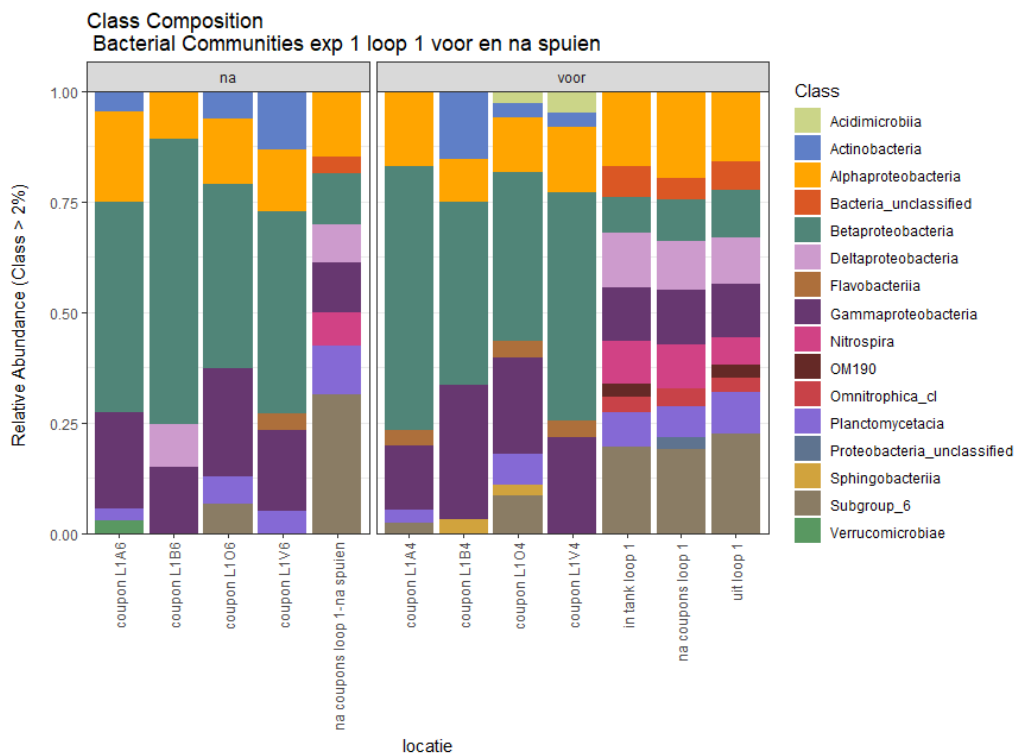
3.7.1 Experiment 1 loop 1 (constante snelheid 0,04 m/s)

Figuur 44 laat de Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster in experiment 1 loop 1. Te zien is dat de watermonsters van dag 0 (10-1-2018) op elkaar lijken, alleen in 'in tank' zijn twee Klassen aanwezig die niet worden teruggevonden in de andere watermonsters: Elusimicrobia en Blastocatellia. In het water 'uit' worden Sphingobacteriia gevonden die niet in de andere watermonsters wordt aangetroffen. De twee coupons die op dag 0 zijn bemonsterd, hebben heel kort in de installatie gezeten. De microbiële profielen van de twee coupons zijn dan ook heel verschillend; coupon L1V8 lijkt meer op de watermonsters dan coupon L1B8. Na één week lijkt het watermonster op het profiel van dag 0 (specifiek 'in tank'), alleen is de groep Bacilli er bijgekomen. De profielen van de vier coupons na week 1 lijken erg op elkaar, en ook op L1B8 van dag 0. Na 11 weken is er alleen een watermonster genomen, het profiel komt veel overeen met het watermonster van week 1. Alleen Bacilli en Blastocatellia worden dan niet meer teruggevonden. Na 12 weken komt het profiel van de drie watermonsters overeen met eerder gevonden profielen. De profielen van de coupons zien er anders uit in vergelijking met na 1 week. Sphingobacteriia, Planctomycetacia, Flavobacteriia, Actinobacteria en Acidimicrobiia worden aangetroffen.



FIGUUR 44 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDRAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANTIE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS GEDURENDE EXPERIMENT 1, LOOP 1.

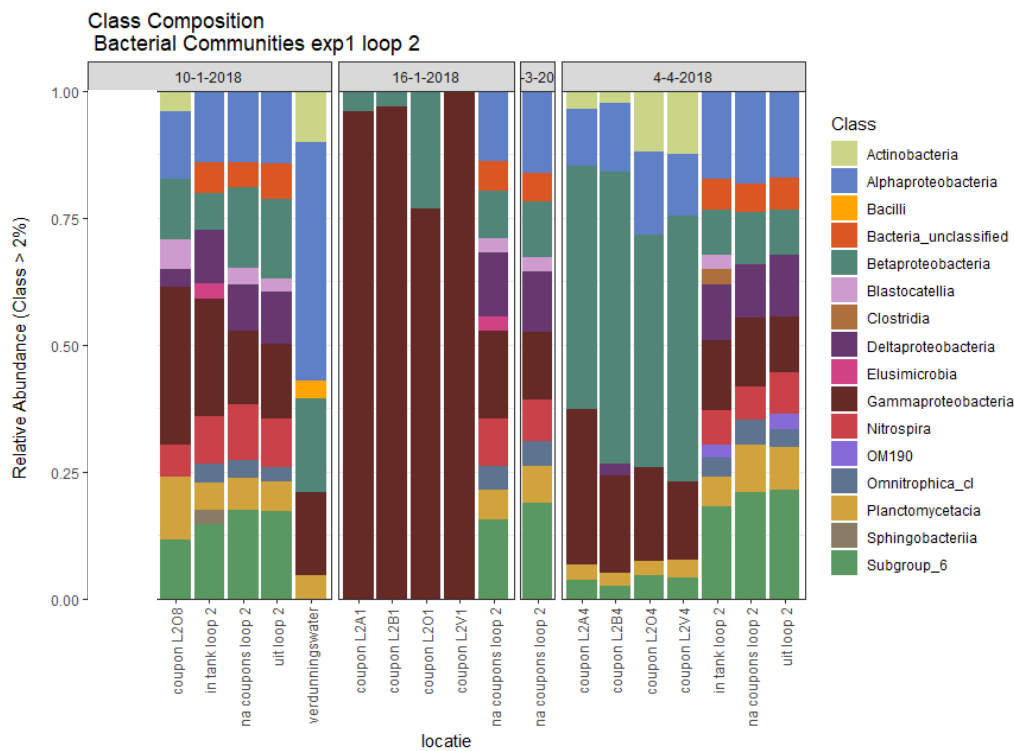
Figuur 45 laat Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van de biofilm en water monsters voor en na spuien tijdens week 12. Er zijn kleine veranderingen zichtbaar in zowel de water als de biofilm monsters voor en na het spuien. In het water worden de klasse OM190, Omnitrophica en Proteobacteria_unclassified na het spuien niet meer aangetroffen. In de biofilmmonsters worden de klasse Acidimicrobiia en Sphingobacteriia na het spuien niet meer aangetroffen. In de biofilm van de coupon Achter en Onder wordt ook Flavobacteria niet meer aangetroffen. Na het spuien worden de Verrucomicrobiae en Deltaproteobacteria teruggevonden, terwijl die voor het spuien niet dominant waren.



FIGUUR 45 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDRAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANCE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS VOOR EN NA SPUIEN TIJDENS WEEK 12 GEDURENDE EXPERIMENT 1, LOOP 1.

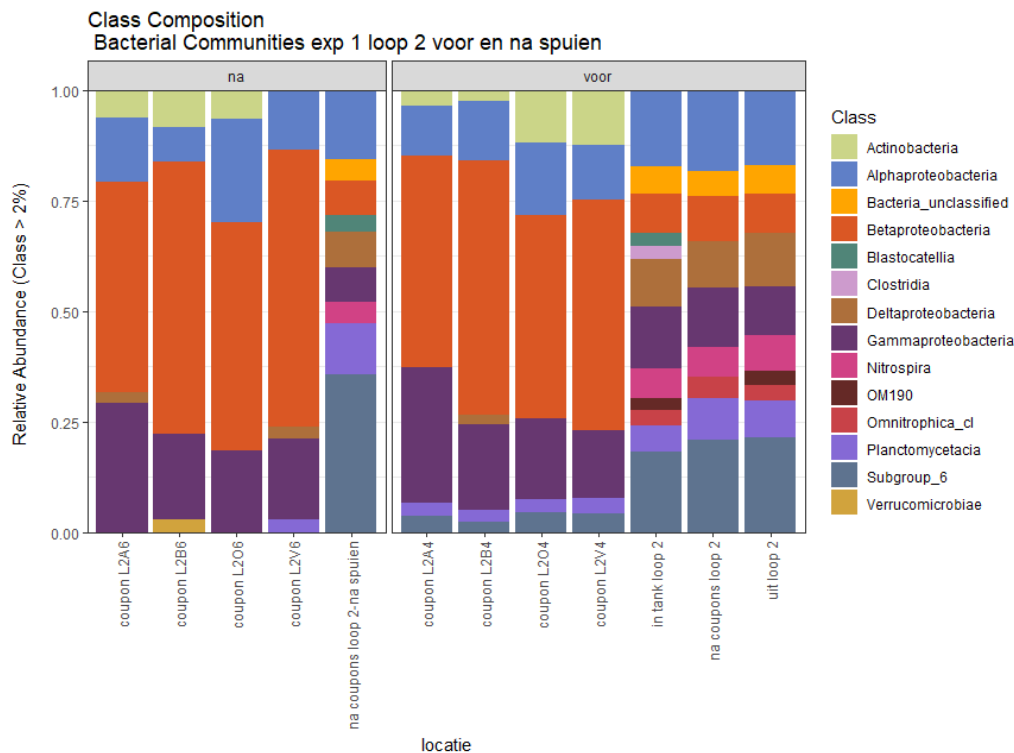
3.7.2 Experiment 1 loop 2 (constante snelheid 0,2 m/s)

Figuur 46 laat de Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster in experiment 1 loop 2. Te zien is dat de watermonsters van dag 0 (10-1-2018) op elkaar lijken, alleen in 'in tank' zijn twee Klassen aanwezig die niet worden teruggevonden in de andere watermonsters van die dag: Elusimicrobia en Sphingobacteriia. De coupon die op dag 0 is bemonsterd, heeft heel kort in de installatie gezeten. Het profiel van de coupon lijkt op de watermonsters, maar in de biofilm wordt ook Actinobacteria aangetroffen die niet in de watermonsters wordt aangetroffen. Na één week lijkt het watermonster op het profiel van dag 0. Het profiel van de vier coupons na week 1 lijken erg op elkaar en niet op het watermonster. Na 11 weken is er alleen een watermonster genomen, het profiel komt veel overeen met het watermonster van week 1. Na 12 weken komt het profiel van de drie watermonsters overeen met eerder gevonden profielen, alleen de bacteriegroep OM190 is erbij gekomen. De profielen van de coupons zien er anders uit in vergelijking met na 1 week. Subgroup_6. Planctomycetacia, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria en Actinobacteria worden aangetroffen.



FIGUUR 46 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDRAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANCE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS GEDURENDE EXPERIMENT 1, LOOP 2.

Figuur 47 laat Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van de biofilm en water monsters voor en na spuien tijdens week 12. Er zijn kleine veranderingen zichtbaar in zowel de water als de biofilm monsters voor en na het spuien. In het water worden de klasse OM190, Omnitrophica en Clostridia na het spuien niet meer aangetroffen. In de biofilmmonsters worden de klasse Subgroup_6 niet meer aangetroffen. Na het spuien worden de klasse Verrucomicrobiae teruggevonden die voor het spuien niet werden gevonden.

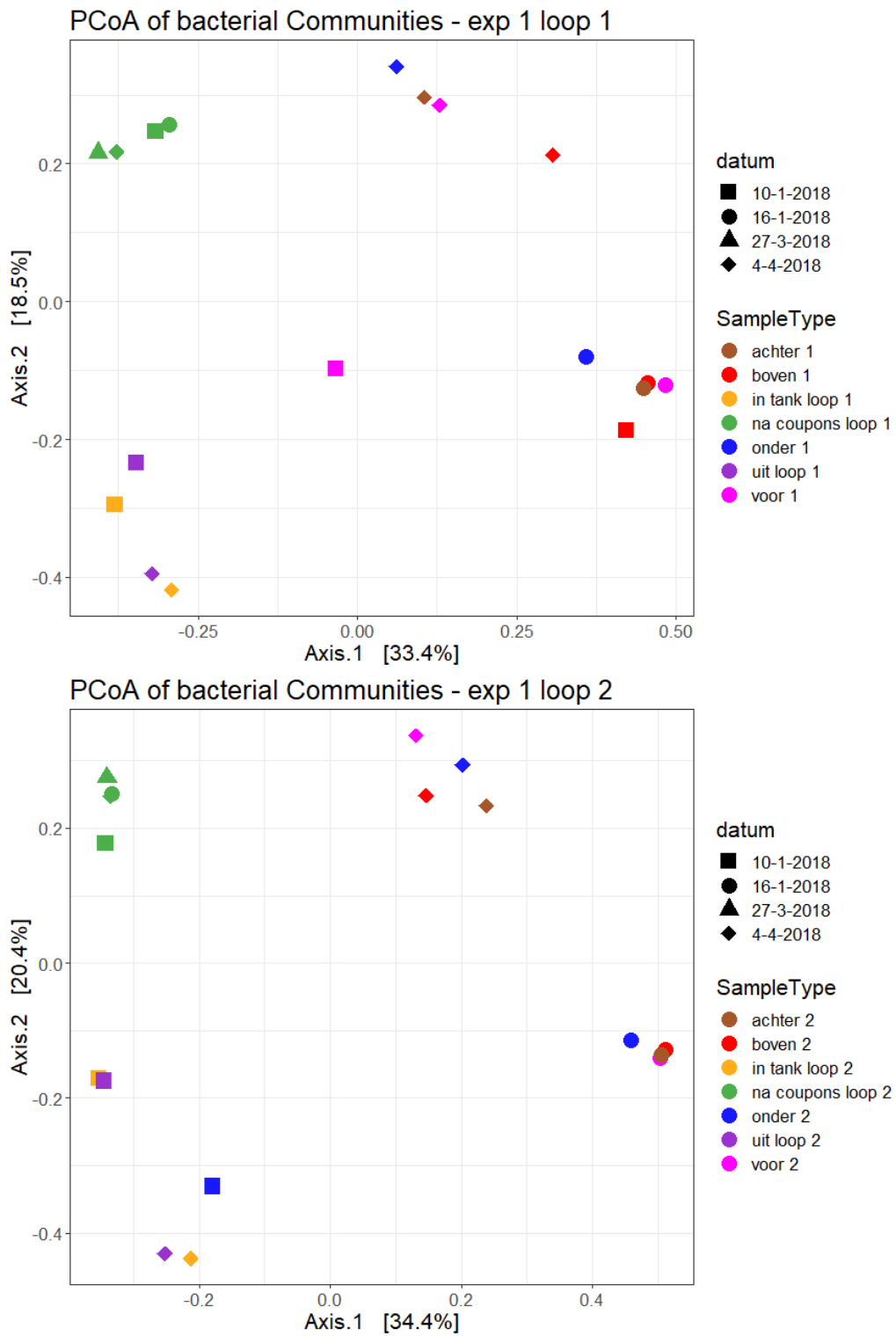


FIGUUR 47 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDRAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANCE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS VOOR EN NA SPUIEN TIJDENS WEEK 12 GEDURENDE EXPERIMENT 1, LOOP 2.

3.7.3 Experiment 1

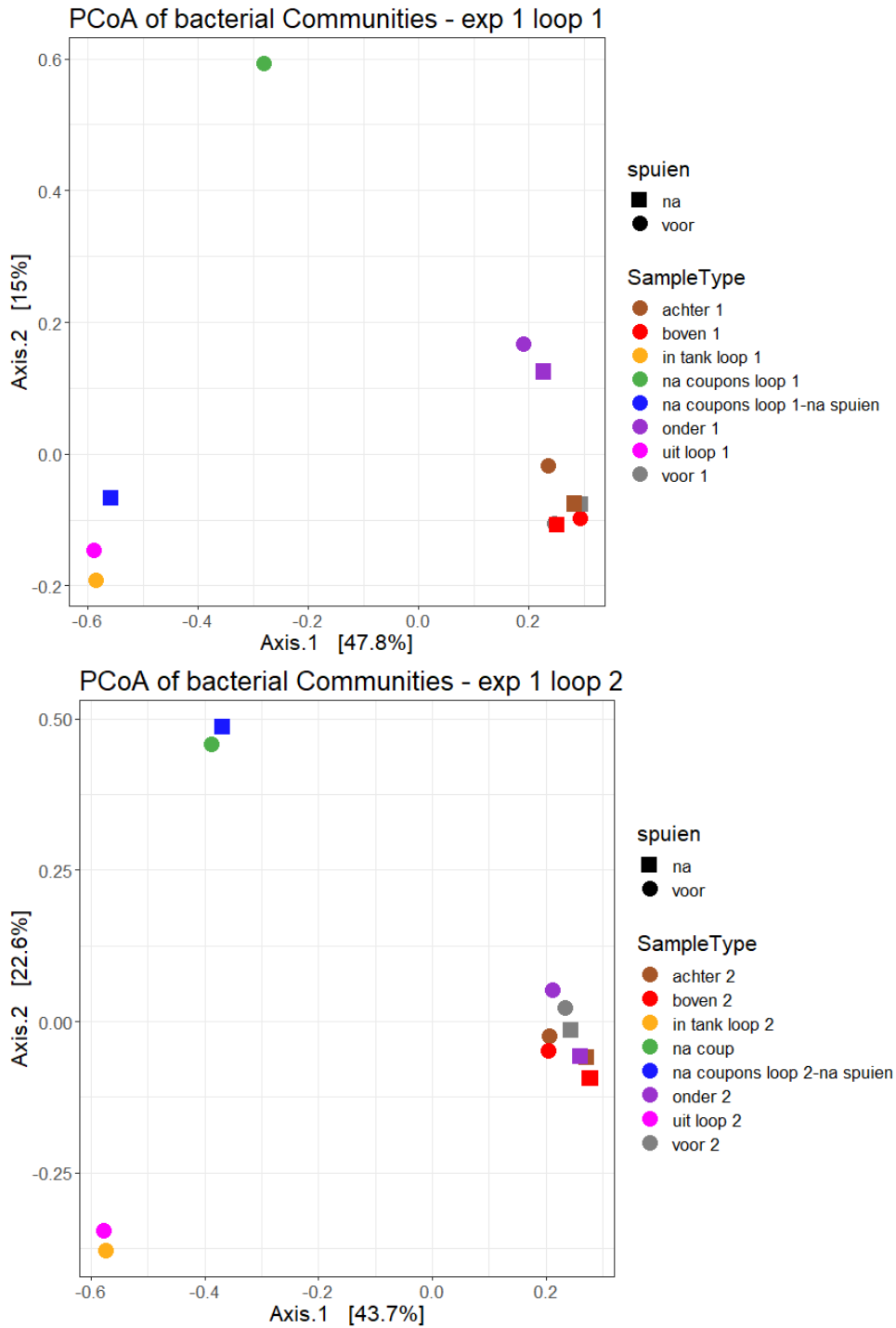
De bacteriesamenstelling tussen de verschillende monsters (biofilm, water en de verschillende meetmomenten) is ook op OTU niveau bepaald en is weergegeven in Principle Coordinate analysis (PCoA) plot van alle OTU's (Figuur 48). PCoA is een manier om de verschillen of overeenkomsten van de individuele monsters te visualiseren in een dataset (des te dichter monsters bij elkaar liggen, des te meer de bacteriesamenstelling vergelijkbaar is). De verschillende data worden weergegeven door verschillende symbolen en de verschillende monsters hebben verschillende kleuren (

Figuur 48). Het figuur heeft twee assen die gebaseerd zijn op factoren die de variantie uitleggen. Dus in dit geval wordt 51,9% (33,4+18,5%) van de variantie verklaard met deze twee assen. Uit Figuur 48 volgt dat de bacteriesamenstelling, in beide loops, van biofilm van week 1 (16-1-18) en 12 (4-4-18) en watermonsters na coupons apart clusteren. Ook clusteren de watermonsters 'in tank' en 'uit loop' apart. Deze resultaten komen overeen met de taxaplots.



FIGUUR 48 PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE WEKEN (VERSCHILLENDE KLEUREN) EN MONSTERS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) VAN LOOP 1 EN 2 VAN EXPERIMENT 1 (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).

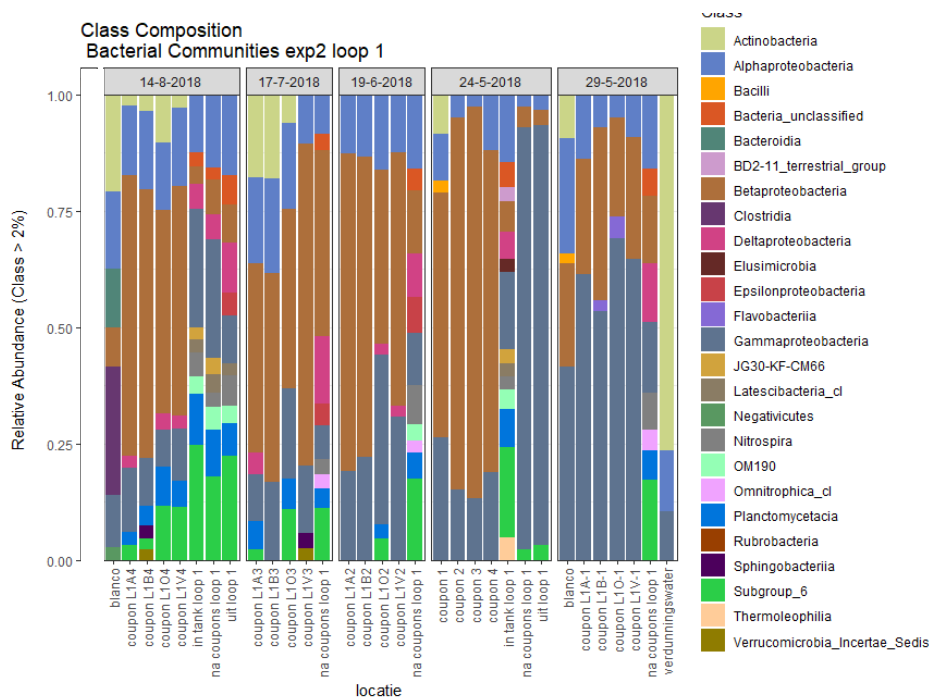
In Figuur 49 zijn de monsters van week 12 voor en na spuien (verschillende symbolen) weergegeven. Hieruit volgt dat de bacteriesamenstelling voor en na spuien, in beide loops, dat de biofilm apart clustert van de watermonsters 'in' & 'uit' en 'na coupons'. Deze resultaten komen overeen met de taxaplots.



FIGUUR 49 PCOA VAN ALLE OTU'S VAN WEEK 12 VOOR EN NA SPUIEN (VERSCHILLENDE KLEUREN) EN MONSTERS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) VAN LOOP 1 EN 2 VAN EXPERIMENT 1 (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).

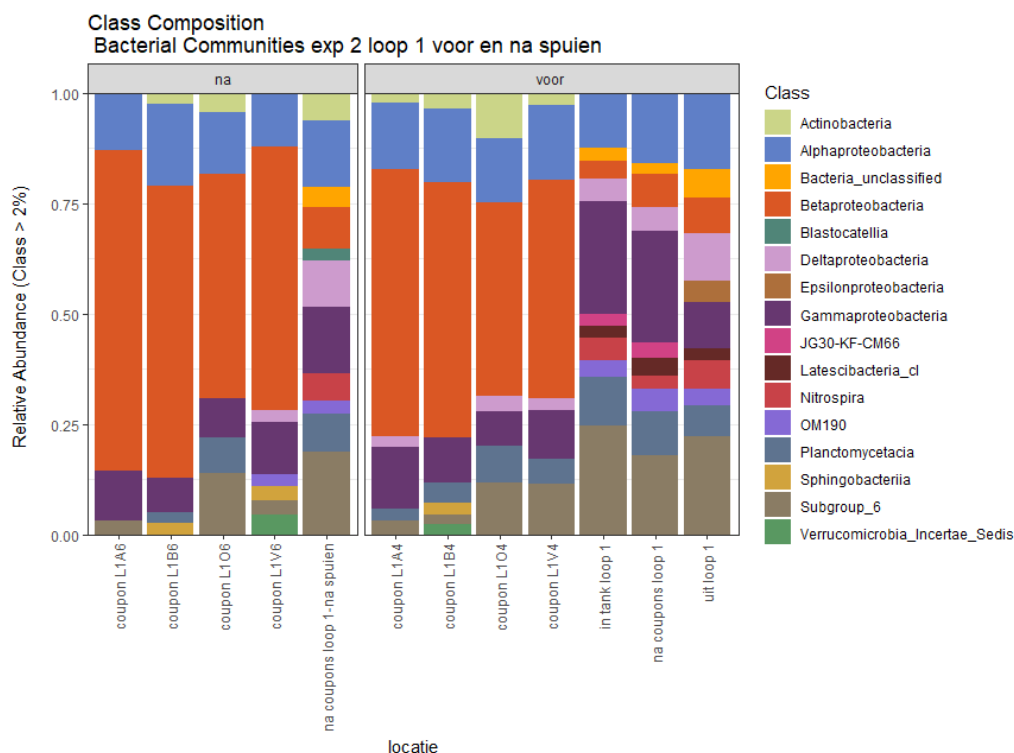
3.7.4 Experiment 2 loop 1 (dag/nacht ritme 100 huizen)

Figuur 50 laat de Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster in experiment 2 loop 1. Te zien is dat de watermonsters van dag 0 (24-5-2018) niet op elkaar lijken, vooral het profiel van 'in tank' is heel anders. De coupons bemonsterd op dag 0 hebben niet in de installatie gezeten en zijn na het spoelen gelijk in behandeling genomen. Het profiel van de biofilm van de coupons is vergelijkbaar, alleen in de biofilm van coupon 1 zijn er twee meer bacteriegroepen aanwezig dan in de biofilm van de andere coupons (Bacilli en Actinobacteria). Het watermonster na 1 week (29-5-2018) lijkt niet op dag 0. De biofilmmonsters lijken wel op elkaar en op dag 0, alleen Flaviobacteria wordt nu ook aangetroffen op de Boven en Onder coupons. Er worden nu ook geen Bacilli en Actinobacteria meer aangetroffen. Het watermonster na vier weken (19-6-2018) lijkt meer op na 1 week. De biofilm na vier weken lijkt nog steeds op de biofilm na 1 week. Het verschil is dat Flaviobacteria niet meer wordt aangetroffen, maar wel Deltaproteobacteria op de Voor en Onder coupons. Tevens wordt op de Onder coupon ook Subgroup_6 en Planctomycetacia aangetroffen. Na acht weken (17-7-2018) lijkt het watermonster qua profiel van aanwezige Klassen het meest op na 1 week. In de biofilm van de coupon Achter wordt nu ook Subgroup_6, Planctomycetacia en Deltaproteobacteria aangetroffen. Terwijl in de biofilm van de coupon Voor nu Verrucomicrobia_incertainae_sedis en Sphingobacteria wordt aangetroffen. Ook wordt in de biofilm van de coupons Achter, Boven en Onder nu ook Actinobacteria aangetroffen. Na 12 weken (14-8-2018) lijken de watermonsters op elkaar en ook op dag 0. Het water 'uit' heeft alleen wel Epsilonproteobacteria en geen JG30_KF_CM66. In de biofilm na 12 weken is er meer variatie te vinden. In de biofilm van alle coupons zit nu Actinobacteria, Planctomycetacia en Subgroup_6. In de biofilm van de Boven coupon wordt nu Verrucomicrobia_incertainae_sedis en Sphingobacteria aangetroffen. Deltaproteobacteria wordt aangetroffen in de biofilm van de Achter, Onder en Voor coupons. In de biofilm van de Voor coupon wordt geen Verrucomicrobia_incertainae_sedis en Sphingobacteria meer aangetroffen.



FIGUUR 50 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDRAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANTIE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS GEDURENDE EXPERIMENT 2, LOOP 1.

Figuur 51 laat Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van de biofilm en water monsters voor en na spuien tijdens week 12. Er zijn kleine veranderingen zichtbaar in zowel de water als de biofilm monsters voor en na het spuien. In het water worden de klasse JG30_KF_CM66, Latescibacteria_cl en Epsilonproteobacteria na het spuien niet meer aangetroffen. Na het spuien worden de volgende klasse teruggevonden die voor het spuien niet werden gevonden Blastocatellia en Actinobacteria. In de biofilmmonsters van coupon Voor worden de klasse Verrucomicrobia_incertae_sedis, Shingobacteriia en Actinobacteria niet meer aangetroffen. In de biofilm van de coupons Onder en Achter wordt de klasse Deltaproteobacteria niet meer aangetroffen na het spuien. Na het spuien worden de volgende klasse teruggevonden die voor het spuien niet werden gevonden OM190.

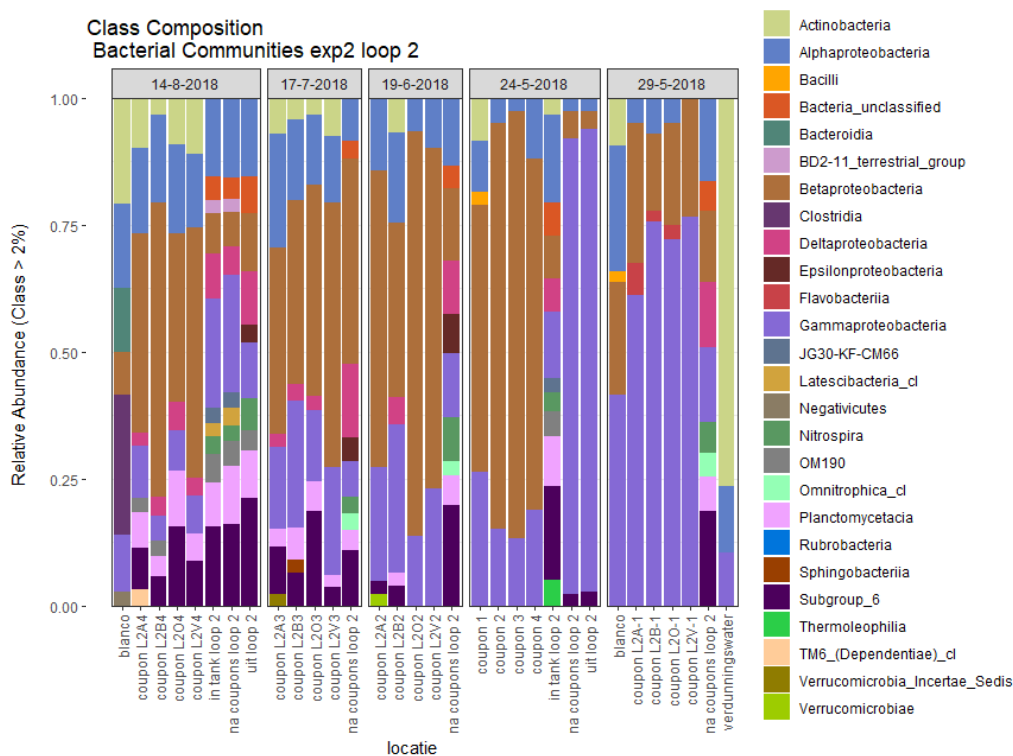


FIGUUR 51 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDRAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANCE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS VOOR EN NA SPUIEN TIJDENS WEEK 12 GEDURENDE EXPERIMENT 2, LOOP 1.

3.7.5 Experiment 2 loop 2 (variabele flow 0,04 – 0,5 m/s)

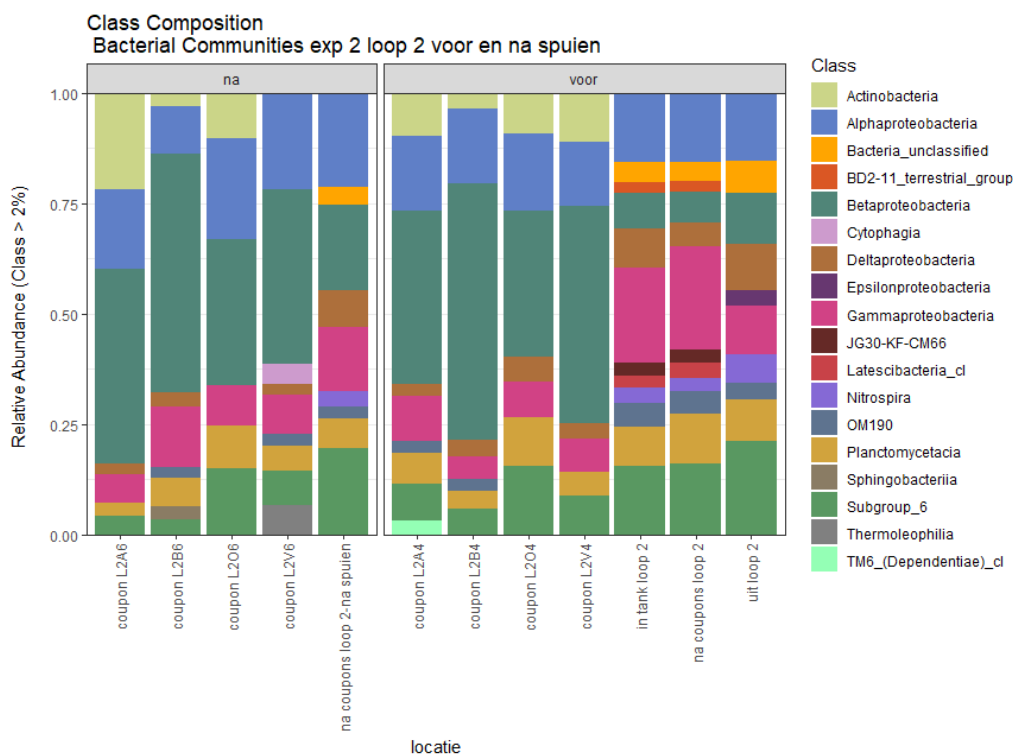
Figuur 52 laat de Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster in experiment 2 loop 2. Te zien is dat de watermonsters van dag 0 (24-5-2018) niet op elkaar lijken, vooral het profiel van 'in tank' is heel anders. De coupons bemonsterd op dag 0 hebben niet in de installatie gezeten en zijn na het spoelen gelijk in behandeling genomen. Het profiel van de biofilm van de coupons is vergelijkbaar, alleen in de biofilm van coupon 1 zijn er twee meer bacteriegroepen aanwezig dan in de biofilm van de andere coupons (Bacilli en Actinobacteria). Het watermonster na 1 week (29-5-2018) lijkt niet op dag 0. De biofilmmonsters lijken wel op elkaar en op dag 0, alleen Flaviobacteriia wordt nu ook aangetroffen op de Achter, Boven en Onder coupons. Er worden nu ook geen Bacilli en Actinobacteria meer aangetroffen. Het watermonster na vier weken (19-6-2018) lijkt meer op na 1 week. De biofilm na vier weken lijkt nog steeds op de biofilm na 1 week. Het verschil is dat Flaviobacteriia niet meer wordt aangetroffen. Op de Boven coupon wordt Subgroup_6, Planctomycetacia, Deltaproteobacteria en Actinobacteria aangetroffen. Tevens wordt op de Achter coupon ook Verrucomicrobiae en Subgroup_6 aangetroffen. Na acht weken (17-7-

2018) lijkt het watermonster qua profiel van aanwezige Klassen het meest op na 4 weken. In de biofilm van alle coupons wordt nu Subgroup_6, Actinobacteria en Planctomycetacia aangetroffen. In de biofilm van de coupon Achter wordt nu ook Verrucomicrobia_incertainae_sedis en Deltaproteobacteria aangetroffen. Terwijl in de biofilm van de coupon Boven nu Sphingobacteria wordt aangetroffen. Ook wordt in de biofilm van de coupons Achter, Boven en Onder nu ook Deltaproteobacteria aangetroffen. Na 12 weken (14-8-2018) lijken de watermonsters op elkaar en ook op dag 0. Het water 'uit' heeft alleen wel Epsilonproteobacteria en geen BD2-11_terrestrial_group. In de biofilm na 12 weken is er meer variatie te vinden. In de biofilm van alle coupons zit nu Deltaproteobacteria. In de biofilm van de Boven coupon wordt nu OM190 aangetroffen en geen Sphingobacteria meer. In de biofilm van de Achter coupon wordt nu TM6 en OM190 aangetroffen en geen Verrucomicrobia_incertainae_sedis meer.



FIGUUR 52 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANCE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS GEDURENDE EXPERIMENT 2, LOOP 2.

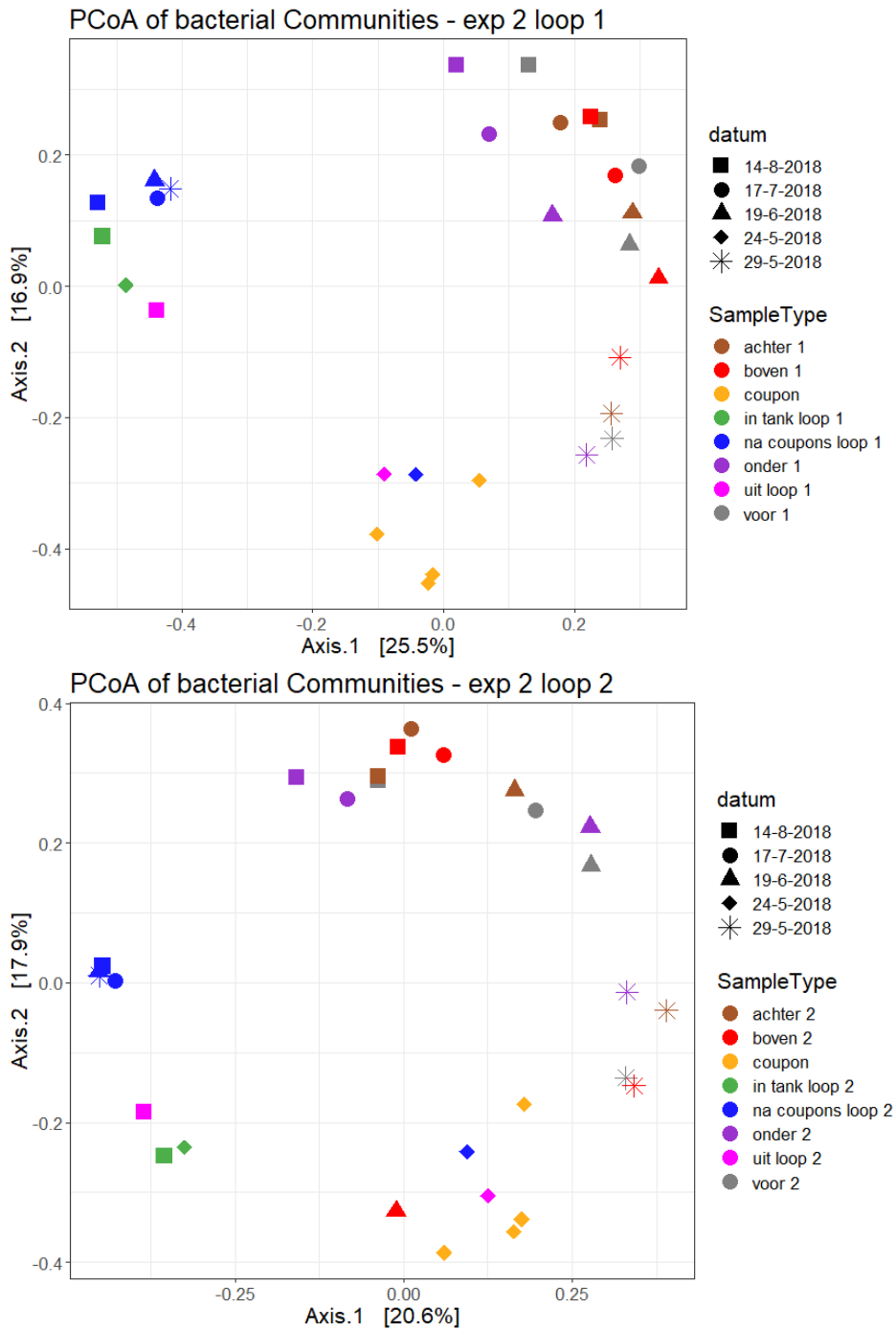
Figuur 53 laat Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van de biofilm en water monsters voor en na spuien tijdens week 12. Er zijn kleine veranderingen zichtbaar in zowel de water als de biofilm monsters voor en na het spuien. In het water worden de klasse JG30_KF_CM66, Latescibacteria_cl en BD2-11_terrestrial_group na het spuien niet meer aangetroffen. In de biofilmmonsters wordt de klasse TM6 na het spuien niet meer teruggevonden. In de biofilmmonsters van coupon Voor worden de klasse Thermoleophillia, OM190 en Cytophagia na het spuien aangetroffen. In de biofilm van de coupons Boven wordt de klasse Sphingobacteriia na het spuien aangetroffen.



FIGUUR 53 KLASSEN DIE MEER DAN 2% BIJDRAGEN AAN DE RELATIEVE ABUNDANCE IN WATER EN BIOFILM MONSTERS VOOR EN NA SPUIEN TIJDENS WEEK 12 GEDURENDE EXPERIMENT 2, LOOP 2.

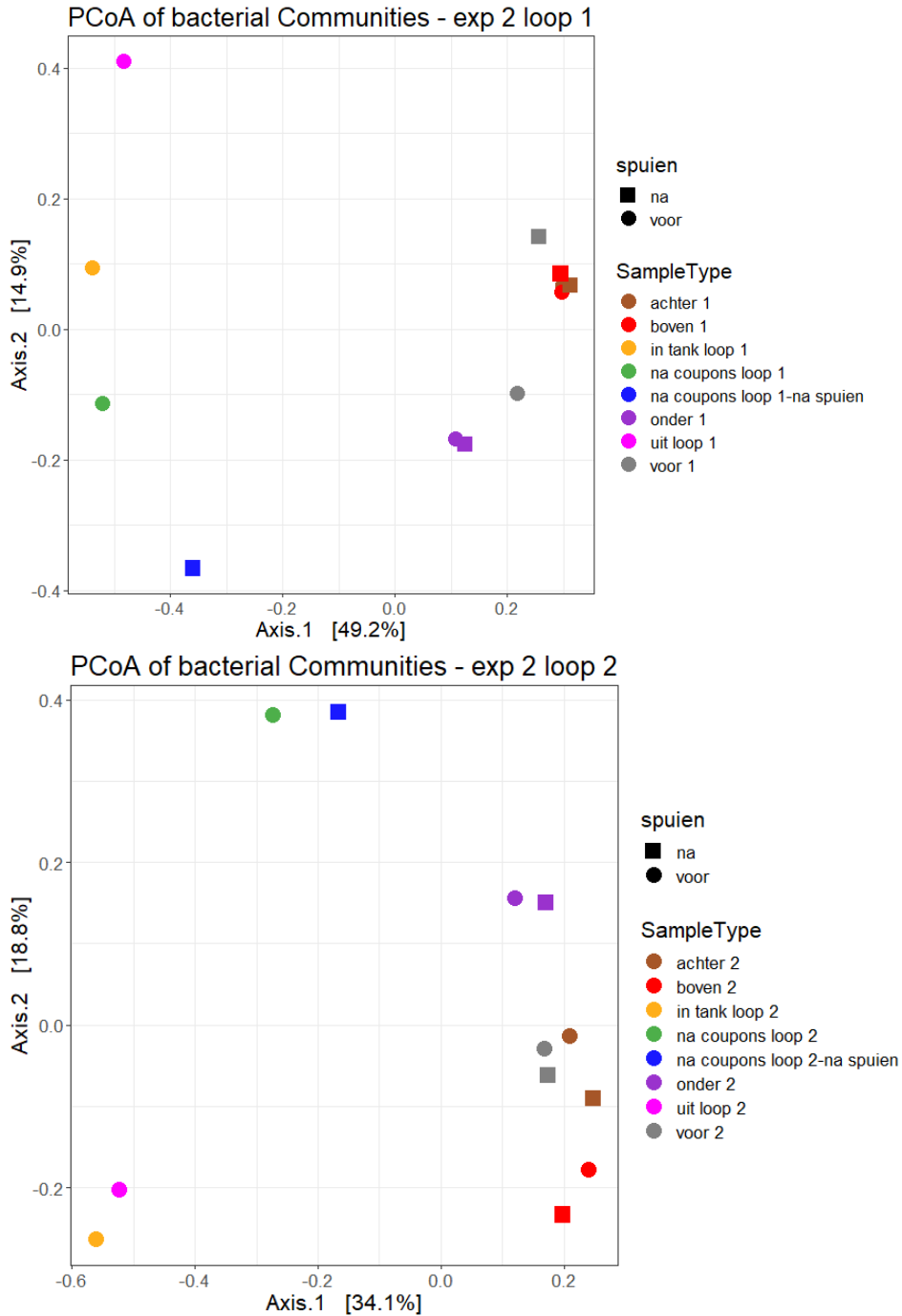
3.7.6 Experiment 2

In Figuur 54 zijn alle biofilm,- en watermonsters weergegeven van experiment 2 in een PCoA plot. Uit deze plot volgt dat de bacteriesamenstelling in beide loops, van biofilm van week 1, 4, 8 en 12 en watermonsters na coupons apart clusteren (Figuur 54). Daarnaast clusteren de biofilm en watermonsters van week 1 ook apart. Ook clusteren de watermonsters 'in tank' en 'uit loop' apart. Deze resultaten komen overeen met de taxaplots.



FIGUUR 54 PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE WEKEN (VERSCHILLENDE KLEUREN) EN MONSTERS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) VAN LOOP 1 EN 2 VAN EXPERIMENT 2 (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).

In Figuur 55 zijn de monsters van week 12 voor en na spuien (verschillende symbolen) weergegeven. Hieruit volgt dat de bacteriesamenstelling, in beide loops, van de biofilm en watermonsters 'in' & 'uit' en 'na coupons' apart clusteren. Deze resultaten komen overeen met de taxaplots.



FIGUUR 55 PCOA VAN ALLE OTU'S VAN WEEK 12 VOOR EN NA SPUIEN (VERSCHILLENDE KLEUREN) EN MONSTERS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) VAN LOOP 1 EN 2 VAN EXPERIMENT 2 (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).

4 Discussie

De vraag die centraal stond tijdens dit onderzoek is: Wat is de mate van uitwisseling is van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en wat het effect van hydraulica hierop? Om die vraag te beantwoorden zijn er twee dynamische experimenten uitgevoerd waar vier verschillende hydraulische regimes zijn getest.

Experiment 1

Loop 1 0,04 m/s

Loop 2 0,2 m/s

Experiment 2

Loop 1 dag/nacht ritme huizen

Loop 2 variabele flow (0,04 - 0,5 m/s)

Door de locatie van de proefinstallatie kunnen er mogelijk neveneffecten hebben opgetreden waar, in deze studie, geen rekening mee is gehouden. Een voorbeeld is dat de proefinstallatie in de proefhal bij KWR volledig naast de buitenmuur staat die van glas is. De zon kan daardoor mogelijk bepaalde plekken en/of coupons specifiek opwarmen, ondanks de isolatie van de leidingen in de proefinstallatie. Maar ook de temperatuur van de proefhal kan een rol spelen, deze schommelde gedurende de experimenten tussen de 20 en 23°C.

Iets anders wat mee kan spelen is de coupon locatie in de buis. In de inzet kunnen kleine variaties aanwezig zijn waardoor de coupon niet nauwgesloten met de binnenwand zit. Iets lager of hoger heeft daardoor invloed op lokale wervelingen. Verder wat mogelijk invloed kan hebben op de resultaten is dynamiek in de vulling, tank en moment van bemonstering.

In alle experimenten zijn de ATP concentraties, KG25-aantallen, aantal genkopieën in water van dag 0 hoger dan de overige meetmomenten, dit zou mogelijk kunnen komen door achtergebleven resten van het schoonmaken, wat bacteriën als voeding zouden kunnen gebruiken. Een andere mogelijke verklaring is de verblijftijd van het water in het vulling of watertank.

4.1 ATP en KG25

In het water van de twee loops van beide experimenten werd er geen verschil in ATP concentraties waargenomen. Dus de verschillende hydraulische regimes lijken geen invloed te hebben op de ATP concentratie in water. Tijdens experiment 1 was een verschil te zien in de biomassa verdeling op de verschillende locaties van de coupons: bij een lagere snelheid was er meer biomassa aanwezig onderin de buis t.o.v. een hogere snelheid waar een meer gelijke verdeling van biomassa werd waargenomen. Tijdens experiment 2 werden er geen verschillen aangetroffen tussen de verschillende locaties van de coupons. Over het geheel genomen zijn de ATP concentraties tijdens beide experimenten vergelijkbaar. Dus het lijkt er op dat een lagere snelheid meer biomassavorming veroorzaakt, in vergelijking met hogere snelheid en variabele flows.

De KG25-aantallen in het water in de loops zijn gedurende de looptijd van de twee experimenten stabiel en er worden geen verschillen waargenomen tussen de loops. In de biofilm wordt er geen effect van de locatie van de coupon gevonden en ook geen verschil tussen de verschillende loops. De KG25-aantallen tijdens de twee experimenten zijn vergelijkbaar. Dus verschillende hydraulische regimes hebben geen invloed op KG25-aantallen in het water en de biofilm.

4.2 qPCR's

In experiment 2 is te zien dat week 8 (17-7-2018) altijd hogere aantallen genkopieën vertoont in vergelijking met de andere meetmomenten. In de temperatuur en waterkwaliteit gegevens werden geen afwijkingen gevonden. Dus voor deze piekconcentraties is geen verklaring te vinden.

Door de matrixverhouding (biofilm en water) te berekenen en in een grafiek uit te zetten, wordt duidelijk waar de specifieke bacteriegroepen zich bevinden, in de waterfase of de biofilm. Dit is echter wel een relatieve verdeling, wat bijvoorbeeld betekent dat relatief gezien in loop 1 meer *Legionella* spp. (in %) in het water dan in de biofilm bevindt dan vergeleken met andere loops, maar dat absoluut gezien minder *Legionella* spp. genkopieën in het water van loop 1 worden aangetroffen dan in het water van de andere loops.

Voor *Legionella* spp. geldt dat in zowel experiment 1 als 2 de aantallen in het water afnemen. De legionella-aantallen nemen in experiment 1 af in de biofilm, maar in experiment 2 is dit beeld wisselender. Ook zijn de concentraties tussen experiment 1 en 2 niet vergelijkbaar, in het water zijn de legionella-aantallen in experiment 1 namelijk hoger dan in experiment 2. Terwijl voor biofilm het tegenovergestelde wordt gevonden. *Legionella* spp. wordt relatief meer in de biofilm aangetroffen dan in het water. Dit is het tegenovergestelde wat in een eerder onderzoek werd gevonden, waar in een statische materialentest test meer *Legionella* spp. in de waterfase worden gevonden (BTO 2018.032).

De resultaten van *Mycobacterium* spp. laten zien dat tijdens experiment 1 de aantallen in zowel het water als de biofilm toenemen in de tijd. In experiment 2 blijven de *Mycobacterium* spp. aantallen in het water en de biofilm meer gelijk. De aantallen zijn in het water voor beide experimenten gelijk, maar in de biofilm van experiment 2 zijn de concentraties hoger (1-2 log). In experiment 1 wordt *Mycobacterium* spp. relatief meer aangetroffen in de waterfase, zoals ook het geval was in de materialentest (BTO 2018.032). Echter tijdens experiment 2 wordt *Mycobacterium* spp. relatief meer in de biofilm gevonden, wat ook volgens verwachting is omdat *Mycobacterium* een celmembraan met een waslaagje heeft en daardoor makkelijker blijft plakken aan oppervlaktes (Bergey, 2000).

Schimmels worden, net zoals in de materialentest (BTO 2018.032), het meeste aangetroffen in de biofilm. De concentraties in het water zijn vergelijkbaar voor experiment 1 en 2, in de biofilm zijn de concentraties van experiment 2 hoger (1 log).

4.3 Effect van spuien

Het spuien veroorzaakte een ATP concentratie verhoging in het water van $\pm 1-1,5$ ng/l. In de biofilm was de ATP concentratie soms hoger (gemiddeld 1,7 keer hoger) en soms lager (gemiddeld 1,4 keer lager). Na het spuien waren de KG25-aantallen in het water hoger, in de biofilm waren de KG25-aantallen soms hoger en soms lager er was geen trend te ontdekken.

Bij de qPCR resultaten van alle micro-organismen zie je dat in het water na spuien het aantal genkopieën hoger is. In de biofilm is het beeld wisselend, in de helft van de gevallen zijn het aantal genkopieën hoger of lager en was er geen trend te ontdekken.

Deze waarnemingen kunnen mogelijk het effect zijn de watertank. Doordat er met spuien een hogere snelheid wordt gevraagd dan tijdens de rest van het experiment kan eventueel materiaal dat op de bodem en zijkanten van de watertanks zit mee worden genomen tijdens het spuien.

4.4 NGS

Bij alle experimenten werd gevonden dat de populatiesamenstelling in het inkomende water van dag 0 geheel anders was dan het uitgaande water op dag 0. Daarnaast waren de populatiesamenstelling tijdens week 12 van het inkomende en uitgaande meer vergelijkbaar. Dit verschil zou mogelijk verklaard kunnen worden door verblijftijd in de watertank voorafgaand aan het experiment.

Bij alle experimenten lijkt de biofilm per monsternoment op elkaar, in het begin worden altijd dezelfde drie klassen aangetroffen; alpha,- beta,- en gammaproteobacterie. In de loop van de tijd worden er meer verschillende Klasse waargenomen. Drie van de vier hydraulisch regimes hebben ook ieder een twee unieke Klasse in de biofilm van week 12, Tabel 10.

TABEL 10 UNIEKE KLASSE PER HYDRAULISCH REGIME IN DE BIOFILM VAN WEEK 12.

Snelheid	Unieke klasse
Constante snelheid (0,04 m/s)	Flaviobacteria, Acidimicrobiia
Dag/nacht ritme 100 huizen	Epsilonproteobacteria, Verrumicrobia_incertae_sedis
Lage gevarieerde snelheid (0,04 – 0,50 m/s)	TM_cl, OM190

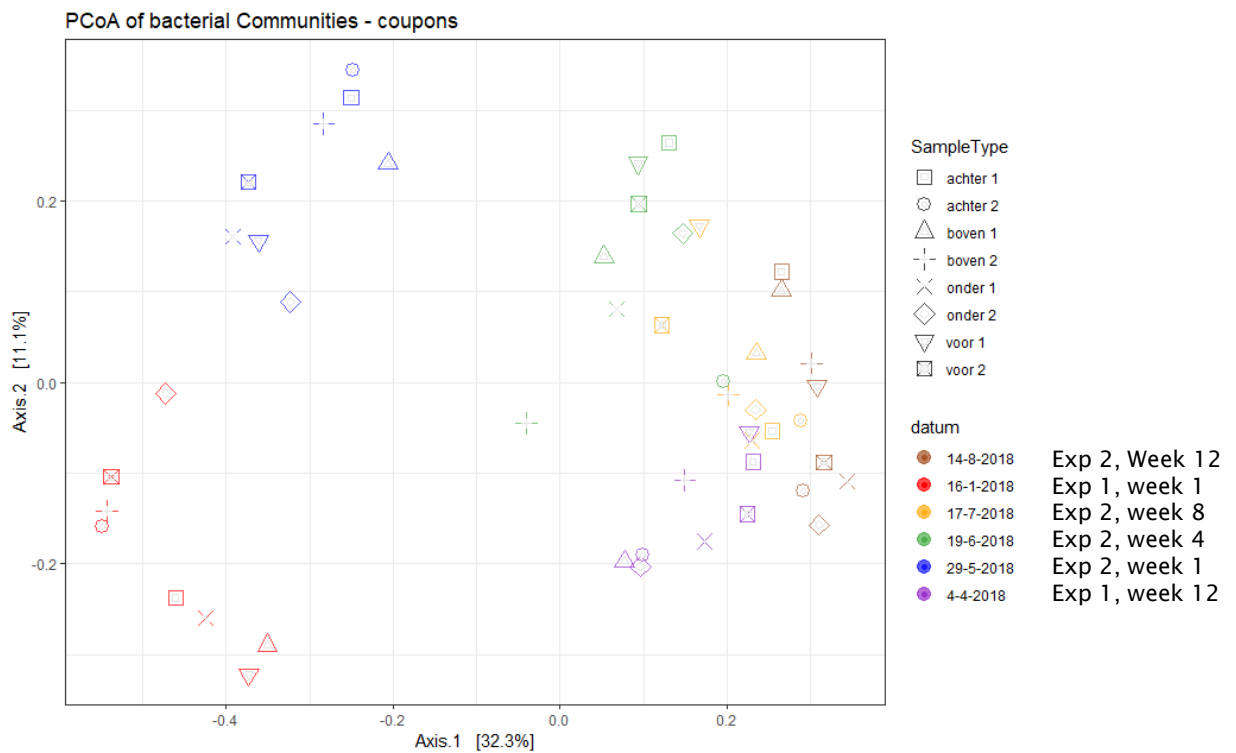
Veel van de aangetroffen klasse zijn hetzelfde bij de diverse hydraulische regimes. Klasse Blastocatellia was specifiek voor experiment 1 en werd alleen in het water aangetroffen van beide loops. Elusimicrobia werd alleen in het water aangetroffen tijdens dag 0 en week 1, in experiment 1 en het dag/nacht ritme van experiment 2.

Tijdens experiment 2 werden er meer Klassen aangetroffen die niet werden aangetroffen tijdens experiment 1. Tijdens dag 0 en week 1 werden de volgende unieke Klasse waargenomen in het water Epsilonbacteria, JG30-KF-CM66, Latescibacteria_cl en Thermolephilia. Klasse Verrumicrobia_incertae_sedis werd een enkele keer aangetroffen in de biofilm.

Tijdens experiment 2 loop 2, wordt Deltaproteobacteria vanaf het begin aangetroffen in het water. Vanaf week 4 wordt hij ook in de biofilm van één coupon aangetroffen, in week 8 wordt de groep in de biofilm van drie coupons aangetroffen en in week 12 in de biofilm van alle coupons.

Een verschil tussen de twee experimenten behalve de hydraulica was ook de watertemperatuur van 5-6°C tussen de twee experimenten dit zou ook mogelijk een verklaring kunnen zijn voor de waarneming van verschillende Klasse.

Op basis van de verschillende PCoA plots is te zien dat bij verschillende hydraulische regimes dezelfde groepen samen clusteren. Als je alle coupons van beide experiment en loops in één PCoA plot plot dan zie je dat de coupons van week 1 (16-1-2018 en 29-5-2018) van allebei de experimenten een aparte cluster vormen (Figuur 56). De overige weken clusteren samen. Op basis hiervan kunnen we concluderen dat de verschillende hydraulische regimes geen invloed hebben op de microbiële populatie.



FIGUUR 56 PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE COUPONS VAN ALLE WEKEN (VERSCHILLENDE KLEUREN) EN OP VERSCHILLENDE LOCATIES (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) VAN LOOP 1 EN 2 VAN EXPERIMENT 1 EN 2 (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).

4.5 Uitwisseling

In BTO 2018.032 is een uitwisselingsmodel beschreven die we hier kunnen toepassen. Het verschil tussen de ATP concentratie in en uit de proefopstelling wordt gedeeld door verschil plus de ATP concentratie in de biofilm (het gemiddelde van de vier coupons), de ATP concentratie voor dit doeleinde zijn omgerekend naar pg/cm^2 (zie aanname paragraaf 2.6.5). Tabel 11 laat de ATP uitwisseling zien van biofilm naar water in percentages voor iedere loop per experiment. Deze uitwisseling vindt plaats van biofilm naar water omdat het een positief getal betreft. De berekening is uitgevoerd met de resultaten van week 12. Te zien is dat de uitwisseling minimaal is, de constante snelheid van 0,2 m/s en dag/nacht ritme hebben de hoogste uitwisseling van 5,8 en 5,5 % respectievelijk.

TABEL 11 ATP UITWISSELING PERCENTAGES PER EXPERIMENT EN LOOP.

	ATP uitwisseling (%)
Experiment 1	
-loop 1 (constante snelheid 0,04 m/s)	1,2
-loop 2(constante snelheid 0,2 m/s)	5,8
Experiment 2	
-loop 1 (dag/nacht ritme)	5,5
-loop 2 (variabele flow 0,04 - 0,5 m/s)	2,1

Als we naar de uitwisseling kijken op populatieniveau wil je een bacteriegroep die niet of laag aanwezig is in het inkomende water, hoog in de biofilm en ook in het uitgaande water aanwezig is. De focus ligt ook hier op de monsters genomen in week 12. Als er op het niveau Klasse wordt gekeken zijn er niet veel bacteriegroepen die voldoen aan deze criteria. In onderstaand voorbeeld is er gekeken naar Klasse Subgroup_6 die in alle experimenten en monsters aanwezig was, maar niet hoger in de biofilm was (Tabel 12). De berekening is hetzelfde als voor ATP. In deze tabel staat de relatieve abundantie uitgedrukt in percentages. Te zien is dat de percentages in het inkomende water nagenoeg gelijk zijn over de experimenten, hetzelfde geldt voor het uitgaande water. In de biofilm verschillen de percentages meer tussen de twee experimenten. De twee constante snelheden (experiment 1) hebben relatief minder subgroup_6 in vergelijking met de variabele flows (experiment 2). Als dan het uitwisselingspercentage wordt berekend is te zien dat experiment 1 de hoogste uitwisselingspercentages heeft. Experiment 2, loop 1 heeft een uitwisselingspercentage van 200% dit komt omdat er in het inkomende water meer subgroup_6 zit dan in het uitgaande water, dus hier is dus waarschijnlijk uitgewisseld van water naar biofilm.

Er wordt op orde, family of genus niveau geen bacteriegroep gevonden die duidt op uitwisseling.

TABEL 12 RELATIEVE ABUNDANCE VAN SUBGROUP_6 UITGEDRUKT IN PERCENTAGES

	Experiment 1		Experiment 2	
	Loop 1	Loop 2	Loop 1	Loop 2
Water in tank	15%	14%	22%	13%
Water uit loop	18%	17%	18%	16%
Biofilm	2%	3%	6%	8%
Verschied water in en uit	3%	3%	-4%	3%
Uitwisseling	60%	50%	200%	27,3%

Op basis van de ATP uitwisseling percentages lijkt het er op dat uitwisseling niet beïnvloed wordt door verschillende hydraulische regimes. Als er wordt gekeken naar de populatiesamenstelling verschillen de uitwisseling percentages per experiment en lopen meer van elkaar. Er is echter maar gekeken naar 1 bacteriegroep, omdat er verder geen bacteriegroep kon worden gevonden die voldoet aan de gestelde criteria. Maar dat de uitwisseling beperkt lijkt te zijn bevestigt de conclusies die werden getrokken in het project waar de microbiële populatie aan de kraan vergelijkbaar was af pompstation (Roeselers et al., 2015).

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Op basis van de resultaten kunnen we het volgende concluderen:

- De proefinstallatie KIVODIS verschaft inzicht in biomassa en de invloed hiervan op de microbiologische waterkwaliteit.
- De verschillende hydraulische regimes hebben geen invloed op de ATP concentratie in water.
- Het lijkt er op dat een lagere snelheid meer biomassa op de bodem veroorzaakt, in vergelijking met hogere snelheid en variabele flows.
- KG25-aantallen verschillen niet tussen experimenten, dus geen invloed van hydraulische snelheden. Dit geldt voor zowel water als biofilm.
- Spuien verhoogd de ATP concentraties en KG25 aantallen in water, in biofilm is het effect van spuien wisselend.
- De percentuele verdeling van het aantal *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. en Schimmels 16S/18S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm, laat percentueel zien dat de meeste van deze micro-organismen zich in de biofilm bevinden.
- Op basis van de NGS resultaten kunnen we concluderen dat de verschillende hydraulische regimes leiden tot vergelijkbare microbiologische clusters.
- Het lijkt er op dat uitwisseling niet beïnvloed wordt door verschillende hydraulische regimes.

5.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten doen we de volgende aanbevelingen:

- Gevoeligheid van de opstelling bepalen, m.b.t. de vulleiding en watertanks, maar ook gericht op couponvariatie.
- Experimenten opnieuw uitvoeren waarbij gebruik wordt gemaakt van gelabelde bacteriën. Met deze gelabelde bacteriën (bijvoorbeeld met green fluorescent protein) kan worden achterhaald waar bepaalde bacteriën groeien.
- In deze studie hebben we gezien dat week 8 en 16 een vergelijkbare microbiële populatie hebben en dat week 1 hiervan afwijkt. Experimenten die 1 week duren hebben dus nog geen stabiele populatie.
- Verschillende materialen analyseren in KIVODIS om te kijken of de resultaten van een statisch systeem overeenkomen.

6 Referenties

- Van Bel N., (2018) Effectiviteit van conventionele en alternatieve reiningsmethoden in het verwijderen van microbiele besmetting uit het distributeinet. (Vol. BTO 2018.042). Nieuwegein: KWR.
- Bergey, D.H., Holt, J. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. Ninth edition.
- Heijnen, L., Wullings, B., & Medema, G. (2002). Toepassingsmogelijkheden van moleculair-biologische methoden voor de drinkwater praktijk (Vol. BTO 2002.136, pp. 106). Nieuwegein: KWR.
- Kuiper, M. W., Valster, R. M., Wullings, B. A., Boonstra, H., Smidt, H., & Van Der Kooij, D. (2006). Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 5750-5756.
- Learbuch, K. (2018). Invloed van leidingmateriaal op de uitwisseling van bacteriën tussen biofilm en water. (Vol. BTO 2018.032) Nieuwegein, KWR.
- Roeselers, G., Coolen, J., van der Wielen, P. W. J. J., Jaspers, M. C., Atsma, A., de Graaf, B., & Schuren, F. (2015). Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environ Microbiol*.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. and Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75(23), 7537-7541.
- Van der Kooij, D., Wubbels, G., & Veenendaal, G. (2006). Legionella anisa in leidingwater: bedreiging of bondgenoot? (Vol. KWR 06.089, pp. 29). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P. W. J. J., Italiaander, R., & Heijnen, L. (2011). Kwantitatieve detectiemethoden voor opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. (Vol. BTO 2011.034(s)). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P. W. J. J., & Wullings, B. (2013). Moleculaire methoden voor de kwantificatie en identificatie van *Aeromonas* in drinkwater (Vol. BTO 2013.228). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P. W. J. J., Italiaander, R., Wullings, B. A., Heijnen, L., & van der Kooij, D. (2014). Opportunistic pathogens in drinking water in the Netherlands. In D. Van der Kooij & P. W. J. J. van der Wielen (Eds.), *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs* (pp. 177-205). London, UK: IWA Publishing.
- Wullings, B. (2015). Karakterisering van bacteriën die een rol spelen in de biologische ontijzering en ontmanganing in de grondwaterzuivering (Vol. BTO 2015.032, pp. 60). Nieuwegein: KWR.
- Wullings, B., Wubbels, G., Douma, A., & Voogt, R. (2005). Detectie van *Legionella pneumophila* in water met een kwantitatieve real-time PCR-methode (Vol. BTO 2005.033, pp. 34). Nieuwegein: KWR.

Bijlage I Uitgebreide schoonmaakprocedure set-up en coupons

Schoonmaken KIVODIS

Troebelheidsmeters dicht zetten (anders vragen ze water en is het water wat recirculeert op een gegeven moment op)!

Inhoud één loop is 224 liter (24 m heen en terug).

Schoonmaken met chloor (200 mg/l); 2,5 uur recirculeren

Eerst moet het reinigingsvat met een minimumvolume worden gevuld (staat op vat) en daar wordt de chloor bij gedaan. Sleutelschakelaar om zetten en dan krijg je het reinigingsproces instellingen tabel te zien. Je moet altijd iets invullen bij de tijden.

Setpoint druk	bar	1
Setpoint flow	m ³ /h	1,17
Spoeltijd voor weektijd	s	900
Weektijd	s	900
Spoeltijd na weektijd	s	6300

Tussentijds chloor meten met cuvette test.

Na 2,5 uur recirculeren met chloor minimaal 30 minuten spoelen.

Na spoelen ook chloor meten om te kijken of het spoelen voldoende is geweest.

Spoelen (na chloor, SDS en citroenzuur dosering)

Reinigingsvat volledig vullen en de kraan open laten staan (op 10).

Setpoint druk	bar	1
Setpoint flow	m ³ /h	5,8
Spoeltijd voor weektijd	s	60
Weektijd	s	60
Spoeltijd na weektijd	s	6300

De kraan na de coupons open doen en minimaal een half uur spoelen. **Let op niet weggaan!**

De druk op de kraan kan anders worden. Dan is het mogelijk dat het reinigingsvat sneller leegloopt of vult (overstroomt) dan de bedoeling is. Dus het niveau goed in de gaten houden. De pomp mag nooit lucht aanzuigen!

Schoonmaken met SDS (10g/l); 30 minuten recirculeren

Reinigingsvat vullen met minimumvolume en de hoeveelheid SDS uit de 20 liter vaten oppompen met masterflex pomp om zo schuimvorming te minimaliseren.

Setpoint druk	bar	1
Setpoint flow	m ³ /h	1,17
Spoeltijd voor weektijd	s	900
Weektijd	s	60
Spoeltijd na weektijd	s	900

Na 30 minuten recirculeren met SDS minimaal 30 minuten spoelen (tot schuimvorming weg is).

Schoonmaken met citroenzuur (30 g/l); 30 minuten recirculeren

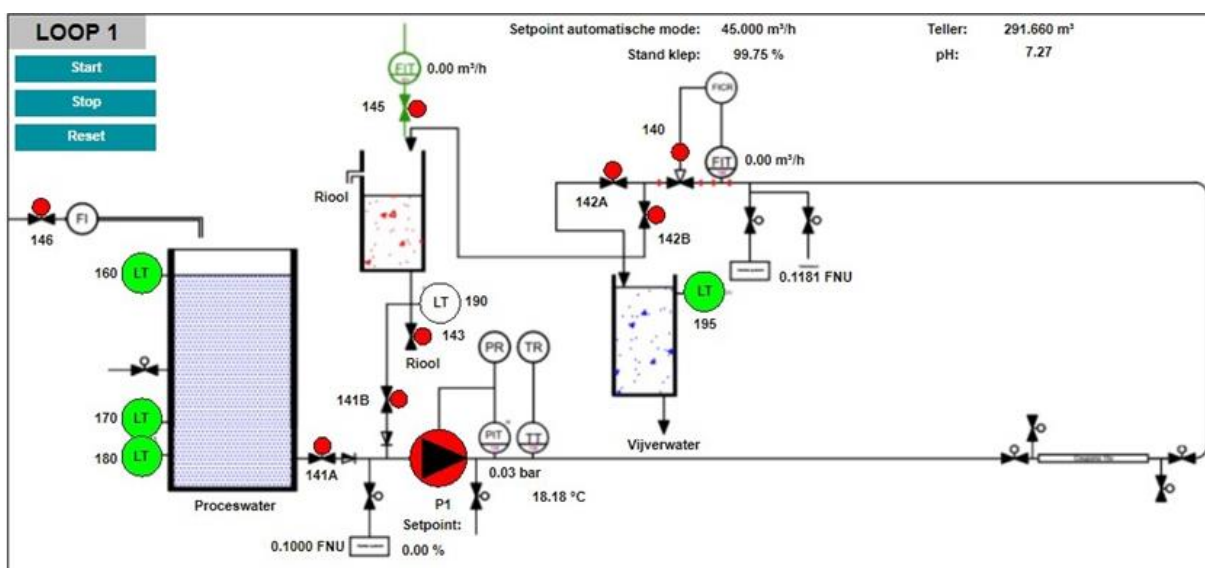
Reinigingsvat vullen met minimumvolume en de hoeveelheid citroenzuur uit de 20 liter vaten of oppompen met masterflex pomp of in het vat gieten.

Setpoint druk	bar	1
Setpoint flow	m ³ /h	1,17
Spoeltijd voor weektijd	s	900
Weektijd	s	60
Spoeltijd na weektijd	s	900

Na 30 minuten recirculeren met citroenzuur minimaal 30 minuten spoelen (tot schuimvorming weg is).

Aanvullend spoelen

Na het 30 minuten spoelen na citroenzuur nog een aanvullend spoelregime. De reden is hiervoor is omdat tussen klep 141A (of 241A in loop 2) en de pomp geen terugslag klep zit, dus er kan chloor/SDS/citroenzuur zitten. Daarom dit ook spoelen.



Dit doen we door over te gaan naar de manuele modus (dan haalt hij zijn water uit de voorraadtank van 3m³ en loost het via de reinigingstank naar het riool).

Instellingen als volgt:

- Pomp op 5% zetten (maar nog niet aan zetten)
- 141A aan
- 142B aan
- 143A aan
- 140 (kleppen) op 5% en aan
- 146 aan (en hendel open)
- Pomp aan

Let op 146 blijft in manuele modus niet aan (dus op een gegeven moment is de tank leeg), dus niet weggelopen tijdens het spoelen! Ongeveer 15 minuten spoelen.

Spoelen uitzetten:

- Pomp als eerste uit (wachten tot hij echt uit is!)
- 141A uit
- De rest uit

Overige opmerkingen

Niet doen:

- Systeem volledig leeg laten lopen (door de kraan na de coupons open te zetten). Je kan het reinigingsvat volledig vullen (±250 liter) en op recirculeren zetten, maar deze 250 liter is (waarschijnlijk) niet voldoende om het hele systeem te vullen, dus dan gaat de pomp lucht aanzuigen.

Snelheden m³/h → m/s

m ³ /h	m/s	Tijd die het kost voor water om 1x rond te gaan	Dan in 30 minuten is het water ...x rondgegaan
1,17	0,04	24/0,04 = 600 sec	3x
5,8	0,2	24/0,2 = 120 sec	15x

Schoonmaken coupons

De coupons worden in een glazen bekeerglas gebracht met daarin SDS (10 g/l dodecylsulfaat natrium). Daarna worden de bekeerglazen in een waterbad gezet van 100°C gedurende 15 min. Vervolgens worden de bekeerglazen voor 10 min in het ultrasoonbad gezet en daarna gespoeld. De coupons moeten na het spoelen gedurende 15 min in citroenzuur (30 g/l) staan. Dit is volgens KWR-huisvoorschrift LMB- 072. Vervolgens worden ze weer gespoeld en gedroogd in de droogstoof totdat de coupons droog zijn. Daarna de coupons spoelen volgens KWR-huisvoorschrift LMB-006:

- Plaats de coupons in een bekeerglas en spoel gedurende 60 ± 5 min (1 tot 3 m/min)
- Laat de coupons vervolgens gedurende 24 ± 1 uur in het water bij kamertemperatuur staan
- Spoel de coupons nogmaals gedurende 60 ± 5 min (1 tot 3 m/min)
- Laat de coupons staan in het water tot gebruik.

Bijlage II Simdeum patronen

Bestemd voor: Kimberly Learbuch
Betreft: SIMDEUM patronen
Kopie / afschrift: Paul vd Wielen, Joost van Summeren
Van: Mirjam Blokker
Datum: 29 mei 2017

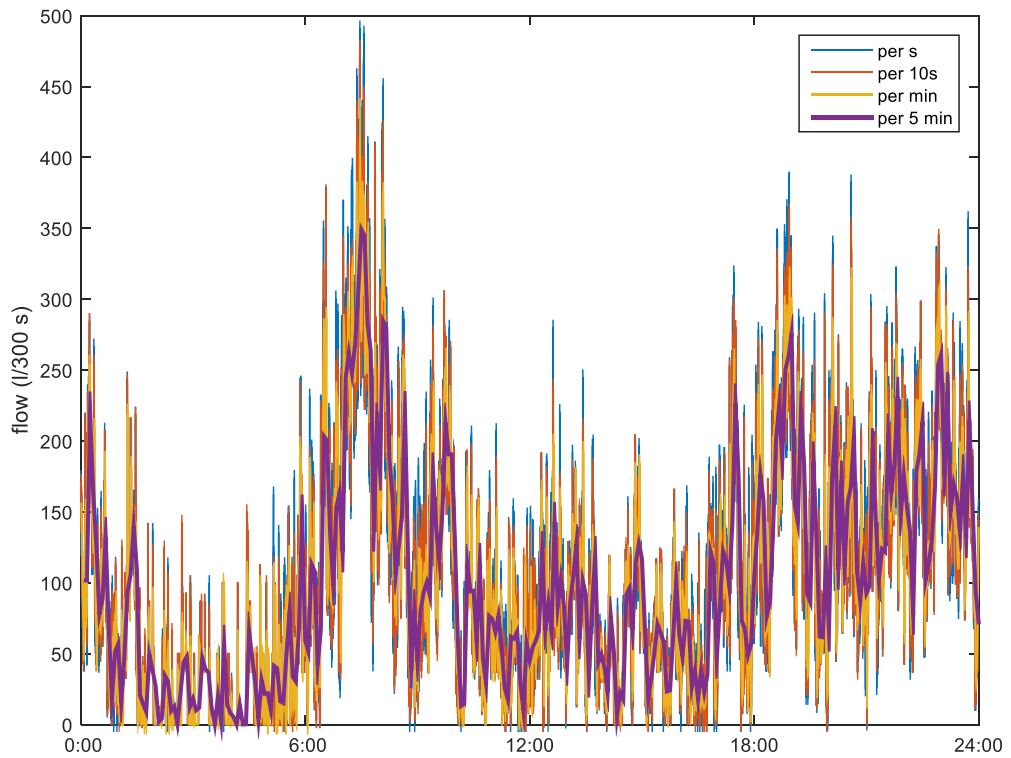
Voor de labopstelling van een 100 mm PVC-leiding heeft Kimberly gevraagd hoe de “natuurlijke variatie” van de volumestroom in een leiding die 100 woningen voedt eruit ziet. De variatie is te vinden over de tijd (over de dag, over de week, over 3 maanden van dag tot dag) en over de ruimte (nieuwbouwwoningen met tuin voor gezinnen, oude woningen voor 60-plussers, etc.). De grootte van de variatie is afhankelijk van de gekozen tijdstap (1 seconde, 1 minuut, 1 uur).

Bij deze memo hoort een excel-bestand met daarin vier sheets (voor een tijdstap van 1 s, 10 s, 1 min, 5 min) met per tijdstap (per rij beginnend om middernacht tot aan de volgende middernacht) de hoeveelheid liter die gevraagd wordt. Er zijn 100 kolommen. Iedere kolom vertegenwoordigt een andere dag. De patronen zijn opgesteld voor de “gemiddelde Nederlandse woning in 2010”, op basis van het onderzoek Waterverbruik Thuis¹ en de CBS-data van 2010.

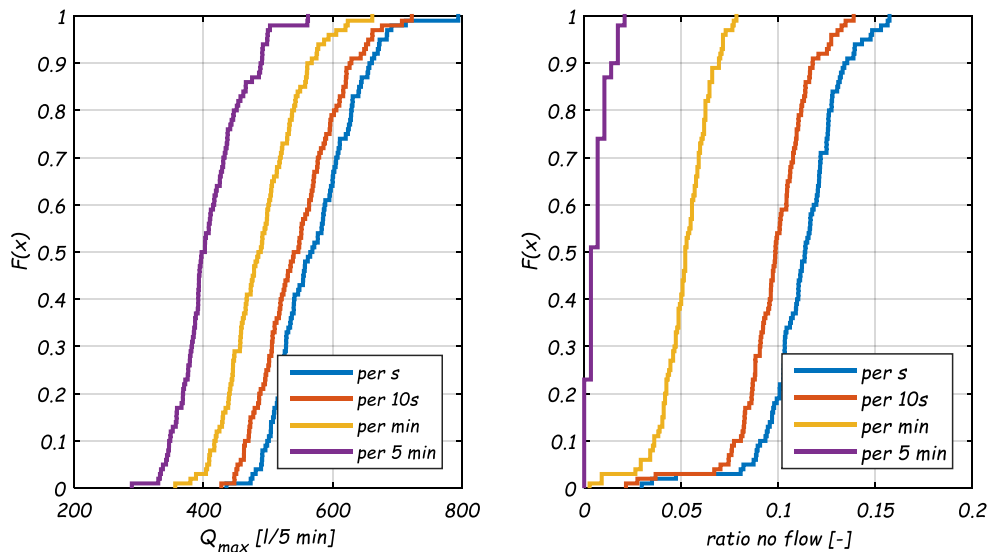
Figuur 57 laat het patroon zien voor een specifieke dag met een resolutie van 1 seconde (blauw), 10 seconden (rood), 1 minuut (geel), 5 minuten (paars). Op de y-as is alles omgerekend naar een volumestroom per 5 minuten. Duidelijk te zien is dat de lijn voor 5 minuten veel minder piekerig is, er veel minder momenten zijn met stilstand (geen volumestroom) en de maximale volumestromen lager zijn, ten opzichte van de lijn voor de resolutie per seconde. Dat geldt voor alle 100 dagpatronen, zoals te zien in Figuur 58. De maximale volumestroom is t.o.v. de waarden bij 1 seconde ca. 5% lager (tot maximaal 10%) bij een resolutie van 10 seconde, ca. 13% lager (tot maximaal 25%) bij een resolutie van 1 minuut en ca. 28% lager (tot maximaal 40%) bij een resolutie van 5 minuten. Bij een tijdstap van 1 seconde is er ca. 11% van de tijd sprake van stilstaand water, bij een tijdstap van 10 seconde is dat 10%, bij een tijdstap van 1 minuut 5% en bij een tijdstap van 5 minuten minder dan 1%. Om de maximale volumestroom en de stilstand in de nacht voldoende goed te laten aansluiten bij de “werkelijkheid” wordt aanbevolen om de resolutie van 1 of 10 seconde te gebruiken, 1 minuut of 5 minuten is al te grof.

Gebruik dus de data met tijdstap van 1 seconde of 10 seconden. Het is mogelijk om ofwel alle 100 patronen achter elkaar (elke dag een ander patroon) ofwel om patroon nummer 44 (kolom AR) elke dag te herhalen. Voor het gemak zou een patroon om middernacht moeten starten zodat het tijdstip van het patroon ook overeenkomt met de werkelijke tijd.

¹ Foekema, H. en van Thiel, L. (2011). Watergebruik thuis 2010, TNS NIPO, Amsterdam. in opdracht van VEWIN.



FIGUUR 57 VOLUMESTROOM (L/5 MIN) OVER EEN DAG VOOR PATRONEN MET VERSCHILLENDE RESOLUTIE IN TIJDSTAP.



FIGUUR 58 CUMULATIEVE FREQUENTIEVERDELING VOOR 100 PATRONEN VAN LINKS) MAXIMALE VOLUMESTROOM OP EEN DAG; RECHTS) AANDEEL STILSTAAND WATER OP EEN DAG.

N.B. een mediane waarde van 573 liter per 300 sec komt in een $\varnothing 100$ mm leiding overeen met 0.25 m/s, dit is daarmee een zelfreinigende leiding.

Bijlage III Gemiddelde concentraties qPCR's

16S		genkopieën/l	Experiment 1		Experiment 2			
			Gem	Stdev	gem	stdev		
water	loop 1	watermonster in tank loop 1	1,20E+08	4,36E+07	1,33E+08	9,37E+07		
		watermonster na coupons loop 1	1,60E+08	4,62E+07	2,01E+08	1,79E+08		
		watermonster uit loop 1	1,51E+08	5,77E+07	3,41E+08	4,42E+08		
	Loop 2	watermonster in tank loop 2	1,27E+08	2,24E+07	4,43E+07	8,00E+06		
		watermonster na coupons loop 2	1,25E+08	4,11E+07	3,82E+08	4,73E+08		
		watermonster uit loop 2	1,28E+08	7,82E+07	3,38E+08	4,49E+08		
biofilm	Loop 1	genkopieën /cm2	Experiment 1		Experiment 2			
				gem	stdev	gem	stdev	
			Voor	1,35E+06	1,98E+06	8,82E+06	9,09E+06	
			Achter	1,81E+06	1,71E+06	6,17E+06	5,23E+06	
			Boven	2,17E+06	2,50E+06	4,80E+06	3,06E+06	
			Onder	3,49E+06	3,76E+06	6,39E+06	6,38E+06	
			Loop 2	Voor	2,60E+06	2,74E+06	1,09E+07	1,20E+07
				Achter	3,31E+06	4,13E+06	3,64E+06	2,87E+06
	Boven	2,01E+06		1,64E+06	3,39E+06	2,86E+06		
	Onder	1,21E+06		1,49E+06	5,73E+06	3,94E+06		

Mycobacterium spp.		genkopieën /l	Experiment 1		Experiment 2			
			Gem	Stdev	gem	stdev		
water	loop 1	watermonster in tank loop 1	1,17E+05	1,38E+04	5,18E+05	3,93E+05		
		watermonster na coupons loop 1	4,34E+05	3,69E+05	1,76E+05	1,11E+05		
		watermonster uit loop 1	5,39E+05	1,16E+05	2,60E+05	2,86E+05		
	Loop 2	watermonster in tank loop 2	1,84E+05	1,13E+05	7,97E+05	7,46E+05		
		watermonster na coupons loop 2	2,48E+05	2,70E+05	3,13E+05	3,14E+05		
		watermonster uit loop 2	3,72E+05	1,73E+05	3,15E+05	2,73E+05		
biofilm	Loop 1	genkopieën /cm2	Experiment 1		Experiment 2			
				gem	stdev	gem	stdev	
			Voor	2,24E+04	3,53E+04	1,84E+04	2,27E+04	
			Achter	7,69E+02	8,21E+02	2,02E+05	3,66E+05	
			Boven	7,03E+02	5,04E+02	2,08E+04	2,15E+04	
			Onder	2,52E+03	4,81E+02	6,54E+04	1,07E+05	
			Loop 2	Voor	2,26E+03	2,90E+03	3,26E+04	4,23E+04
				Achter	7,12E+02	7,78E+02	2,14E+04	2,98E+04
	Boven	2,37E+03		3,11E+03	4,50E+04	5,02E+04		
	Onder	2,22E+03		2,60E+03	8,74E+04	1,32E+05		

Schimmel			Experiment 1		Experiment 2	
			Gem	Stdev	gem	stdev
water	Loop 1	genkopieën /l				
		watermonster in tank loop 1	4,55E+04	1,77E+04	5,09E+04	6,25E+03
		watermonster na coupons loop 1	1,81E+05	1,98E+05	1,17E+05	9,61E+04
	Loop 2	watermonster uit loop 1	2,67E+05	1,96E+05	6,72E+04	5,26E+04
		watermonster in tank loop 2	6,71E+04	4,04E+03	1,18E+05	1,22E+05
		watermonster na coupons loop 2	3,18E+05	3,70E+05	2,10E+05	1,93E+05
biofilm	Loop 1	watermonster uit loop 2	3,45E+05	7,07E+04	7,76E+04	6,05E+04
		genkopieën /cm2				
		Voor	1,34E+03	1,07E+03	3,21E+04	3,61E+04
		Achter	6,43E+03	6,84E+03	3,29E+04	3,18E+04
	Loop 2	Boven	3,79E+03	5,19E+03	3,71E+03	2,65E+03
		Onder	1,05E+04	1,31E+04	2,55E+04	2,60E+04
		Voor	2,84E+04	3,92E+04	1,77E+05	2,03E+05
		Achter	6,94E+03	9,03E+03	4,87E+05	7,98E+05
		Boven	4,01E+03	5,02E+03	5,26E+04	5,65E+04
		Onder	1,23E+04	2,06E+04	9,91E+04	1,10E+05

Legionella spp.			Experiment 1		Experiment 2	
			Gem	Stdev	gem	stdev
water	Loop 1	genkopieën /l				
		watermonster in tank loop 1	1,63E+05	2,25E+05	4,81E+04	4,06E+04
		watermonster na coupons loop 1	3,00E+05	3,12E+05	7,85E+04	9,35E+04
	Loop 2	watermonster uit loop 1	2,28E+05	3,14E+05	7,65E+04	3,09E+04
		watermonster in tank loop 2	1,22E+05	1,51E+05	8,64E+04	1,02E+05
		watermonster na coupons loop 2	2,53E+05	1,80E+05	7,07E+04	9,63E+04
biofilm	Loop 1	watermonster uit loop 2	2,11E+05	2,95E+05	7,42E+04	9,05E+04
		genkopieën /cm2				
		Voor	8,11E+00	1,40E+01	2,16E+04	3,20E+04
		Achter	3,21E+01	4,54E+01	1,28E+04	1,43E+04
	Loop 2	Boven	9,44E+01	9,24E+01	6,85E+03	8,90E+03
		Onder	2,30E+01	3,25E+01	5,17E+04	9,11E+04
		Voor	9,55E+00	1,35E+01	4,96E+03	2,53E+03
		Achter	7,37E+00	1,04E+01	3,89E+04	6,99E+04
		Boven	1,14E+01	1,62E+01	2,52E+04	4,33E+04
		Onder	4,18E+01	6,54E+01	2,15E+03	2,92E+03