



Verwijdering van biofilm van oppervlakten

Resultaten van vrije ruimte project DWB

BTO 2011.024(s)
September 2011

Verwijdering van biofilm van oppervlakten

Resultaten van vrije ruimte project DWB

BTO 2011.024(s)
September 2011

© 2011 KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Colofon

Titel

Verwijdering van biofilm van oppervlakten.
Resultaten van vrije ruimte project DWB

Opdrachtnummer

B111.577-007

Onderzoeksprogramma(`s)

BTO

Projectmanager

Jan Post / Dirk Vries

Opdrachtgever

BTO

Kwaliteitsborger

Dick van der Kooij

Auteurs

Danny Harmsen, Emile Cornelissen

Verzonden aan

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

Inhoud

Inhoud	1	
1	Introductie	3
1.1	Achtergrond/aanleiding	3
1.2	Doel	3
2	Materialen en methoden	5
2.1	Test Opstelling	5
2.2	Experimentele set-up	5
3	Resultaten en discussie	7
3.1	Testcondities	7
3.2	Resultaten en discussie	8
3.2.1	Meetresultaten	8
3.2.2	Berekening verwijdering	9
3.2.3	ATP-verwijdering	10
3.2.4	Verwijdering van koolhydraten en TOC	11
3.2.5	Verwijdering van ATP	11
3.2.6	Betekenis van de resultaten	12
4	Conclusies en aanbevelingen	15
4.1	Conclusies	15
4.2	Aanbevelingen	15
Literatuur	17	
I	Foto's Biofilm verwijdering opstelling	19
II	Berekeningen verwijdering ATP, koolhydraten en TOC	21
III	Statistisch onderzoek	23

1 Introductie

1.1 Achtergrond/aanleiding

Bacteriële adhesie treedt op in waterbehandelingsprocessen (biofouling van membranen, biologisch actieve zand- en koolfiltratie) en in distributie systemen (biofouling van leidingen). Deze bacteriële adhesie is van groot belang bij de functie van biologisch actieve zand- en koolfiltratie, maar resulteert ook in ongewenste effecten in andere processen, zoals een verminderde efficiëntie van waterbehandelingsprocessen, bijvoorbeeld membraanfiltratie, en een verslechtering van de waterkwaliteit in het leidingnet. De verwijdering van biofilm door intensieve langspoeling met water is over het algemeen weinig effectief. Zelfs bij zeer hoge afschuifkrachten wordt beperkte verwijdering van biofilm waargenomen (Sharma *et al.*, 2005). Een alternatieve aanpak is het gebruik van lucht-water spoeling voor de verwijdering van biofilm van oppervlakken. De mate van verwijdering hangt af van (i) de bij het oppervlak gerealiseerde schuifspanning ('shear') door de (lucht-water) spoeling, (ii) de aard van de aangehechte bacteriën en (iii) de eigenschappen van het oppervlak (Sharma *et al.*, 2005; Gomez-Suarez, 2001). Ondanks bemoedigende resultaten bij periodieke toepassing van lucht-water spoeling in spiraalgewonden membraanelementen voor de beheersing van biofouling is de verwijdering van biofilm beperkt (Cornelissen *et al.*, 2007).

Het kwantificeren van de 'shear' bij lucht-water spoeling is niet goed mogelijk. De invloed van hoge 'shear' kan wel onderzocht worden door de waterspoeling onder extreme condities uit te voeren zoals beschreven in dit onderzoek.

1.2 Doel

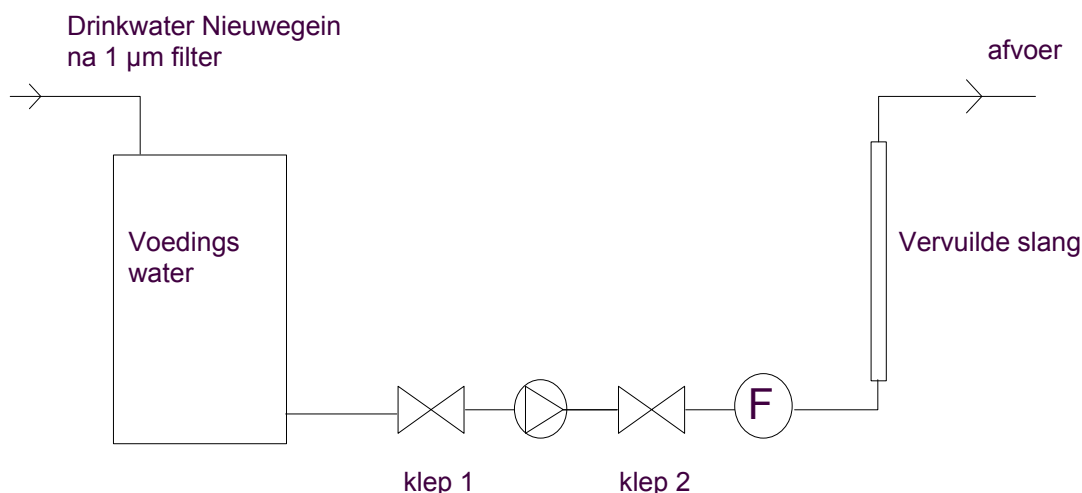
Het doel van het onderzoek is de verwijdering van biofilm vaststellen bij zeer hoge langstroomsnelheden die optreden bij lucht-water spoeling. De bijbehorende afschuifkrachten voor de maximaal mogelijke verwijdering zijn een belangrijk gegeven voor de krachten die kunnen optreden tijdens biofilm verwijdering met water zonder lucht. Door de biofilmverwijdering bij deze afschuifkrachten te meten wordt duidelijk wat de grenzen zijn bij lucht-water spoeling voor het effectief verwijderen van biofilms. Door verbeterde inzichten over biofilm verwijdering kan meer zicht komen op de toepasbaarheid van lucht-water spoeling.

2 Materialen en methoden

2.1 Test Opstelling

Om de invloed van hoge watersnelheden op de verwijdering van biofilm te onderzoeken zijn verkennende testen uitgevoerd met de zogenaamde Biofilmverwijderingsopstelling (BV-opstelling). De opstelling is schematisch weergegeven in Figuur 1. In bijlage I zijn foto's van de BV-opstelling weergegeven. In de opstelling wordt een stuk PVC-P slang met biofilm op het inwendige oppervlak geplaatst. Vervolgens wordt de slang gespoeld door middel van injectie van water onder hoge druk zodat hoge snelheden mogelijk zijn.

Gefiltreerd (1 μm meltblown filters; Van Borselen) drinkwater Nieuwegein wordt vanuit een voedingstank met behulp van een hoge druk pomp (DPVF 32-30, 7,5 l/sec, 45,9m; dp pumps Holland) door de PVC-P slang gevoerd. Voor en na de pomp bevinden zich kleppen die handmatig open en dicht kunnen worden gezet zodat er direct bij de juiste snelheden wordt gespoeld. Tussen de pomp en de slang is een flowmeter geplaatst (Proline promag 50W; E&H) die het debiet registreert. De gegevens van de flowmeter worden continu vastgelegd (5x per seconde).



Figuur 1 Schematische weergave Biofilm Verwijdering opstelling

2.2 Experimentele set-up

PVC-P slangen (lengte 49 cm, inwendige diameter 12 mm) zijn gedurende 6 weken doorstroomd met drinkwater bij een langsstromingsnelheid van 0,37 m/s (150 l/uur, 25 °C) om een biofilm te krijgen waarmee reinigingstesten kunnen worden uitgevoerd. Het drinkwater werd grotendeels gerecirculeerd door de slangen via een buffervat (20 liter) waarvan de watertemperatuur werd geregeld. In dit vat werd vers drinkwater aangevoerd met een debiet van ca. 32 l/h. PVC-P bevat weekmakers die dienen als voedingstof voor biofilmvorming. Nadat de slangen uit de opstelling zijn gehaald, zijn er zowel aan het begin als aan het eind van de slangen 3 ringen van 2 cm lengte afgesneden. Deze ringen dienen als referentie monsters en zijn geanalyseerd op de biomassa (zie Figuur 2A). Met deze biomassawaarden zijn de verwijderingspercentages bij de verschillende behandelingen berekend.

Een segment van 37 cm is vervolgens in de BV opstelling geplaatst. Er zijn in totaal 4 testen uitgevoerd met 4 verschillende PVC-P segmenten. Tijdens de testen is zowel de snelheid als de duur van de

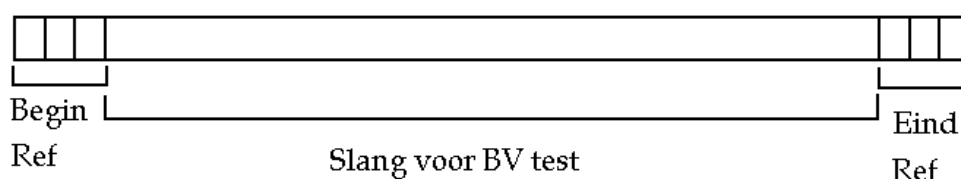
waterspoeling eenmaal veranderd. De ingestelde testcondities zijn weergegeven in Tabel 1. Tijdens de testen was V_{\max} ongeveer 16 m/s. De werkelijke snelheid gedurende de testen is weergegeven in paragraaf 3.1. In de praktijk wordt er gewerkt met spoelsnelheden van 0,1 – 0,2 m/s.

Tabel 1 Testcondities biofilmverwijderingsopstelling

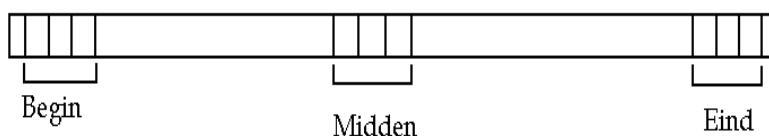
Test	Snelheid	Tijdsduur
	m/s	min
1	8	1
2	8	10
3	16	1
4	16	10

Aan het einde van een test is de slang uit de opstelling gehaald en zijn in het begin, het midden en aan het einde van de slang 3 ringen van 2 cm afgesneden (zie Figuur 2B).

2A



2B



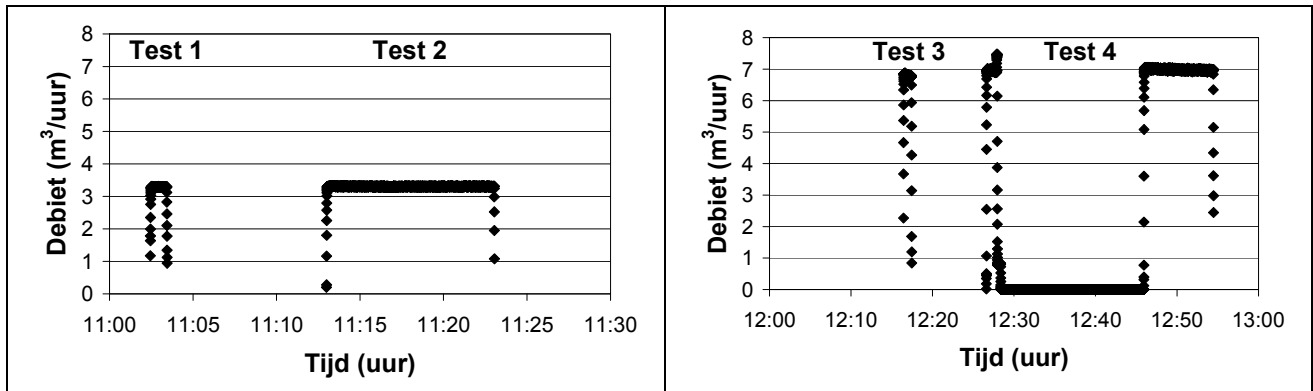
Figuur 2 : monsternamen slangen tijdens BV testen; 2A monsternamen referenties; 2B monsternamen slang na BV test

Alle ringen zijn apart behandeld. De ringen zijn opengesneden en overgebracht in een bekersglas met 40 ml milliQ. Met behulp van een gesteriliseerde elektrische tandenborstel werd de biofilm in suspensie gebracht. Nadat alle biofilm is verwijderd van de ring werden de borstel en de oplossing behandeld gedurende 5 minuten met hoge energie sonicatie (HES). Van de drie ringen, van ieder afzonderlijk monsterpunt (referentie of behandeld), is vervolgens een mengmonster gemaakt. De mengmonsters zijn geanalyseerd op de biomassa concentratie met ATP (LMB-002, reproduceerbaarheid 5,4%), TOC (LAM-068, reproduceerbaarheid 7,2%) en koolhydraten (LAM-075, reproduceerbaarheid 19,6 %).

3 Resultaten en discussie

3.1 Testcondities

In Figuur 3 zijn de gemeten debieten versus de tijdsduur weergegeven voor de verschillende testen.



Figuur 3 Debieten tijdens BV testen

Tijdens test 4, na ongeveer 1 minuut, raakte de slang los van de installatie. De slang is herbevestigd en de test is voortgezet. In totaal heeft de test 10 minuten geduurd. Op basis van Figuur 3 wordt vastgesteld dat de testen zijn uitgevoerd onder de vooraf gestelde condities (paragraaf 2.2, Tabel 1).

Op basis van de geregisterde gegevens zijn de langstroomsnelheden en wandschuifspanningen berekend. De wandschuifspanning in een leiding kan worden afgeleid uit de algemene bewegingsvergelijking en wordt beschreven door vergelijking 1 [Mazijk en van den Boomen, 2002]:

$$\tau = -\rho \cdot R \cdot \left(\frac{\partial u}{\partial t} + g \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) \quad (1)$$

Waarin:

- τ : schuifspanning [N/m²]
- ρ : de dichtheid van het water/sediment-mengsel [kg/m³]
- R : hydraulische straal = $\frac{1}{4}$ *inwendige diameter van de leiding = $\frac{1}{4} D_i$ [m]
- g : gravitatieconstante [m/s²]
- $\frac{\partial u}{\partial t}$: snelheidsgradiënt of te wel “de versnellingsterm” [m/s²]
- $\frac{\partial \varphi}{\partial x}$: de energiegradiënt of te wel de “snelheidsterm” [m/m]
- u : de snelheid [m/s]

Bij een stationaire stroming is de versnellingsterm gelijk aan 0.

De energiegradiënt $\frac{\partial \varphi}{\partial x}$ volgt uit de formule van Chézy (vergelijking 2):

$$\frac{\partial \varphi}{\partial x} = \frac{u^2}{C^2 \cdot R} \quad (2)$$

waarmee

$$\tau = -\rho g \frac{u^2}{C^2} \quad (3)$$

Voor het berekenen van de Chézy-coëfficiënt (C) moeten drie hydraulische condities beschouwd worden:

1. de conditie bij de leidingwand is hydraulisch glad
2. de conditie bij de leidingwand is technisch ruw
3. de conditie bij de leidingwand is hydraulisch ruw.

Welke conditie optreedt hangt af van de wandruwheid van het materiaal (de k -waarde in mm) en van de stroming van het water. Deze stroming kan langs de leidingwand laminair zijn.

Voor het berekenen van de schuifspanning is een spreadsheet gebruikt. Tijdens de berekeningen is uitgegaan van een temperatuur van 13,6 °C (gemeten temperatuur van het water tijdens de testen) en een k -waarde voor de biofilm van 0,05 mm [Blokker, 2011]. Een uitgebreide beschrijving van de gebruikte formules en een voorbeeldberekening is te vinden in BTO2002.01 [Mazijk en van den Boomen, 2002].

Ook is de afschuifsnelheid berekend aan de hand van de volgende formule (bron: Wikipedia^a):

$$\dot{\gamma} = \frac{8v}{d} \quad (6)$$

Met:

$\dot{\gamma}$ = afschuifsnelheid in s^{-1} .

v = lineaire vloeistofsnelheid in m/s.

d = binnendiameter van de pijp in m.

Alle berekeningen zijn weergegeven in Tabel 2

Tabel 2 Langstroomsnelheden, schuifspanningen en afschuifsnelheid in de BV- testen

Test	Gem. Debiet	Langsstroom snelheid	Schuif spanning	Afschuif snelheid
	m^3/uur	m/s	N/m^2	s^{-1}
1	$3,2 \pm 0,32$	$7,9 \pm 0,77$	243 ± 24	5283 ± 516
2	$3,3 \pm 0,07$	$8,1 \pm 0,18$	254 ± 6	5406 ± 121
3	$6,7 \pm 0,70$	$16,4 \pm 1,73$	1016 ± 107	10922 ± 1152
4	$7,0 \pm 0,26$	$17,1 \pm 0,64$	1107 ± 42	11404 ± 428

3.2 Resultaten en discussie

3.2.1 Meetresultaten

Om de verwijdering van biomassa te bepalen door langspoeling met water, zijn biologische parameters gemeten voor en na de Biofilm Verwijdering testen. De resultaten voor ATP, koolhydraten en TOC zijn respectievelijk weergegeven in Tabel 3, Tabel 4 en Tabel 5.

Tabel 3 Resultaten ATP analyses

	ATP (ng/cm ²)			
	v = 7,9 m/s t = 1 min	v = 8,1 m/s t = 10 min	v = 16,4 m/s t = 1 min	v = 17,1 m/s t = 10 min
Ref Begin	450 ± 17	460 ± 20	480 ± 1	421 ± 0,5
Ref Eind	454 ± 3	520 ± 9	405 ± 9	333 ± 3
Begin	517 ± 4	366 ± 8	312 ± 10	311 ± 0,004
Midden	511 ± 3	429 ± 0,2	288 ± 2	279 ± 2
Eind	473 ± 10	451 ± 6	229 ± 4	258 ± 6

Tabel 4 Resultaten Koolhydraten analyses

	Koolhydraten (mg D(+)-glucose/cm ²)			
	v = 7,9 m/s t = 1 min	v = 8,1 m/s t = 10 min	v = 16,4 m/s t = 1 min	v = 17,1 m/s t = 10 min
Ref Begin	0,23	0,18	0,23	0,23
Ref Eind	0,18	0,22	0,19	0,19
Begin	0,20	0,16	0,13	0,15
Midden	0,20	0,16	0,13	0,14
Eind	0,18	0,19	0,13	0,13

Tabel 5 Resultaten TOC analyses

	TOC (mg C/cm ²)			
	v = 7,9 m/s t = 1 min	v = 8,1 m/s t = 10 min	v = 16,4 m/s t = 1 min	v = 17,1 m/s t = 10 min
Ref Begin	0,26	0,14	0,25	0,19
Ref Eind	0,16	0,22	0,14	0,12
Begin	0,19	0,14	0,12	0,14
Midden	0,15	0,17	0,11	0,14
Eind	0,17	0,17	0,11	0,14

Uit de gegevens van de referentie monsters genomen aan het begin en eind van de slang (Tabel 3 tot en met Tabel 5) blijkt dat niet overal dezelfde hoeveelheid biomassa aanwezig was op het inwendige oppervlak van de slangen. Dit was vooraf ook al visueel geconstateerd en op basis van de gemeten ATP (333 - 520 ng/cm²), koolhydraten (0,18 - 0,23 mg/cm²) en TOC (0,12 - 0,26 mg/cm²) concentraties bevestigd. In de slang gebruikt voor test 4 (v=17,1 m/s, t=10 min) was de concentratie van de biofilm lager dan in overige 3 slangen.

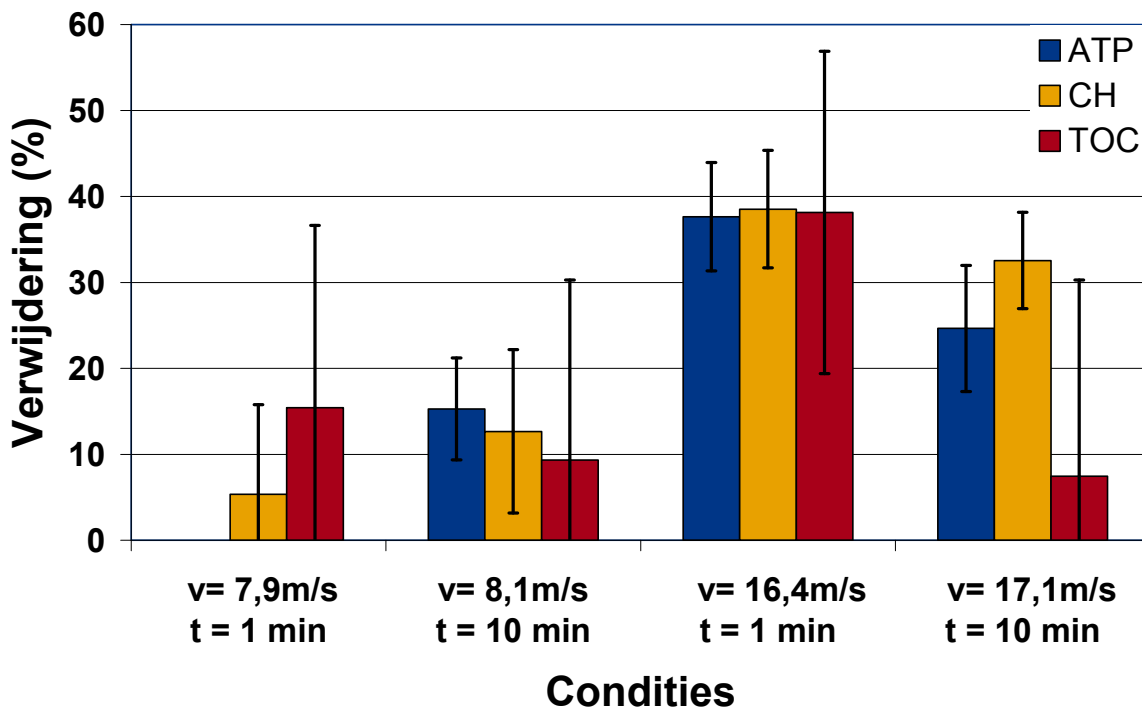
3.2.2 Berekening verwijdering

Aan de hand van de resultaten uit Tabel 3 tot en met Tabel 5 is de verwijdering van ATP, koolhydraten en TOC onder verschillende condities berekend. De berekening is als volgt uitgevoerd. Voor de monsters die zijn genomen aan het begin van de slang is de verwijdering berekend ten opzichte van de referentie aan het begin van de slang. Voor de monsters in het midden van de slang is de verwijdering berekend ten opzichte van de referentie aan het begin en aan het eind van de slang. Voor de monsters die zijn genomen aan het eind van de slang is de verwijdering berekend ten opzichte van de referentie aan het eind van de slang. Alle berekeningen zijn weergegeven in bijlage II.

De verwijdering inclusief de standaarddeviatie van ATP, koolhydraten en TOC onder verschillende condities is weergegeven in Figuur 4.

Om een beter inzicht te krijgen in de betrouwbaarheid van de resultaten is er naast de standaarddeviatie ook een statistisch onderzoek uitgevoerd gebruik makend van de Student t-toets. Hier dient de kanttekening te worden gemaakt dat de toets is uitgevoerd met behulp van een beperkt aantal metingen waardoor de fout/spreiding relatief groot is. Een uitgebreide uitleg van het statistisch onderzoek inclusief de resultaten staan beschreven in bijlage III.

Tijdens de uitgevoerde t-toets is er vanuit gegaan dat de variatie van iedere meting gelijk is (homoscedasticiteit). De hypothese wordt aanvaard wanneer de overschrijdingskans (p-waarde) kleiner is dan 2.5%, oftewel in 97.5% van de gevallen zal de hypothese geldig zijn. De hypothese is dat de procentuele verwijdering na doorstromen groter is dan 0%.



Figuur 4 Verwijdering ATP, koolhydraten en TOC bij verschillende langstroomsnelheden (v) en tijden (t)

3.2.3 ATP-verwijdering

Op basis van ATP blijkt dat bij een langstroomsnelheid van 8 m/s (ca. 20 maal hoger dan bij de biofilmgroei) nauwelijks verwijdering plaatsvond (Figuur 4). Indien gedurende 1 minuut wordt gespoeld bij 8 m/s is er sprake van een niet significant effect; de gemeten ATP concentratie ligt zelfs onder die van de referentie (zie bijlage II). Een verklaring hiervoor is hier niet direct te geven. Het verlengen van de spoeltijd naar 10 minuten heeft een positief effect op de biofilmverwijdering. Er werd significant meer ATP verwijderd, namelijk 15%, echter de verwijdering is nog steeds minimaal. Verhoging van de langstroomsnelheid naar 16 – 17 m/s heeft een positief effect. Bij een spoeltijd van 1

minuut werd 38% van de ATP verwijderd. Verlenging van de spoeltijd bij deze snelheid gaf een lagere verwijdering van 25% ATP te zien. Verlenging van de spoeltijd had bij de hogere langstroomsnelheid dus geen additioneel effect.

Uit Figuur 4 en de statistische analyse in bijlage III kan worden afgeleid dat er een significante verwijdering van biofilm plaatsvond gebaseerd op de resultaten voor ATP bij een langstroomsnelheid van 16 m/s. De duur van de spoeltijd heeft hierbij geen duidelijke bijdrage. Dit wijst erop dat bij de eerste (momentane) verhoging van de 'shear' een laagje biofilm werd verwijderd en dat er daarna niet veel meer gebeurde. Uit Figuur 4 en de statistische analyse in bijlage III lijkt er een significante verwijdering plaats te vinden bij een spoeltijd van 10 minuten op basis van de ATP resultaten bij een lagere langstroomsnelheid van 8 m/s. Met uitzondering van de test bij een langstroomsnelheid van 8 m/s en een spoeltijd van 1 minuut vindt er een significante verwijdering van ATP plaats onder de geteste condities.

3.2.4 Verwijdering van koolhydraten en TOC

Bij een langstroomsnelheid van 8 m/s werd nauwelijks koolhydraten en TOC verwijderd (zie Figuur 4). Op basis van de statistische analyse in bijlage III is het effect voor zowel koolhydraten als TOC niet significant. Kijkend naar de standaard deviatie blijkt dat de waarden van zowel 1 als 10 minuten binnen elkaars onzekerheidsinterval te liggen, waarmee (nogmaals) gesteld mag worden dat er geen significant verschil is in de verwijdering van koolhydraten en TOC bij een langstroomsnelheid van 8 m/s en een spoeltijd van respectievelijk 1 of 10 minuten. Net als bij ATP is de verwijdering voor koolhydraten en TOC bij een spoeltijd van 10 minuten gering. Verhoging van de langstroomsnelheid naar 16 - 17 m/s had een positief effect. Bij een spoeltijd van 1 minuut werd 39% van de koolhydraten verwijderd en 38% van de TOC. Verlenging van de spoeltijd gaf een lagere verwijdering van koolhydraten en TOC te zien, respectievelijk 33% en 7%. De lagere verwijdering, net als bij ATP, is waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat er minder biomassa aanwezig was op de slang die is gebruikt voor deze test (zie Tabel 3 tot en met Tabel 5).

Op basis van de statische analyse in bijlage III en de standaard deviatie voor de verschillende resultaten verkregen met de koolhydraten analyses kan worden afgeleid dat er een significante verwijdering van biofilm plaatsvond bij een langstroomsnelheid van 16 m/s. De duur van de spoeltijd speelde hierbij geen significante rol. Bij de lagere langstroomsnelheid van 8 m/s kan niet met zekerheid worden gezegd of er meer koolhydraten worden verwijderd bij een spoeltijd van 10 minuten, vergeleken met een spoeltijd van 1 minuut, gezien de grote spreiding vallen de resultaten bij een spoeltijd van 1 en 10 minuten binnen elkaars onzekerheidsinterval.

Op basis van de TOC metingen kan in geen van de gevallen een significante uitspraak worden gedaan over het effect van de langstroomsnelheid en de spoeltijd op de verwijdering van biofilm. In het algemeen geldt dat gezien het aantal geringe metingen de spreiding relatief groot is. Om een duidelijk uitspraak over het effect van de langstroomsnelheid en de spoeltijd op de biofilm verwijdering te doen, dienen meer metingen te worden verricht.

3.2.5 Verwijdering van ATP

Gebaseerd op de uitkomsten van de resultaten (Figuur 4) en het statistisch onderzoek (bijlage III) kan worden gesteld dat de verwijdering van ATP en koolhydraten een goed beeld geven van de verwijdering van biofilm bij verschillende langstroomsnelheden en spoeltijden onder de in dit onderzoek uitgevoerde condities. Gezien de grote spreiding van de resultaten van TOC waardoor alle resultaten binnen elkaars onzekerheidsinterval vallen kan aan de hand van de TOC resultaten geen uitspraak worden gedaan over de invloed van de verschillende langstroomsnelheden en spoeltijden onder de geteste condities.

Bij een langstroomsnelheid van 8 m/s vond er nauwelijks verwijdering van biofilm plaats bij een spoeltijd van 1 minuut. Verlenging van de spoeltijd naar 10 minuten heeft een positief effect maar de verwijdering is nog steeds laag (maximaal 15%). Verhoging van de langstroomsnelheid had een positief effect. De verwijdering van biofilm is dan ongeveer 40%. Hierbij maakt het niet uit hoe lang de spoeltijd

is. Maar ook bij de hogere langstroomsnelheden wordt de biofilm nog steeds niet volledig verwijderd. Men kan stellen dat de verwijdering nog steeds beperkt is.

3.2.6 Betekenis van de resultaten

Ondanks zeer hoge afschuifkrachten werd een beperkte verwijdering waargenomen van biofilm van oppervlakken. De resultaten van de uitgevoerde testen bevestigen de resultaten van eerder onderzoek [Sharma *et al.*, 2005] dat zelfs bij zeer hoge afschuifkrachten een beperkte verwijdering van biofilm wordt waargenomen. Testen uitgevoerd door Sharma laten zien dat bij een afschuifsnelheid tussen de 11.000 en 16.000 s⁻¹ een verwijdering van rond de 50% plaatsvond van zogenaamde "voorgehechte aggregaten" met verschillende grootte afhankelijk van het aantal cellen. Het effect van onthechting nam toe van 10-20% bij aggregaat grootte van 1-2 cellen tot >80% bij aggregaat grootte van 5-6 cellen. In dit onderzoek werden eveneens afschuifsnelheden van 11.000 tot 16.000 s⁻¹ toegepast. De verwijdering is sterk afhankelijk van de hydrophobiciteit van het oppervlak de bacterie. Onthechting van *Streptococcus oralis*, een hydrofiel micro-organisme bleek efficiënter te gaan dan de onthechting van *Actinomyces naeslundii* een meer hydrofoob organisme [Sharma *et al.*, 2005]. In het huidige onderzoek is niet specifiek naar bacterie typen gekeken, maar is het effect op een complexere biofilm matrix inclusief extracellulair celmateriaal bepaald. Er blijken qua effectiviteit overeenkomsten te zijn die laten zien dat de micro-organismen zeer sterk zijn gehecht aan oppervlakken.

Een hypothese is dat minimaal een monolaag biofilm aanwezig zal blijven ongeacht de gekozen verwijderingstrategie. Deze hypothese kan in deze studie worden onderzocht door een berekening op basis van de ATP analyses. Na 1 en 10 minuten spoelen met de hoogste langstroomsnelheid was er gemiddeld 275 ng/cm² ATP aanwezig op de gemeten PVC-P buisjes (zie Tabel 3). Dit komt overeen met 5.5x10⁹ cellen/cm², waarbij 10 ng ATP/cm² overeenkomt met 2-4x10⁸ cellen/cm² (van der Kooij *et al.* 2010). Een complete oppervlaktebedekking met bacteriën met een afmeting van 0.5 µm bij 1.0 µm correspondeert met een waarde van 3x10⁷ cellen/cm² (Flemming en Schaule, 1988). Het lijkt op basis van deze berekening dat zelfs na zeer hoge afschuifkrachten een biofilm laag overblijft van meer dan een monolaag dikte. De bovenstaande hypothese kon daardoor niet worden getoetst met de gehanteerde aanpak in dit onderzoek.

Bacteriële adhesie en biofilmvorming resulterend in biofouling spelen een belangrijke rol tijdens het bedrijven van membraansystemen, en leidt tot operationele problemen zoals flux verlies en drukvaltoename en mogelijk tot waterkwaliteitsverlies van het productwater (van der Kooij *et al.* 2010). Een verwijdering van biofilm van (membraan) oppervlakken is daarom gewenst. Een gebruikelijke aanpak voor het verwijderen van biofilm van membraanoppervlakken is regelmatig chemisch reinigen en een alternatieve aanpak is het periodiek toepassen van lucht-water spoeling in spiraalgewonden membraanelementen (Cornelissen *et al.*, 2007). Historische gegevens over verwijdering van biofilm van PVC-P segmenten met (i) waterspoeling, (ii) lucht-water spoeling (1,2 m/s luchtdebiet) en (iii) chemische reiniging met 4% NaOH (1 uur) bij een spoelsnelheid van 0.6 m/s staan vermeld in Tabel 5.

Tabel 6 Resultaten ATP analyses en percentuele verwijdering voor chemische reiniging en lucht-water spoeling van PVC-P segmenten (spoelsnelheid in 0.6 m/s)(Van der Kooij, 2010)

	Referentie	ATP (ng/cm ²)		
		Waterspoeling	Lucht-water spoeling (1,2 m/s lucht)	Chemisch reinigen (1u; 4% NaOH)
Absoluut	31 ± 4	27 ± 2	14 ± 2	0.8 ± 0.1
Percentueel	-	13%	55%	97,5%

Op het PVC-P referentie materiaal trad minder biofilm op dan op de PVC-P segmenten van de in deze studie uitgevoerde testen (respectievelijk gemiddeld 31 ng ATP/cm² en 440 ng ATP/cm²), vermoedelijk als gevolg van een temperatuurverschil van respectievelijk 16°C en 25°C tijdens de biofilmproductie in de PVC slangen. Het effect van waterspoeling bij een geringe spoelsnelheid van 0,6 m/s komt overeen

met de gegevens van de huidige testen bij een spoelsnelheid van 8 m/s (ongeveer 10-20% verwijdering) (vergelijk Figuur 4 en Tabel 5).

Het effect van lucht-water spoeling is significant hoger dan voor spoelsnelheden lager dan 8 m/s, en een ATP verwijdering van 55% werd bereikt in PVC-P segmenten. Een vergelijkbare verwijdering van 57% werd gevonden tijdens lucht-water spoeling van vertikaal geplaatste spiraalgewonden membraanelementen in vergelijking met referentie membraanelementen. Na dosering van 100 µg-C/L natriumacetaat gedurende 4 weken ontstond een biofilm van 47 ng/cm² ATP in het referentie element ten opzichte van een biofilm van 20 ng/cm² ATP in het membraanelement dat dagelijks werd gespoeld met lucht en water (Cornelissen *et al*, 2007). De huidige biofilm verwijderingresultaten met een hoge spoelsnelheid van 16 m/s komen overeen met de verwijderingresultaten met lucht-water spoeling, respectievelijk 38% (na 1 minuut spoelen) en 55%. Er blijken qua effectiviteit overeenkomsten te zijn die laten zien dat gehechte micro-organismen zeer sterk zijn gehecht aan oppervlakken die met hoge afschuifkrachten door (i) hoge spoelsnelheden of (ii) lucht-water spoeling moeilijk kunnen worden verwijderd. De effectiviteit van lucht-water spoeling in de praktijk, ondanks beperkte verwijdering van de biofilm, wordt gezocht in (i) het uitspoelen van deel van de biofilm in membraanelementen die gemakkelijk te verwijderen is (bijvoorbeeld de streamers in het voedingskanaal) in combinatie met (ii) het relatief grote (meer dan proportioneel) effect van de biofilm verwijdering op de drukval in het voedingskanaal.

In de praktijk wordt chemische reiniging toegepast om membraanvervuiling te beheersen. Het effect van 1 uur reinigen met een 4-gew.% NaOH oplossing leidde tot een ATP 'verwijdering' van 97,5% (zie Tabel 5). Het is echter bekend dat chemisch reinigen biofilm afdoodt maar niet noodzakelijkerwijs verwijdert (Vrouwenvelder and Van Der Kooij 2001). Een combinatie van afdoding met chemicaliën en effectieve verwijdering van (afgedode) biofilm met hoge afschuifkrachten bijvoorbeeld hoge spoelsnelheden of lucht-water spoeling lijkt een interessante oplossingsrichting.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

Op basis van de uitgevoerde testen kan het volgende worden geconcludeerd.

- Gebruik makend van een langstroomsnelheid van 8 m/s (bij een spoeltijd van 1 minuut zal er nauwelijks biofilm worden verwijderd.
- Verhoging van de spoeltijd naar 10 minuten bij een langstroomsnelheid van 8 m/s heeft een beperkt positief effect bij deze snelheid. Gebaseerd op ATP analyses is een significante, maar geringe verwijdering (10-15%) van biofilm waargenomen.
- Een langstroomsnelheid van 16 – 17 m/s en een spoeltijd van 1 minuut gaf een significante biofilm verwijdering van ongeveer 40%.
- Verhoging van de spoeltijd naar 10 minuten bij een langstroomsnelheid van 16 – 17 m/s had geen additioneel effect op de verwijdering van biofilm.
- De waargenomen verwijdering ligt in dezelfde orde van grootte als bepaald voor gehechte reïnculturen bij vergelijkbare afschuifsnelheden.
- De analysemethoden ontwikkeld voor de laboratoriumtesten om reinigingssystemen te beoordelen (biofilm groei en meting) zijn goed toepasbaar gebleken bij dit onderzoek.

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat spoelen met (i) “zeer” hoge langstroomsnelheden of (ii) lucht-water niet afdoende is om alle biofilm te verwijderen. Dit laatste is echter niet noodzakelijk om een positief effect te hebben in membraanelementen in de praktijk.

4.2 Aanbevelingen

De onderzoeksbehoefte ten aanzien van praktijkproblemen met de verwijdering van biofilm van oppervlakken kan op basis van dit rapport worden samengevat als:

- Studie naar lange duureffecten van het periodiek gebruik van hoge spoelsnelheden en/of lucht-water spoeling op de (gedeeltelijke) verwijdering van biofilm van oppervlakken (specifiek voor membranen). Hierbij dient gelet te worden op het ontstaan van een biofilm die zeer slecht te verwijderen is, en mogelijk een negatieve invloed heeft op de energiebehoefte van membranen (als gevolg van daling van membraanpermeabiliteit en/of drukvalstijging);
- Onderzoek naar de synergie tussen (periodieke) chemische reiniging en mechanische reiniging voor respectievelijk inactivatie en verwijdering van biofilm;
- Studie naar de effecten van gedeeltelijke verwijdering van periodieke mechanische reiniging (hoge spoelsnelheden en/of lucht-water spoeling) op de bedrijfsvoering van processen waarbij bacteriële adhesie een negatief effect heeft (bijvoorbeeld biofouling in membraanelementen).

Eventueel aanvullend wetenschappelijke onderzoek op het gebied van verwijdering van biofilm van oppervlakken met hoge langstroomsnelheden of lucht-water worden samengevat als:

- Onderzoek naar de invloed van de eigenschappen van (i) de biofilm (ouderdom, samenstelling, combinatie met metaalhydroxiden), (ii) het hechtingsoppervlak (type, ruwheid, lading), (iii) de watermatrix (samenstelling pH, temperatuur) en (iv) de invloed van de bellengrootte bij inbreng van lucht (bij lucht-water spoeling);
- Inzetten van moleculaire biologische technieken (bijvoorbeeld Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP) en DNA technieken) voor de identificatie van sterk hechtende bacteriën. Dit met als doel om de ontwikkeling van deze bacteriën vast te stellen als gevolg van het periodiek gebruik van hoge spoelsnelheden en/of lucht-water spoeling.

Literatuur

- Blokker M., persoonlijke communicatie, 2011
- Van den Boomen M. en van Mazijk A., Zelfreinigend vermogen, BTO 2002.001
- Cornelissen, E.R., J.S. Vrouwenvelder, S.G.J. Heijman, X.D. Viallefont, D. Van Der Kooij and L.P. Wessels, Periodical air/water cleaning for control of biofouling in spiral wound membrane elements, *J. Membrane Sci.* 287, 94-101, 2007.
- Flemming, H.C. en G. Schaule, Untersuchungen zum Biofouling an Umkehrosiose- und ultrafiltration-Membranen. *Vom Wasser* 71:207-223, 1988.
- Gomez-Suarez, C., H.J. Busscher and H. van der Mei, Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air/liquid interfaces, *Appl. Environ., Microbiol.* June, 2531-2537, 2001.
- Sharma, P.K., M.J. Gibcus, H.C. van der Mei and H.J. Busscher, Influence of fluid shear and microbubbles on bacterial detachment from a surface, *Appl. Environ., Microbiol.* July, 3668-3673, 2005.
- Van Oss, C.J. *Interfacial forces in aqueous media*, 2nd ed., CRC Press, London, 2006.
- Van der Kooij, D., Hijnen, W. A. M., and Cornelissen, E. R. (2010). *Biofouling of Spiral-Wound Membranes in Water Treatment*, Water Research Foundation, Denver, Colorado.
- Vrouwenvelder, J. S., and Van Der Kooij, D. (2001). "Diagnosis, prediction and prevention of biofouling of NF and RO membranes." *Desalination*, 139(1-3), 65-71.
- Wikipedia^a: http://en.wikipedia.org/wiki/Shear_rate
- Wikipedia^b: <http://en.wikipedia.org/wiki/T-toets>

I Foto's Biofilm verwijdering opstelling



Figuur 5 Foto's Biofilm verwijdering opstelling

II Berekeningen verwijdering ATP, koolhydraten en TOC

Tabel 7 Verwijdering ATP

ATP				
	7,9 m/s	8,1 m/s	16,4 m/s	17,1 m/s
	1 min	10 min	1 min	10 min
Ref begin	450261	459893	479580	420779
Ref eind	453710	520440	405346	332532
Begin	517423	366315	312442	310768
Midden	511112	428879	287523	278840
Eind	472666	451037	228952	257504

Verwijdering ATP (%)				
	7,9 m/s	8,1 m/s	16,4 m/s	17,1 m/s
	1 min	10 min	1 min	10 min
Begin	-15	20	35	26
Midden-eind	-13	18	29	16
Midden-begin	-14	7	40	34
Eind	-4	13	44	23

Tabel 8 Verwijdering koolhydraten

CH				
	7,9 m/s	8,1 m/s	16,4 m/s	17,1 m/s
	1 min	10 min	1 min	10 min
Ref begin	0,2296	0,1755	0,2295	0,2274
Ref eind	0,1847	0,2237	0,1879	0,1905
Begin	0,1999	0,1639	0,1288	0,1454
Midden	0,2017	0,1639	0,1255	0,1437
Eind	0,1816	0,1908	0,1270	0,1281

Verwijdering CH (%)				
	7,9 m/s	8,1 m/s	16,4 m/s	17,1 m/s
	1 min	10 min	1 min	10 min
Begin	13	7	44	36
Midden-eind	-9	27	33	25
Midden-begin	12	7	45	37
Eind	2	15	32	33

Tabel 9 Verwijdering TOC

TOC				
	7,9 m/s	8,1 m/s	16,4 m/s	17,1 m/s
	1 min	10 min	1 min	10 min
Ref begin	0,2566	0,1395	0,2500	0,1933
Ref eind	0,1577	0,2191	0,1419	0,1230
Begin	0,1877	0,1366	0,1167	0,1415
Midden	0,1474	0,1674	0,1103	0,1400
Eind	0,1658	0,1664	0,1106	0,1363

Verwijdering TOC (%)				
	7,9 m/s	8,1 m/s	16,4 m/s	17,1 m/s
	1 min	10 min	1 min	10 min
Begin	27	2	53	27
Midden-eind	7	24	22	-14
Midden-begin	43	-20	56	28
Eind	-5	24	22	-11

III Statistisch onderzoek

De hypothese is dat de procentuele verwijdering na doorstromen groter is dan 0%. De verwijdering is berekend als het procentuele verschil van de meting na doorstromen ten opzichte van de referentiemeting. Voor de referentiemeting wordt uitgegaan van de referentie die het dichtst bij het gemeten monster zit (bv. Bij monster begin slang referentie begin slang). Voor het midden van de slang wordt het verschil ten opzichte van het begin en ten opzichte van het eind van de slang berekend. Zo zijn er voor iedere stromingsconditie 4 meetpunten. Het gemiddelde wordt hiervan berekend als een gewogen gemiddelde, waarbij de twee metingen van het midden voor de helft meetellen. En de onzekerheid wordt berekend aan de hand van de standaard deviatie van alle 4 meetpunten. Op deze manier wordt de variatie in de meetdata goed meegenomen. De significantie wordt bepaald aan de hand van de student t-toets.

Een t-toets is een parametrische statistische toets die onder andere gebruikt kan worden om na te gaan of het (populatie-)gemiddelde van een normaal verdeelde grootte afwijkt van een bepaalde waarde, dan wel of er een verschil is tussen de gemiddelden van twee groepen in de populatie. Met behulp van een t-toets kan men dan een overschrijdingskans of een betrouwbaarheidsinterval bepalen (bron wikipedia^b). Bij deze t-toets is er vanuit gegaan dat de variatie van iedere meting gelijk is (homoscedasticiteit), en dat er een enkelzijdige overschrijding (one-tailed test) plaatsvindt.

Uit het gemiddelde (μ) en standaarddeviatie (σ) wordt de toetsingsgrootte T berekend:

$$T = \frac{\mu - 0}{\sigma} \sqrt{n}$$

met n het aantal metingen (=4). Hieruit wordt aan de hand van tabellen de overschrijdingskans (p-waarde) berekend. De hypothese wordt aanvaard wanneer de overschrijdingskans kleiner is dan 2.5%, oftewel in 97.5% van de gevallen zal de hypothese geldig zijn.

Resultaten t-toets

Tabel 10 Resultaten t-toets

ATP	verwijdering	standard deviatie	Student t-waarde	Overschrijdings kans	Hypothese aanvaard?
	%	%	t	$p < 0,025$	H
v= 7,9m/s t = 1 min	-11	5	-4,4	0,989	0
v= 8,1m/s t = 10 min	15	6	5,2	0,007	1
v= 16,4m/s t = 1 min	38	6	11,9	0,001	1
v= 17,1m/s t = 10 min	25	7	6,7	0,003	1

Koolhydraten	verwijdering	standard deviatie	Student t-waarde	Overschrijdings kans	Hypothese aanvaard?
			t	$p < 0,025$	H
v= 7,9m/s t = 1 min	5	10	1,0	0,189	0
v= 8,1m/s t = 10 min	13	10	2,7	0,038	0
v= 16,4m/s t = 1 min	39	7	11,3	0,001	1
v= 17,1m/s t = 10 min	33	6	11,6	0,001	1

TOC	verwijdering	standard deviatie	Student t-waarde	Overschrijdings kans	Hypothese aanvaard?
			t	$p < 0,025$	H
v= 7,9m/s t = 1 min	15	21	1,5	0,121	0
v= 8,1m/s t = 10 min	9	21	0,9	0,220	0
v= 16,4m/s t = 1 min	38	19	4,1	0,013	1
v= 17,1m/s t = 10 min	7	23	0,7	0,280	0

nr_samples	4	%
hypothese afname groter dan:	0	
criterium overschrijdingskans (alpha)	0,025	

