

A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size, with some being significantly larger than others, and they are interconnected in a complex, non-linear fashion.

Bedrijfstakonderzoek
BTO 2022.028 | Mei 2022

**Verwijdering van
natuurlijke en
pathogene virussen
tijdens
drinkwaterproductie**

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Verwijdering van natuurlijke en pathogene virussen tijdens drinkwaterproductie

BTO 2022.028 | Mei 2022

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

Opdrachtnummer

402045-101

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

Auteurs

dr. ir. Nikki van Bel, dr. Luc Hornstra

Kwaliteitsborger

prof. dr. Gertjan Medema

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Natuurlijke virussen, pathogene virussen, ultrafiltratie, duinpassage, BTO

Jaar van publicatie
2022

Meer informatie
dr. ir. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR

Mei 2022 ©

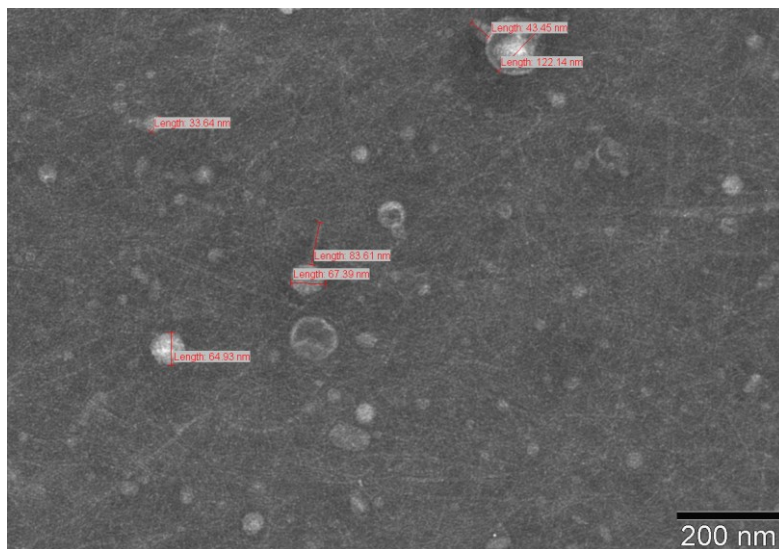
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Verwijdering van natuurlijke en pathogene virussen tijdens drinkwaterproductie

Auteurs dr. ir. Nikki van Bel, dr. Luc Hornstra.

Virusindicatoren worden ingezet om te bepalen hoe goed drinkwaterproductieprocessen in een full scale proces virussen verwijderen of inactiveren. De gebruikelijke virusindicatoren (zoals somatische colifagen en F-specifieke RNA-fagen) zijn in te lage concentraties aanwezig in het ruwe water om nauwkeurige resultaten te geven. Deze studie toont aan dat alternatieve indicatorvirussen, die van nature in hogere concentraties voorkomen, beter kunnen dienen om de virusverwijdering of -inactivatie door zuiveringsprocessen te kwantificeren. Deze alternatieve indicatorvirussen zijn bijvoorbeeld Pepper Mild Mottle Virus [PPMoV], CrassPhage en de natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314. Omdat bij dit onderzoek geen ziekteverwekkende virussen werden aangetroffen, was het niet mogelijk het gedrag van de nieuwe indicatorvirussen te vergelijken met dat van ziekteverwekkende virussen. Wel blijken ze even groot als veel ziekteverwekkende virussen (tussen 30 en 100 nm). De studie toont dat schade aan virussen door UV-desinfectie met de alternatieve virussen nog niet goed kan worden aangetoond, al zijn hiervoor mogelijk wel alternatieve detectiemethoden in het laboratorium beschikbaar die ook de schade aan indicatorvirussen door UV duidelijker zichtbaar te maken.



Een electronenmicroscopie opname van van nature voorkomende virussen in oppervlaktewater.

Belang: Verwijdering van ziekteverwekkende virussen

Ruw oppervlaktewater bevat veel ziekteverwekkende micro-organismen die moeten worden verwijderd of geïnactiveerd om het water veilig te kunnen drinken. Virussen worden, vanwege hun geringe grootte en persistentie, minder goed verwijderd dan bacteriën

en parasieten. De verwijdering van ziekteverwekkende virussen kan in een full scale drinkwaterproductielocatie niet worden gemeten vanwege de lage concentratie in ruw water. Daarom worden in plaats daarvan de hoeveelheden indicatorvirussen gemeten, maar ook deze zijn meestal in te lage concentratie aanwezig om te

helpen bepalen hoe goed ze worden verwijderd door de verschillende zuiveringsprocessen in de hele zuiveringstrein. Tot nu werden indicatorvirussen (somatische colifagen en F-specifieke RNA-fagen) vooral gebruikt om de verwijdering van virussen door membraanfiltratie te bepalen. Recent ontdekte indicatorvirussen bieden potentieel nieuwe mogelijkheden om virusverwijdering in een full scale zuivering te meten omdat ze van nature al in hogere concentraties voorkomen in ruw water. Het gaat daarbij bijvoorbeeld om Pepper Mild Mottle Virus [PPMoV], CrassPhage en de natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314. Het is van belang deze indicatorvirussen beter te karakteriseren en te onderzoeken of ze bruikbaar zijn om in te zetten bij het bepalen van de verwijdering door oppervlaktewaterzuiveringen.

Aanpak: Gedrag van virussen in de zuivering

Om de verwijdering van ziekteverwekkende virussen goed te kunnen bepalen is het belangrijk dat de eigenschappen van de gekozen indicatorvirussen lijken op die van de ziekteverwekkende virussen. Van de nieuwe indicatorvirussen zijn deze eigenschappen nog niet bekend. Daarom is in deze studie van een aantal nieuwe indicatorvirussen de grootte bepaald door middel van stapsgewijze filtratie door membranen met een steeds kleinere poriëgrootte. Daarnaast is bepaald hoe gevoelig de nieuwe indicatorvirussen zijn voor UV desinfectie. Bij twee locaties voor oppervlaktewaterzuivering zijn groot-volume- monsters genomen, om te kunnen bepalen hoe indicatorvirussen en ziekteverwekkende virussen zich gedragen in de zuiveringsprocessen.

Resultaten: Virusverwijdering door zuiveringsprocessen nu meetbaar

Het onderzoek laat zien dat de nieuwe indicatorvirussen in hoge concentratie voorkomen in het ruwe water, en dat van een aantal van deze indicatorvirussen na elk opvolgend proces in de zuivering de aanwezigheid nog steeds kan worden gemeten. Dit geeft een beter beeld van de virusverwijdering door sedimentatie/coagulatie/snefiltratie en door UF en RO filtratie. Dit betekent concreet dat de virusverwijderingscapaciteit van de afzonderlijke zuiveringsprocessen op een full scale

productielocatie kan worden vastgesteld. Daarnaast kunnen een aantal indicatorvirussen dienen als indicator voor fecale verontreiniging, waarbij ze in lagere concentraties kunnen worden aangetoond dan bacteriële indicatoren *E. coli* en enterococci en dus een gevoeliger detectiemethode bieden. Ondanks de groot-volume-monsters zijn in deze studie geen ziekteverwekkende virussen aangetroffen en kon dus het gedrag van indicatorvirussen en ziekteverwekkende virussen niet worden vergeleken. De relatie tussen de verwijdering van indicatorvirussen en ziekteverwekkende virussen blijft daarmee een aandachtspunt voor toekomstig onderzoek. Van een aantal alternatieve virussen, waar nog geen fysische informatie van bekend is, is wel bepaald dat ze tussen de 30 en 100 nm groot zijn. Veel voor de mens ziekteverwekkende virussen vallen ook binnen deze range. Schade aan virussen door UV-desinfectie kan op dit moment niet goed worden aangetoond met de indicatorvirussen, maar er zijn mogelijkheden om met alternatieve detectiemethoden in het laboratorium ook de schade aan indicatorvirussen door UV duidelijker zichtbaar te maken.

Toepassing: Virusverwijdering vaststellen in een full scale drinkwaterproductielocatie

De nieuwe indicatorvirussen kunnen gemakkelijker, en daardoor ook goedkoper en betrouwbaarder gemeten worden na zuiveringsprocessen omdat ze in veel hogere concentraties in ruw oppervlaktewater voorkomen. Dit biedt de mogelijkheid om de virusverwijdering per zuiveringsproces beter te begrijpen en beter te monitoren. Het is daardoor ook mogelijk sneller in te grijpen, wanneer de vereiste virusverwijdering niet wordt gehaald. Daarnaast kunnen de nieuwe virusindicatoren met een humaan fecale herkomst snel een indicatie geven van de fecale verontreiniging van oppervlaktewater door mensen/huishoudelijk afvalwater.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Verwijdering van natuurlijke en pathogene virussen tijdens drinkwaterproductie* (BTO 2022.028).

Inhoud

Rapport	2
<i>Managementsamenvatting</i>	3
Inhoud	6
1 Inleiding	8
1.1 Aanleiding	8
1.2 Alternatieve indicatorvirussen en natuurlijke virussen	8
1.2.1 NV2247, NV2303, NV2310, NV2314	8
1.2.2 Pepper Mild Mottle Virus	9
1.2.3 crAssphages	9
1.2.4 Somatische colifagen	9
1.2.5 Enterovirus	10
1.2.6 Adenovirus 40/41	10
1.2.7 Norovirus GI/GII	10
1.3 Doel	11
1.4 Opzet onderzoek	11
2 Materiaal en methoden	12
2.1 Bepaling grootte natuurlijke virussen	12
2.2 UV behandeling	12
2.3 Monsternamenpunten productielocaties Andijk, Heemskerk, Wijk aan Zee en De Gavers	13
2.4 Microbiologische analyses	16
2.4.1 Concentreren en opwerken watermonsters	16
2.4.2 Detectie virussen	16
2.4.3 MS2 bacteriofagen en somatische colifagen	17
3 Karakterisatie natuurlijke virussen	18
3.1 UV desinfectie	18
3.2 Bepaling van de virus grootte	20
4 Verwijdering natuurlijke en pathogene virussen tijdens drinkwaterproductie	22
4.1 De Gavers	22
4.2 Monsterlocaties van PWN	24
5 Discussie	28
5.1 Het meten van UV schade aan virussen en bacteriofagen.	28

5.2	Samenvatting van de resultaten van virusverwijdering door zuiveringsprocessen bij De Gavers en locaties van PWN.	30
6	Conclusies en aanbevelingen	32
6.1	Conclusies	32
6.1.1	Conclusies over viruseigenschappen	32
6.1.2	Conclusies over het meten van de virusverwijdering door zuiveringsprocessen	32
6.2	Aanbevelingen	33
7	Referenties	34
I	Aanvullende informatie UV-experimenten	36
	Germicidal fluence berekening	36
	Berekening 'Petri Factor'	36
	Germicidal fluence berekening	38
	Berekening 'Petri Factor'	39
	Water absorptie	39
	Berekening 'Sensor factor'	41

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Oppervlaktewater is een belangrijke bron voor de productie van drinkwater, maar moet gezuiverd worden om onder andere de pathogene micro-organismen eruit te halen. De mate van zuivering die nodig is om drinkwater te produceren is afhankelijk van de hoeveelheid pathogenen in het ruwe water en het wettelijk vastgesteld infectierisico van 1 infectie per 10.000 mensen per jaar. Dit lage infectierisico betekent dat de concentraties pathogene micro-organismen in het geproduceerde drinkwater zo laag zijn dat ze niet meer gemeten kunnen worden. Daarom wordt gebruik gemaakt van de Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD) om te berekenen of de zuivering aan het infectierisico voldoet.

Voor het uitvoeren van de AMVD is informatie nodig over i) de concentratie pathogenen in het ruwe water, ii) de verwijderingscapaciteit van de individuele zuiveringsstappen, iii) dosis-respons relatie van elke pathogeen voor mensen en iv) de waterconsumptie. De verwijderingscapaciteit van zuiveringsstappen is in de praktijk moeilijk te bepalen omdat de concentratie pathogenen in het ruwe water vaak al erg laag zijn. Daarom wordt vaak gebruik gemaakt van indicatororganismen, zoals somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen als indicator voor virussen. Deze bacteriofagen zijn makkelijker te meten en de concentraties in oppervlaktewater zijn hoger dan die van pathogene virussen. De concentratie is echter vaak nog te laag om de verwijderingscapaciteit van de verschillende zuiveringsstappen goed te kunnen bepalen.

Een alternatief voor metingen in full-scale zuiveringen is om gebruik te maken van proefopstellingen waarmee onder gecontroleerde condities verwijdering van pathogenen of indicator organismen van een specifieke zuiveringsstap kan worden bepaald. Hierbij kunnen hogere concentraties pathogenen en/of indicator organismen gedoseerd worden om zo de verwijderingscapaciteit van het bewuste proces te bepalen. Nadeel van deze methode is dat een opstelling moet worden gebouwd die in alle aspecten het full-scale zuiveringsproces zo goed mogelijk nabootst. Afwijkingen hierin kunnen leiden tot andere verwijderingscapaciteiten dan de realiteit van een full-scale zuiveringsproces.

De verwijderingscapaciteit van full-scale processen kan ook bepaald worden door niet-humane virussen te gebruiken die in het oppervlaktewater aanwezig zijn. Dit worden natuurlijke virussen genoemd en zijn bijvoorbeeld plant-pathogene virussen of bacteriofagen. Internationale literatuur (1, 2) en eerder BTO-onderzoek (3, 4) heeft laten zien dat meerdere van dit soort virussen in hoge concentratie voorkomen in oppervlaktewater en geschikt lijken te zijn om de verwijderingscapaciteit van de drinkwaterzuivering te bepalen (2, 5-7).

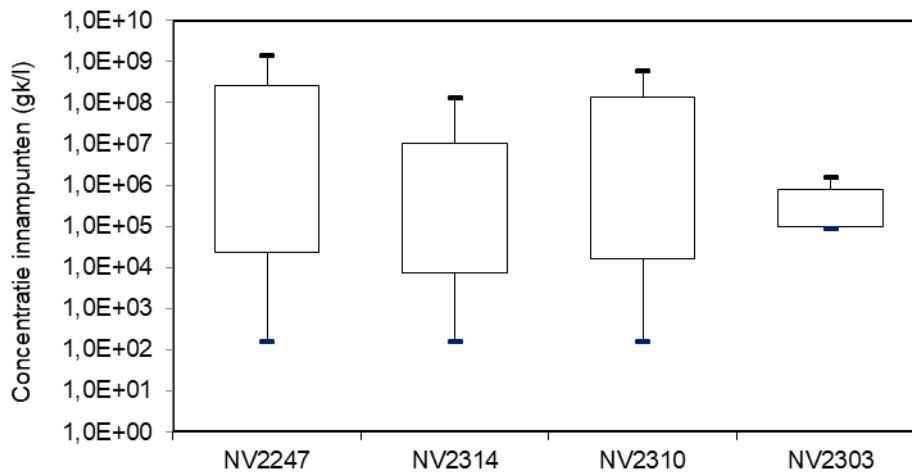
1.2 Alternatieve indicatorvirussen en natuurlijke virussen

In dit onderzoek worden verschillende bacteriofagen, humane en niet-humane virussen gebruikt om de verwijdering in full-scale zuiveringsprocessen te bepalen. Hieronder worden deze virussen en bacteriofagen kort beschreven.

1.2.1 NV2247, NV2303, NV2310, NV2314

De natuurlijke virussen NV2247, NV2303, NV2310, NV2314 zijn in eerder BTO-onderzoek ontdekt (3). In vervolgonderzoek zijn specifieke detectiemethoden met de qPCR methode ontwikkeld (4). Van deze virussen is niet bekend wat voor soort virussen het zijn, al laat een vergelijking van de sequentie met een database zien dat drie

van de vier virussen waarschijnlijk bacteriofagen zijn (Tabel 1). De natuurlijke virussen zijn meestal in hoge aantallen (ongeveer $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ genkopieën/l) aanwezig in oppervlaktewateren (Figuur 1).



Figuur 1. Concentratie natuurlijke virussen in ruw water (oppervlaktewater). Resultaten zijn afkomstig uit verschillende studies.

1.2.2 Pepper Mild Mottle Virus

Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) is een plantvirus dat paprika's infecteert (6). Door de consumptie van paprika's door mensen is het virus ook in grote aantallen aanwezig in feces en dus in rioolwater en oppervlaktewater. Hierdoor kunnen deze virussen gebruikt worden als indicator voor virussen afkomstig uit (humane) fecale verontreiniging. Een mogelijk nadeel van PMMoV is dat de grootte, vorm en lading van PMMoV anders is dan die van humane virussen. Zo is PMMoV staafvormig (rod-shaped) en heeft het een grootte van 17×300 nm (Tabel 1). Dit in tegenstelling tot humane virussen die vaak min of meer rond (icosahedrisch) zijn. Een aantal studies heeft gekeken naar de verwijdering van PMMoV tijdens drinkwaterproductie en deze vergeleken met de verwijdering van pathogene virussen ((8, 9) en reviewed in (6)): zo is afsterving van PMMoV in water langzamer dan dat van pathogene virussen, maar lijkt verwijdering tijdens membraanfiltratie (in een laboratoriumsetting) min of meer vergelijkbaar met verschillende pathogene en indicator virussen.

1.2.3 crAssphages

De crAssphages zijn bacteriofagen die *Bacteroides* bacteriën kunnen infecteren en zich daarin vermenigvuldigen. De *Bacteroides*, en daarmee ook crAssphages, komen voor in het maag-darmstelsel van mensen, waardoor de crAssphages gebruikt kunnen worden als indicator voor virussen afkomstig uit (humane) fecale verontreiniging (1, 2). Eén van de voordelen van crAssphage als fecale virus indicator is dat dit algemeen voorkomt in menselijke darmen en dus ontlasting en wel in de hoogste concentraties van alle fagen. Daarmee zijn de aantallen in rioolwater ook hoger dan die van humane virussen en colifagen. crAssphages zijn ± 77 nm in diameter met een staart van ± 36 nm (10, 11) (Tabel 1). Daarnaast resulteert filtratie van een watermengsel met crAssphage over een $0,1 \mu\text{m}$ in een gedeeltelijke verwijdering (11). Momenteel is er alleen een qPCR-methode beschikbaar voor detectie van crAssphages, al zijn in de wetenschappelijke literatuur de eerste stappen gezet om ook een kweek-gebaseerde methode te ontwikkelen.

1.2.4 Somatische colifagen

Somatische colifagen worden vaak gebruikt als virale indicator voor fecale besmetting van water (Tabel 1). Colifagen zijn virussen die *E. coli* bacteriën infecteren en zich vervolgens in de *E. coli* vermeerderen. Omdat de concentratie *E. coli* bacteriën hoog is in het maag-darmstelsel van zoogdieren, en dus in feces, zijn ook de aantallen somatische colifagen hoog. Somatische colifagen komen nagenoeg alleen via feces van mensen en dieren in het

milieu terecht en kunnen zich daarna niet of nauwelijks meer vermeerderen vanwege de te lage *E. coli* en coliformen concentraties. De concentraties in oppervlaktewater variëren sterk, maar kunnen redelijk hoog zijn ($0 - 1 \times 10^5$ pve/l) (12) waardoor in principe verwijdering tijdens de eerste stappen van de drinkwaterproductie gemeten kan worden.

1.2.5 Enterovirus

De enterovirussen zijn kleine (30 – 32 nm, Tabel 1), min of meer ronde virussen. Het zijn humane, pathogene virussen waarvan in het Drinkwaterbesluit staat vermeld dat deze elke drie jaar in het laatste open water, voor de drinkwaterproductie, gemeten moeten worden. Deze 3-jaarlijkse metingen worden gebruikt voor het uitvoeren van de AMVD (Algemene Microbiologische Veiligheid Drinkwater). De concentratie kweekbare enterovirussen in oppervlaktewater is vaak erg laag (<1 pve/l, (13)) en is vaak nog lager in het laatste open water dat voor drinkwaterproductie wordt gebruikt. Met de moleculaire qPCR-methode zijn de gevonden concentraties vaak hoger, maar hiermee wordt zowel RNA van infectieuze als niet-infectieuze enterovirussen gedetecteerd.

1.2.6 Adenovirus 40/41

De adenovirussen zijn middelgroot (70 – 90 nm, Tabel 1) en zijn zeer resistent tegen UV-desinfectie. Het zijn humane, pathogene virussen die soms als alternatief voor enterovirussen in de AMVD worden gebruikt, met name als de hoofdesinfectie uit UV bestaat. Detectie van Adenovirus in water is mogelijk met een op MPN gebaseerde celkweek-methode en een resultaat is na ongeveer twee weken bekend, maar niet alle Adenovirussen groeien goed op de cellen. Adenovirus (alle of 40/41) kan ook met moleculaire technieken, de qPCR methoden, worden gemonitord, waarmee het DNA van infectieuze en niet-infectieuze adenovirussen wordt gedetecteerd.

1.2.7 Norovirus GI/GII

Norovirussen zijn net als de enterovirussen kleine, ronde virussen (23 – 40 nm, Tabel 1). Ze zijn zeer besmettelijk en kunnen o.a. via water worden overgedragen. Voor het bepalen van de concentratie is recent een kweekmethode beschikbaar gekomen, maar die is nog niet breed beschikbaar en hiermee kan nog niet de concentratie worden bepaald. Daarom wordt de concentratie in water bepaald met de qPCR methode waarmee het virus RNA wordt gedetecteerd. De concentratie in rivierwater varieert sterk tussen $1 \times 10^0 - 1 \times 10^5$ genkopieën/l (13).

Tabel 1. Karakteristieken van bacteriofagen, humane en niet-humane virussen die in dit onderzoek gebruikt worden. gg: geen gegevens

	Herkomst	Capside	Genoom	Grootte
Somatische colifagen	Bacteriofaag	Icosahedrisch met 'staart'	dsDNA	Divers (ong. 50 x 300 nm)
MS2	F+ Bacteriofaag	Icosahedrisch	ssRNA	23-28 nm
Enterovirus	Humaan virus	Icosahedrisch	ssRNA	30 – 32 nm
Adenovirus 40/41	Humaan virus	Icosahedrisch	dsDNA	70 – 90 nm
Norovirus GI/GII	Humaan virus	Icosahedrisch	ssRNA	23 – 40 nm
crAssphages 064	Bacteriofaag	Podovirus-achtig, met korte staart	dsDNA	77 nm met staart (36 nm)
PMMoV	Plant virus	Staafovormig	RNA	17 x 300 nm
NV2247	gg	gg	DNA	gg
NV2303	Bacteriofaag?	gg	DNA	gg
NV2310	Bacteriofaag?	gg	DNA	gg
NV2314	Bacteriofaag?	gg	DNA	gg

1.3 Doel

Het algemene doel van dit onderzoek is om te bepalen of de nieuwe indicatorvirussen geschikt zijn om de verwijdering van humaan pathogene virussen door de zuiveringsprocessen van oppervlaktewater (inclusief bodempassage) betrouwbaar te meten. Dit onderzoek heeft daarbinnen twee specifieke doelstellingen:

- i. Karakteriseren van de natuurlijke virussen op basis van grootte en gevoeligheid voor UV-desinfectie.
- ii. Vergelijking van de verwijdering van natuurlijke en humane virussen tijdens drinkwaterproductie.

1.4 Opzet onderzoek

Van de natuurlijke virussen (NV2247, NV2303, NV2310, NV2314) zijn nog weinig eigenschappen bekend, behalve dat het bacteriofagen lijken te zijn met een DNA genoom. Verder is er nog geen informatie over de vorm, grootte of andere karakteristieken. In hoofdstuk 3.2 wordt daarom met een filtratie-experiment achterhaald hoe groot de virussen ongeveer zijn. Daarnaast wordt getest of UV-desinfectie, met doses zoals gebruikt tijdens drinkwaterproductie, een effect hebben op de detectie van het DNA van de natuurlijke virussen (hoofdstuk 3.1).

In een aantal onderzoeken is gekeken naar de concentratie natuurlijke virussen in oppervlaktewater en is bepaald hoe goed de virussen tijdens de verschillende zuiveringstappen verwijderd worden. Hoe de verwijdering van natuurlijke virussen tijdens verschillende drinkwaterproductieprocessen zich verhoudt tot de verwijdering van humane, pathogene, virussen is niet bekend. Dit is een complexe vraag, waarvoor het vergelijken van de verwijdering van verschillende virusindicatoren, waaronder natuurlijke virussen, en de ziekteverwekkende virussen zelf door zuiveringsprocessen nodig is. In hoofdstuk 4 is dit een voor het eerst uitgevoerd bij twee full scale productielocaties, om de verwijdering van ziekteverwekkende virussen te vergelijken met de verschillende indicatorvirussen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Bepaling grootte natuurlijke virussen

Aan 3 liter oppervlaktewater (Lekkanaal bemonsterd in oktober 2020) waarin de natuurlijke virussen aanwezig zijn, is 1×10^6 pve/ml MS2 bacteriofagen gedoseerd. Van dit watermengsel is vervolgens 500 ml gefiltreerd volgens onderstaande tabel (Tabel 2). Zo is bijvoorbeeld watermengsel '3' achtereenvolgens gefiltreerd over 10 μm , 1 μm en 200 nm membraanfilters. In het filtraat is de concentratie virussen bepaald.

Tabel 2. Filtratieschema van oppervlaktewater (Lekkanaal) om de aanwezige virussen op grootte onderscheiden.

Filter	1	2	3	4	5
10 μm	X	X	X	X	X
1 μm		X	X	X	X
200 nm			X	X	X
100 nm				X	X
300 kDa (ong. 10 nm)					X

Het filtraat van de laatste filtratiestap is geconcentreerd met de Centricon-methode (ultrafiltratie met 100 kDa) tot 2,5 – 3 ml. Op dit concentraat zijn concentraties MS2, NV2247, NV2303, NV2310 en NV2314 bepaald (Tabel 5).

Door de concentraties natuurlijke virussen in de verschillende fracties met elkaar te vergelijken kan bepaald worden hoe groot de virussen ongeveer zijn. De eerste filtratiestappen (10 en 1 μm) zijn vooral bedoeld om grote deeltjes weg te vangen zodat de daarop volgende filters niet te snel verstopten. Met deze filtratiestappen worden mogelijk ook virussen verwijderd die aan deeltjes vast kunnen zitten. Om deze reden wordt na elke filtratiestap de concentratie virussen bepaald.

2.2 UV behandeling

De UV desinfectie is uitgevoerd in een collimated beam opstelling (LP lamp: PLL 90W; MP lamp: 2kW HOK; sensor: sed 240W) waarin de UV dosis is bepaald volgens de berekeningen van Bolton en Linden (14). Hierbij is gebruik gemaakt van een excel-rekentool geprogrammeerd door de auteurs en wordt rekening gehouden met verschillende factoren: water absorptie, gevoeligheid van de sensor, sensorfactor, divergentie, petrifactor en 'germicidal effect'. Uitgebreidere informatie staat vermeld in Bijlage 1.

Aan 3 liter oppervlaktewater (Lekkanaal bemonsterd in augustus 2020) waarin de natuurlijke virussen aanwezig zijn, is 1×10^6 pve/ml MS2 bacteriofagen gedoseerd. Dit water is verdeeld in fracties van 110 ml en met verschillende doses UV-straling behandeld:

- Lage druk: 0, 40, 80 mJ/cm^2
- Midden druk: 0, 40, 80 mJ/cm^2

Hiervoor is 110 ml oppervlaktewater met gedoseerde MS2 overgebracht naar petrischaaltjes (waterdiepte: 1,77 cm) voor zowel het lagedruk als middendruk experiment. Afstand van de petrischaaltjes tot de UV lamp was 80 cm. Tijdens de UV bestraling is het water continu geroerd zodat het water gelijkmatig is bestraald.

Bestralingstijden met MP-UV waren 52 sec (40 mJ/cm^2) en 1 minuut 44 sec (80 mJ/cm^2). Met de LP-UV waren de bestralingstijden 2 minuut 26 (40 mJ/cm^2) en 4 minuut 51 sec (80 mJ/cm^2).

UV transmissie ($\text{UVT}_{254\text{nm}}$: 82,35%) en absorptie bij 254 nm ($0,0843 \text{ cm}^{-1}$) zijn bepaald.

De gemiddelde 'germicidal fluence' was $0,275 \text{ mW/cm}^2$ (lagedruk) en $0,773 \text{ mW/cm}^2$ (middendruk).

Elke UV-bestraling is in duplo uitgevoerd. Na bestraling zijn de watermengsels geconcentreerd met Centricon. Op het concentraat zijn dezelfde analyses uitgevoerd als voor de 'grootte' experimenten (Tabel 5).

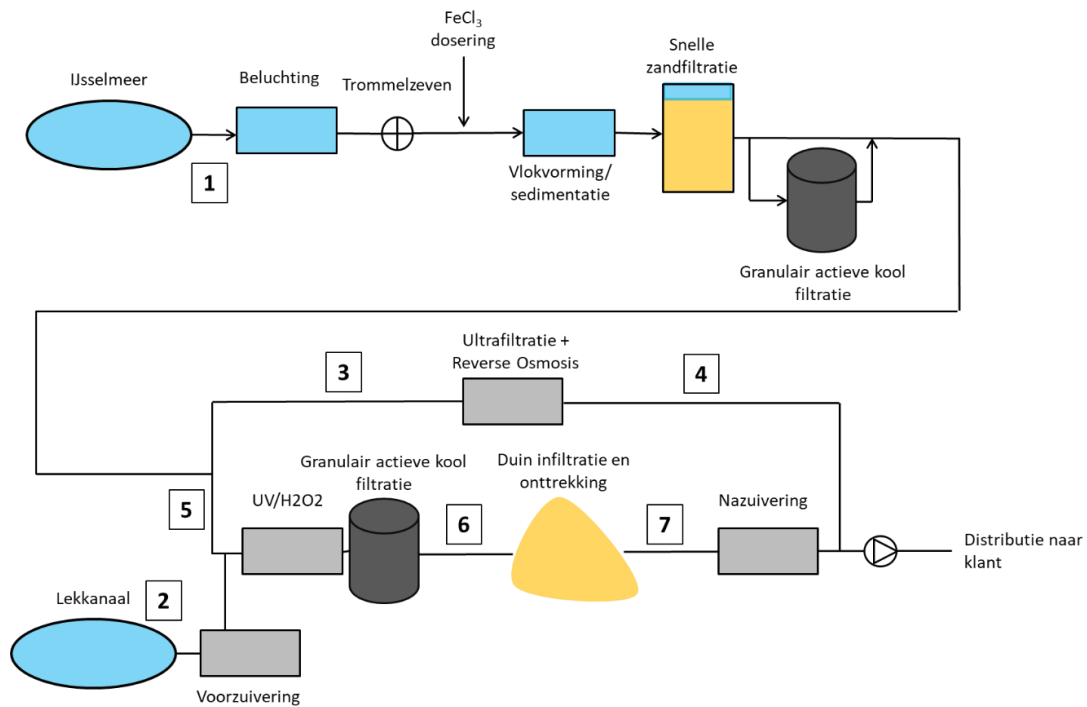
2.3 Monsternamenpunten productielocaties Andijk, Heemskerk, Wijk aan Zee en De Gavers

Op productielocaties van PWN; Andijk, Heemskerk en Wijk aan Zee (Figuur 2) en van de Watergroep; De Gavers (Figuur 3) zijn monsters genomen, en is de verwijdering van verschillende natuurlijke en pathogene virussen gemeten (Tabel 5) door voor en na het desbetreffende productieproces de virusconcentratie te meten. Idealiter worden deze watermonsters in de winter genomen als de concentratie pathogene virussen in oppervlaktewater het hoogst is (13). Door de coronamaatregelen was monstername in de winter bij De Gavers in België echter niet mogelijk. Daarom is de monstername uiteindelijk in mei uitgevoerd.

De zuivering van PWN (Andijk – Heemskerk – Wijk aan Zee) bestaat uit verschillende waterstromen en zuiveringsstappen. Degene die belangrijk zijn voor dit onderzoek zijn weergegeven in Figuur 2, en in Tabel 3 staan de monsterpunten beschreven.

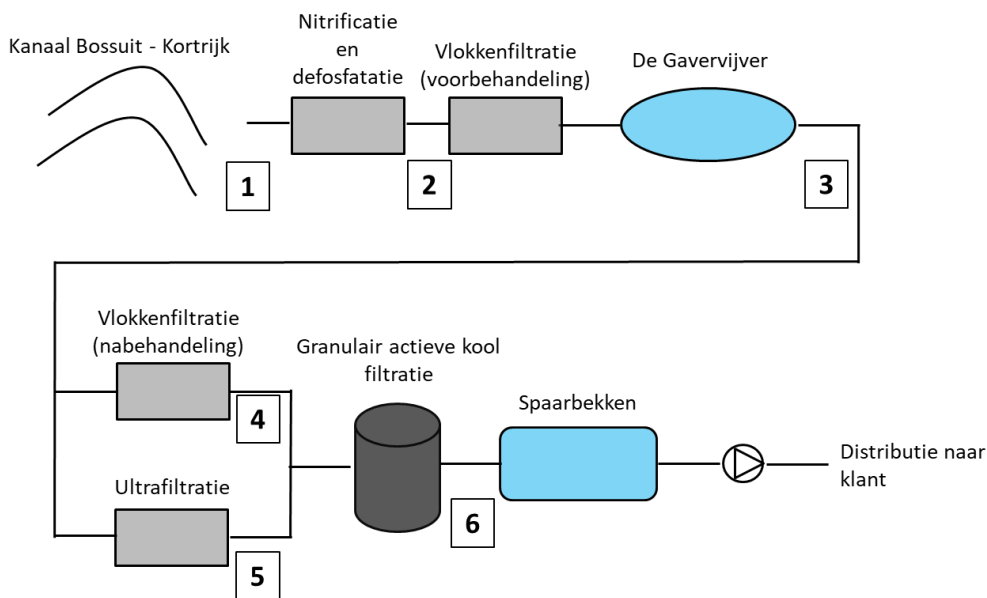
Tabel 3. Monsterpuntcodes van de productielocaties Andijk, Heemskerk en Wijk aan Zee van PWN. UF: ultrafiltratie, HF: hyperfiltratie (reverse osmosis)

Code in Figuur 2	Monsterpuntcode	Zuiveringsstap	Locatie	Monsternamedatum
1	IJM-PWN	Ruw water IJsselmeer	Andijk	8 - 9 december 2020
2	PNG-OW-02	Ruw water Lekkanaal	Nieuwegein	8 - 9 december 2020
3	PLG-UF-INF	Influent UF/HF (influent membraanfabriek)	Heemskerk	8 - 9 december 2020
4	PLG-HF-EFF	Effluent UF/HF	Heemskerk	8 - 9 december 2020
5	PLG-UV1-INF	Influent UV/peroxide	Heemskerk	7 - 8 december 2020
6	PLG-UV1-EFF	Effluent UV/peroxide (influent duinpassage)	Heemskerk	7 - 8 december 2020
7	PWM-PO-INF	Effluent duinpassage	Wijk aan Zee	7 - 8 december 2020



Figuur 2. Monsternamepunten op productielocaties Andijk, Heemskerk en Wijk aan Zee. 1: ruw water IJsselmeer, 2: ruw water Lekkanaal, 3: influent membraanfabriek Heemskerk (UF + HF), 4: effluent membraanfabriek Heemskerk, 5: influent UV/H₂O₂ en AKF in Heemskerk, 6: effluent UV/ H₂O₂ en AKF in Heemskerk, tevens influent duinpassage, 7: onttrokken duinfiltraat (voor opmenging met natuurlijk duinwater).

De monsternamepunten van productielocatie De Gavers staan weergegeven in Figuur 3 en Tabel 4.



Figuur 3. Monsternamepunten op productielocatie De Gavers (De Watergroep). 1: ruw water kanaal Bossuit-Kortrijk, 2: na nitrificatie en defosfatatie, 3: ruw water De Gaversvijver, 4: na vlokkenfiltratie (nabehandeling), 5: na UF, 6: na AKF.

Tabel 4. Monsterpunten van de productielocaties De Gavers van De Watergroep. UF: ultrafiltratie, AKF: Actief koolfilters. Deze punten zijn bemonsterd op 25 mei 2021 door medewerkers van De Watergroep en direct per koerier verstuurd naar KWR.

Code in Figuur 3	Monsterpunt	Zuiveringsstap
1	Kanaal	Ruw water kanaal Bossuit-Kortrijk
2	Na defosfatatie	Nitrificatie en defosfatatie
3	Gaversvijver ruw	Vlokkenfiltratie en spaarbekken
4	Na vlokkenfilter	Vlokkenfiltratie
5	Na UF	Ultrafiltratie
6	Na AKF	Aktief kool filter

Van de monsterpunten van PWN is op locatie 1000 liter water bemonsterd met de hemoflow-opstelling. Hiermee is ongeveer 1000 liter water in 16 uur geconcentreerd tot ongeveer 500 ml. Vanwege coronamaatregelen was een vergelijkbare monsternamen van 1000 liter gevolgd door hemoflow concentratie bij De Gavers (De Watergroep) niet mogelijk. Voor deze locatie is door medewerkers van De Watergroep 100 liter water per monsterpunt bemonsterd en per koerier verstuurd naar KWR. Bij KWR is het water met de hemoflow-methode geconcentreerd.

Na hemoflow-opwerking is dit concentraat in het laboratorium verder geconcentreerd tot ongeveer 50 ml met de centricon-methode, een ultrafiltratiemethode (100 kDa). Op deze concentraten zijn de analyses uit Tabel 5 uitgevoerd.

Tabel 5. Bacteriofagen, natuurlijke, plant en humane virussen die in de verschillende experimenten zijn gemeten. Gegeven is het soort virus of bacteriofaag, de meetmethode, of het een RNA of DNA virus betreft en in welk experiment het virus is bepaald.

	Virus/bacteriofaag	Methode	DNA, RNA	Gemeten in experiment		
				UV	Grootte	Productielocatie
NV2247	Natuurlijk virus	qPCR	DNA	X	X	X
NV2303	Natuurlijk virus	qPCR	DNA	X	X	X
NV2310	Natuurlijk virus	qPCR	DNA	X	X	X
NV2314	Natuurlijk virus	qPCR	DNA	X	X	X
PMMoV	Plant virus	qPCR	RNA			X
crAssphages	Bacteriofaag	qPCR	DNA			X
MS2	Bacteriofaag	qPCR, plaque assay	RNA	X	X	X
Somatische colifagen	Bacteriofaag	plaque assay	DNA			X
Enterovirus	Humaan virus	qPCR	RNA			X
Adenovirus 40/41	Humaan virus	qPCR	DNA			X
Norovirus GI	Humaan virus	qPCR	RNA			X
Norovirus GII	Humaan virus	qPCR	RNA			X

2.4 Microbiologische analyses

2.4.1 Concentreren en opwerken watermonsters

De watermonsters van de experimenten met UV-bestraling en groottebepaling zijn geconcentreerd met Centricon. Het concentraat is vervolgens gebruikt om de aangegeven analyses op uit te voeren.

Voor het meten van virusverwijdering op productielocaties Andijk en De Gavers is 1000 liter, respectievelijk 100 liter, water geconcentreerd met de hemoflowmethode tot ongeveer 500 ml. Dit water is met de Centricon-methode verder geconcentreerd tot ongeveer 50 ml waarop de aangegeven analyses zijn uitgevoerd.

Op alle punten van de productielocatie is ook één liter niet geconcentreerd water bemonsterd. Dit water is direct met de DNA isolatie kit opgewerkt. Hierin zijn de vier natuurlijke virussen bepaald om zo een maat te hebben voor de recovery van de gecombineerde hemoflow-centricon methode.

2.4.2 Detectie virussen

Van een aantal humane virussen (adenovirus, enterovirus) is detectie en kwantificatie met kweekmethode mogelijk. Hiermee worden alleen de infectieuze virusdeeltjes gemeten. Deze methoden geven echter pas na 10-14 dagen resultaat. Daarom zijn deze virussen in deze studie gedetecteerd met qPCR. Norovirus is alleen in hooggespecialiseerde laboratoria met kweekmethoden te detecteren. Voor de natuurlijke virussen en de alternatieve virussen PMMoV en crAssphages zijn geen (bruikbare) kweekmethoden beschikbaar. De aanwezigheid en concentratie van deze virussen is daarom bepaald met de qPCR-methode waarmee specifiek DNA of RNA van de virussen worden gemeten. Nadeel van deze methode is dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen infectieuze en niet-infectieuze virusdeeltjes. Verwijdering van virusdeeltjes wordt daarom wel gemeten, maar desinfectiestappen zoals UV-desinfectie zullen waarschijnlijk nauwelijks een effect hebben op de gemeten DNA of RNA-concentratie.

DNA en RNA is uit de watermonsters geïsoleerd met de PowerBiofilm kit (MoBio/Qiagen). De primers en probes om met de qPCR-methode de verschillende virussen te detecteren, zijn in Tabel 6 beschreven.

Tabel 6. Sequenties gebruikte primers en probe om virussen te detecteren.

	Forward primer	Reverse primer	Probe
NV2247	AAGCCTGAACGTGTTCCGAT	CTGCCCGCAGGATTGTTAGA	ACGCTCAACGGACTATGATTGACACGAC
NV2306	TGGTCAAGATTGTGACCCCG	TCTAGTTGCTGCCGTTGGAG	CCGGAAGCCATATTGCCTTTGCGCA
NV2310	GCATCTTCGTC AATGCGTCC	GAGGTCGTGGTGTGGCTATC	CACGTTCTCTGAGTTGCGGTAGAAGA
NV2314	ACCAGGGGCGGTGTATATTG	GACGCCGTTGAAATGTCAGG	CGCAATAGTCCATGCTGACCCACCT
PMMoV	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA	TTGTCCGTTGCAATGCAAGT	FAM-CCTACCGAAGCAAATG-MGB-NFQ
Enterovirus	CCCTGAATGCGGCTAAT	ATTGTCACCATAAGCAGCC	FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGT-BHQ1
crAssphage 064	TGTATAGATGCTGCTGCAACTGTACTC	CGTTGTTTTTCATCTTTATCTTGTCAT	FAM-CTGAAATTGTTTCATAAGCAA-MGB

De concentratie van vier natuurlijke virussen is bepaald zoals eerder beschreven (4). De primers en probe zijn gegeven in Tabel 6.

De concentratie Adenovirus 40/41, Norovirus GI en Norovirus GII is met qPCR bepaald volgens bijlage 4, 7 en 8 van KWR-protocol LMB-065.

De concentratie enterovirussen is bepaald met qPCR zoals beschreven in Lodder *et al.* (15). Enterovirus RNA is eerst met reverse transcriptie omgezet naar DNA waarna de DNA concentratie is bepaald met qPCR. De primers en probe voor de Enterovirus-qPCR zijn gegeven in Tabel 6.

De detectie en kwantificatie van PMMoV is uitgevoerd zoals beschreven (16). PMMoV RNA is eerst omgezet naar cDNA door middel van reverse transcriptie. Het gecreëerde DNA is met qPCR gekwantificeerd, hiervoor zijn de primers en probe uit Tabel 6 gebruikt.

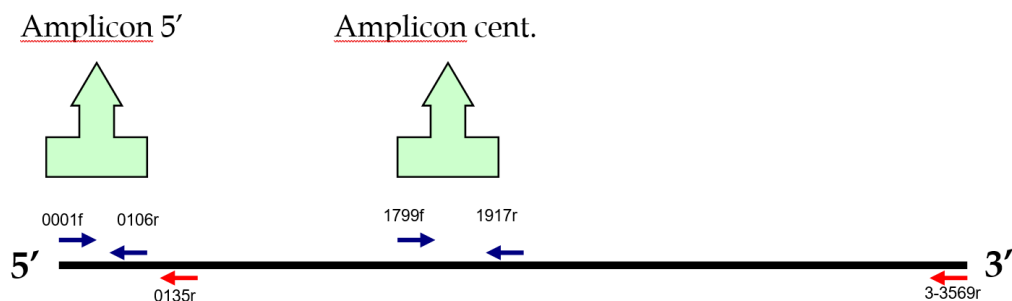
Detectie van crAssphage DNA is uitgevoerd volgens Stachler, 2017 (1).

2.4.3 MS2 bacteriofagen en somatische colifagen

Somatische colifagen zijn aangetoond met de plaque assay volgens LMB-041, conform NEN-ISO 10705-2. Hiervoor zijn de watermonsters eerst geconcentreerd met behulp van Centricon. Het concentraat is in een verdunningsreeks uitgespateld op semi-solid Modified Scholtens (ssMSA)-platen met *E. coli* bacteriën (WG5) en gedurende 20 uur geïncubeerd bij 36°C.

MS2 en F-specifieke bacteriofagen zijn aangetoond met de plaque assay volgens LMB-037, conform NEN-ISO 10705-1. Hiervoor zijn de watermonsters eerst geconcentreerd met behulp van Centricon. Het concentraat is in een verdunningsreeks uitgespateld op Tryptone-gist extract-glucose agar (TYGA)-platen met *Salmonella typhimurium* (WG49) en gedurende 18 uur geïncubeerd bij 36°C. Dezelfde procedure is herhaald met RNase in de TYG agar, waardoor groei van MS2 en F-specifieke bacteriofagen wordt geremd. Het verschil tussen beiden is het werkelijke aantal F-specifieke RNA bacteriofagen

Bacteriofaag MS2 is ook gekwantificeerd door middel van qPCR. Omdat MS2 een RNA genoom heeft is van het RNA eerst cDNA gemaakt, waarna het is vermeerderd met qPCR (Figuur 4, Tabel 7).



Figuur 4. Een schematische weergave van het RNA van bacteriofaag MS2 met daarop weergegeven de positie van de primers voor de cDNA synthese (rood) en voor de qPCR (blauw).

Tabel 7. Primers gebruikt voor de detectie van MS2 RNA met qPCR.

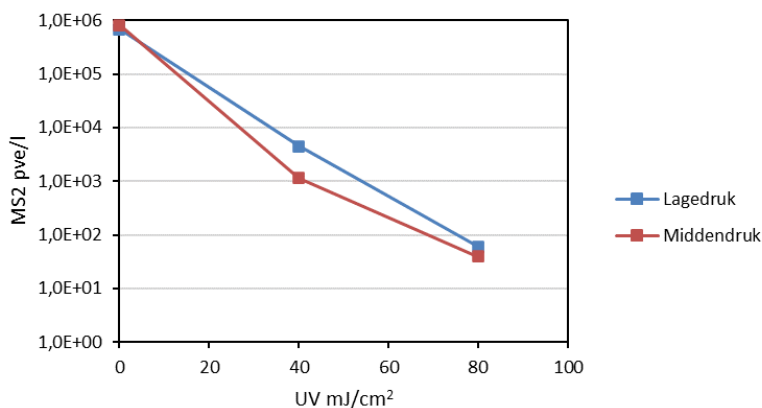
	Forward primer	Reverse primer	cDNA primer
Amplicon 5'	GGGTGGGACCCCTTTCGG (0001f)	ATTCCGGCTACCTACAGCG (0106r)	
Amplicon cent	TGATCTTCTCGCGATCTTTC (1799f)	GCAATTCGTCCCTTAAGTAAGC (1917r)	
RT pr 5-0135r			TCGCACAGGTCAAACCTCCTAG
RT pr 3-3569r			TGGGTGGTAACTAGCCAAGC

3 Karakterisatie natuurlijke virussen

3.1 UV desinfectie

MS2 en natuurlijke virussen worden gedetecteerd met de qPCR-methode, waardoor het effect van UV-desinfectie alleen zichtbaar is als het DNA (of RNA in geval van een RNA virus zoals MS2) dermate beschadigd is dat de qPCR-reactie wordt geremd. MS2 is ook bepaald met de plaque assay, waarvoor het virus daadwerkelijk infectieus moet zijn om gedetecteerd te kunnen worden. Voor afdoding, waarbij infectie van de gastheercel niet meer mogelijk is, zijn vaak enkele DNA-beschadigingen of beschadigingen aan het capsid al voldoende. De qPCR methode zal UV schade dus minder gevoelig detecteren dan de plaque assay. Dit verschil is bij MS2 goed zichtbaar, omdat hiervan de het effect van de UV behandeling is gemeten met zowel de plaque-assay, als met de qPCR.

Oppervlaktewater met daarin natuurlijke virussen en gedoseerde MS2 is bestraald met lage en midden druk UV, met doses van 0, 40 en 80 mJ/cm², vergelijkbaar met wat wordt toegepast voor desinfectie tijdens drinkwaterproductie. MS2 bacteriofagen zijn meegenomen als controle van de UV-desinfectie omdat hiervoor het effect van UV-desinfectie eerder is bepaald. De UV desinfectie van MS2 is weergegeven in Figuur 5.

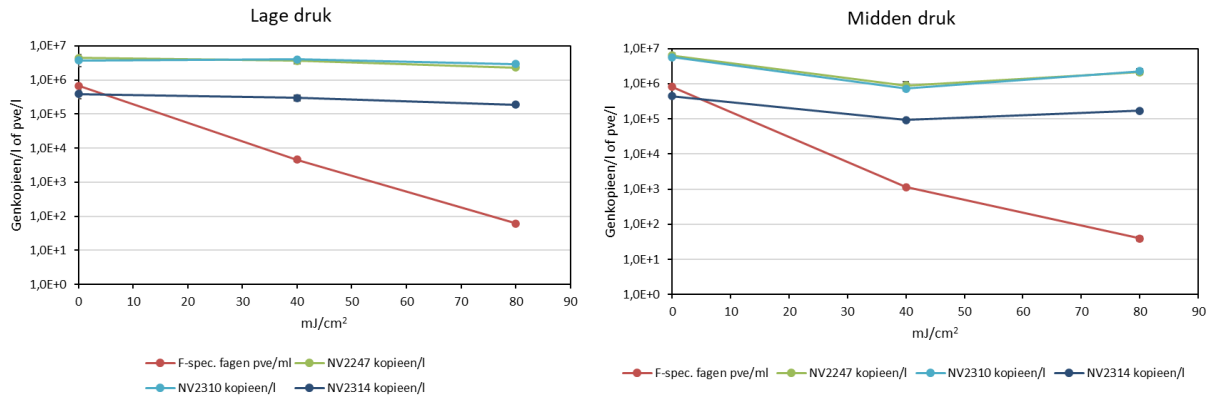


Figuur 5. De inactivatie van MS2 door lage druk (blauw, gemiddelde 'germicidal fluence': 0,275 mW/cm²) en midden druk (rood, gemiddelde 'germicidal fluence': 0,773 mW/cm²) UV. Gegeven is het gemiddelde (n=2) met de standaarddeviatie (erg klein en daardoor niet zichtbaar).

De desinfectie van MS2 door de lagedruk bestraling verloopt lineair, en is vergelijkbaar met eerdere experimenten. De inactivatie door middendruk bestraling verloopt niet volgens verwachting. Normaalgesproken is ook de inactivatie door middendruk UV lineair en bovendien is het desinfecterende effect groter dan is bepaald in dit experiment. Eerdere experimenten zijn uitgevoerd in fosfaat gebufferd water, en niet met oppervlaktewater. Of dit de reden is waarom de inactivatie na middendruk bestraling afwijkt is niet bekend (zie ook discussie). Een mogelijkheid is dat MS2 zich 'verstopt' achter deeltjes die aanwezig zijn in het oppervlaktewater en dat daardoor de daadwerkelijk ontvangen dosis door MS2 lager is dan de dosis die is bepaald op basis van de UVT (17, 18).

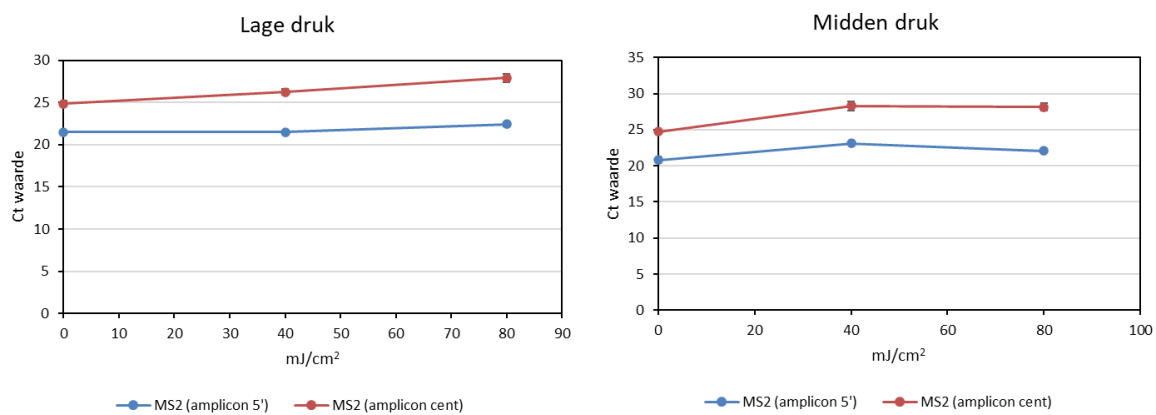
UV-desinfectie heeft nauwelijks effect op het met qPCR bepaalde aantal genkopieën van de drie natuurlijke virussen (6). De amplicon lengte van de drie natuurlijke virussen is geoptimaliseerd voor qPCR, en niet voor het meten van beschadigingen, en bedraagt 104 bp voor NV2247, 91 bp voor NV2310 en 102 bp voor NV2314. Bij lage druk UV-bestraling daalt het aantal genkopieën met 0,1 – 0,3 log bij 80 mJ/cm². Bij middendruk bestraling is het effect van de 40 mJ/cm² dosis groter (0,7 – 0,9 log) dan bij 80 mJ/cm² (0,4 – 0,5 log). Door de middendruk-UV bestraling wordt het DNA meer beschadigd dan bij lage druk UV, maar de verschillen tussen lage en middendruk UV

zijn klein. De geringe amplicon lengte is geoptimaliseerd voor qPCR, maar is voor het meten van beschadigingen aan het DNA waarschijnlijk te kort. Een groter amplicon omvat beschadigingen over een groter stuk DNA, en kan mogelijk gevoeliger DNA schade meten.



Figuur 6. Effect van UV-bestraling van oppervlaktewater op aantreffen natuurlijke virussen en MS2 fagen. Het effect op de natuurlijke virussen is bepaald met qPCR (genkopieën/liter) en op MS2 bacteriofagen met de plaque assay (pve/ml). Gegeven is het gemiddelde (n=2) met SD (niet zichtbaar).

Het effect van UV op het RNA van MS2 is weergegeven in Figuur 7 in Ct waarde. Dit is het ruwe resultaat van een PCR reactie. Om het resultaat weer te kunnen geven in gen kopieën per liter is het noodzakelijk een interne standaard te hebben die exact is gekwantificeerd. Voor de natuurlijke virussen heeft KWR deze interne standaard ontwikkeld, maar voor de PCR combinaties die zijn uitgevoerd op het RNA van MS2 niet. Het effect van een UV behandeling op MS2 wordt daarom weergegeven in Ct. Hierbij geldt dat de beginconcentratie DNA (van het MS2 RNA wordt DNA gemaakt voor de qPCR) in de PCR reactie de Ct waarde bepaald. De Ct waarde is de waarde waarop het in de PCR gesynthetiseerde DNA een grenswaarde passeert. Een hoge DNA concentratie zorgt voor een snellere vermeerdering in de PCR, en de grenswaarde wordt eerder gepasseerd dan bij een lage DNA concentratie. Samenvattend, een hoge DNA concentratie aan het begin van de PCR reactie resulteert in een lage Ct waarde, terwijl een lagere DNA concentratie resulteert in een hogere Ct waarde. Bij deze specifieke metingen zal het DNA in het monster dat is behandeld met UV min of meer beschadigd en/of afgebroken zijn. Daarom verwacht je bij de UV behandelde monsters een hogere Ct waarde.



Figuur 7. Het effect van de lage en midden druk UV behandeling op het RNA van MS2, gemeten op 2 locaties van het RNA molecuul. Gegeven is het gemiddelde (n=2) met SD.

Figuur 7 laat zien dat de Ct waarde hoger is bij MS2 behandeld met 80 mJ/cm² UV, al is het effect niet heel groot. Er treed dus een bepaalde mate van DNA beschadiging op, waardoor de qPCR meer cycli nodig heeft om tot de grenswaarde te komen, waardoor de Ct waarde daar hoger is.

Tabel 8. Ct-waarden van de qPCR op MS2 na lage en midden druk UV behandeling.

UV dosis (mJ/cm ²)	Midden/ lage druk	MS2 (amplicon 5') Ct waarden	MS2 (amplicon cent) Ct waarden	Verskil tussen 0 en 80 mJ/cm ² (amplicon 5')	Verskil tussen 0 en 80 mJ/cm ² (amplicon cent)
0	laag	21,5	24,9	0,9	3,0
40	laag	21,5	26,2		
80	laag	22,4	27,9		
0	midden	20,8	24,7	1,3	3,4
40	midden	23,1	28,3		
80	midden	22,1	28,2		

Tabel 8 laat verschillen zien tussen het 5'- en het center-amplicon. De Ct waarde op t = 0 is lager (is meer start DNA) van het 5'-amplicon. Daarnaast is bij het center-amplicon het verschil in Ct waarde tussen onbehandeld en met 80 mJ/cm² behandeld MS2 groter dan bij het 5'-amplicon (0,9 - 1,3 versus 3,0 - 3,4). Het verschil tussen de twee amplicons wordt veroorzaakt door het verschil in cDNA synthese. Voor het center-amplicon wordt RT-primer 3569 gebruikt (Figuur 4). Deze primer hecht aan het 3'-einde van het RNA molecuul, waarna de cDNA synthese richting de 5' kant begint. De afstand tussen de RT-primer en de qPCR reverse primer is ongeveer 1650 baseparen. Door de UV beschadigingen zal de cDNA synthese niet bij alle aanwezige moleculen goed verlopen. Hoe groter het stuk is tussen de cDNA synthese en de PCR primers, hoe groter ook de kans is dat daar een beschadiging is opgetreden. Voor de cDNA synthese van amplicon 5' is gebruik gemaakt van RT-primer 135. Hier is de afstand tussen de RT-primer en de qPCR primers slechts ongeveer 30 baseparen. De kans dat er een beschadiging optreedt in het RNA in een fragment van 30 baseparen is veel kleiner dan in een fragment van 1650 baseparen. Doordat het enzym Reverse Transcriptase bij het aflezen van het 1650 baseparen fragment veel meer beschadigingen tegenkomt, zal er minder DNA worden gesynthetiseerd dat kan dienen als startmateriaal voor de qPCR.

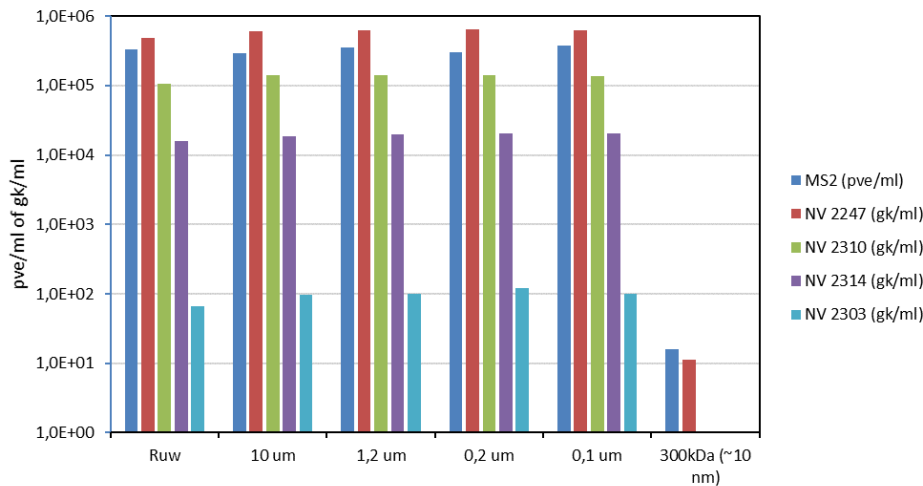
Resumerend ontstaat er wel schade door UV aan het DNA, maar is die schade met qPCR in dit UV bereik moeilijk te meten, omdat qPCR niet gevoelig genoeg is. In tegenstelling tot MS2 zijn de natuurlijke virussen DNA virussen. Daar is de cDNA synthese niet nodig, en wordt de schade uitsluitend door de qPCR vastgesteld. Een langer amplicon zal in dat geval mogelijk schade gevoeliger kunnen vaststellen. Daarvoor is meer genetische informatie nodig van deze virussen.

Een andere mogelijkheid is enzymatic treatment PCR (ET-PCR). Bij deze methode wordt naast schade aan het RNA ook schade aan het capsid gemeten. Deze methode is aanzienlijk gevoeliger, maar tot nu toe alleen getest op MS2 in labexperimenten (19).

3.2 Bepaling van de virus grootte

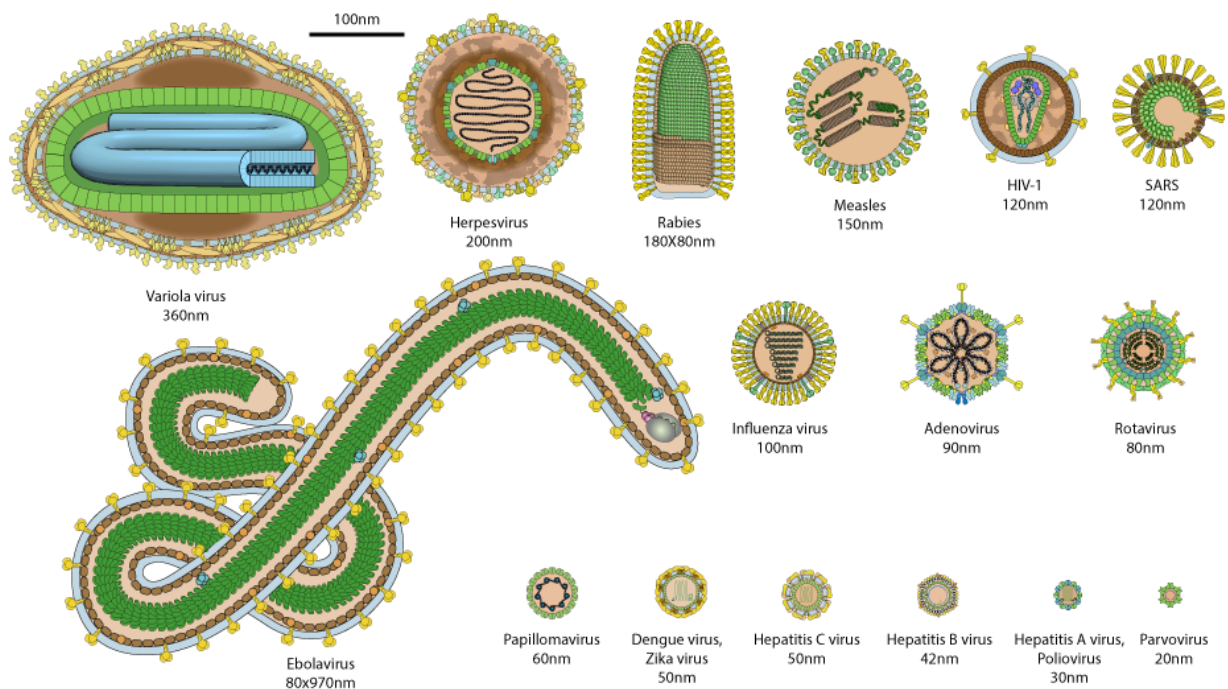
Virussen zijn, op een paar uitzonderingen na, tussen de 20 en 300 nm groot. Om de grootte van de natuurlijke virussen te bepalen is een rivierwatermonster met daarin natuurlijke virussen (en alle andere altijd aanwezige virussen) en waaraan ook MS2 was toegevoegd stapsgewijs gefiltreerd door filters met een steeds kleinere poriegrootte. De fracties zijn onderzocht op de concentratie natuurlijke virussen met qPCR. Uit de filtratie-experimenten blijkt dat de natuurlijke virussen en bacteriofaag MS2 probleemloos het 0,1 µm (is 100 nm) filter kunnen passeren. Het 10 nm filter vormt wel een barrière (Figuur 8), die door NV2247, NV2303 en NV2310 niet wordt gepasseerd. Alleen MS2 en NV2247 zijn na het 300 kDa (10 nm) filter nog in heel lage concentraties

aanwezig die net boven de detectiegrens liggen. MS2 heeft een grootte van 23 – 28 nm en zou daarmee in theorie geheel verwijderd moeten worden door het 300 kDa filter. Om het water door dit filter te persen is een hoge druk nodig, waardoor een kleine imperfectie in een membraan of een connectie kan zorgen voor minimale doorslag. Dit kan hier niet ook uitgesloten worden. Zowel MS2 als NV2247 worden na dit filter gevonden, en dit is een aanwijzing dat NV2247 van de natuurlijke virussen het kleinst is. De andere virussen hebben dan een grootte die tussen de 30 en 100 nm moet liggen. Geen van de huidige in gebruik zijnde natuurlijke virussen wordt tegengehouden door het 100 nm filter, en ze zijn daarom kleiner dan 100 nm. Ter illustratie is in Figuur 9 de grootte van een aantal virussen weergegeven die voor mensen ziekteverwekkend zijn.



Figuur 8. Groottebepaling van natuurlijke virussen door opeenvolgende membraanfiltraties met poriëgrootte van 10 µm, 1,2 µm, 0,2 µm, 0,1 µm en 300 kDa (ongeveer 10 nm).

This picture displays most common human viruses with their relative size. The nucleic acids are not to scale.

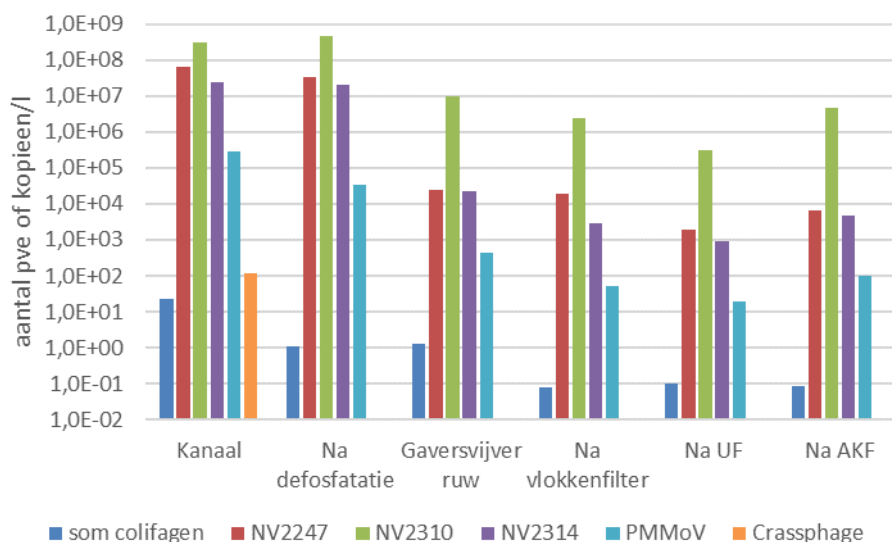


Figuur 9. De grootte van een aantal voor de mens ziekteverwekkende virussen (van Viralzone.org).

4 Verwijdering natuurlijke en pathogene virussen tijdens drinkwaterproductie

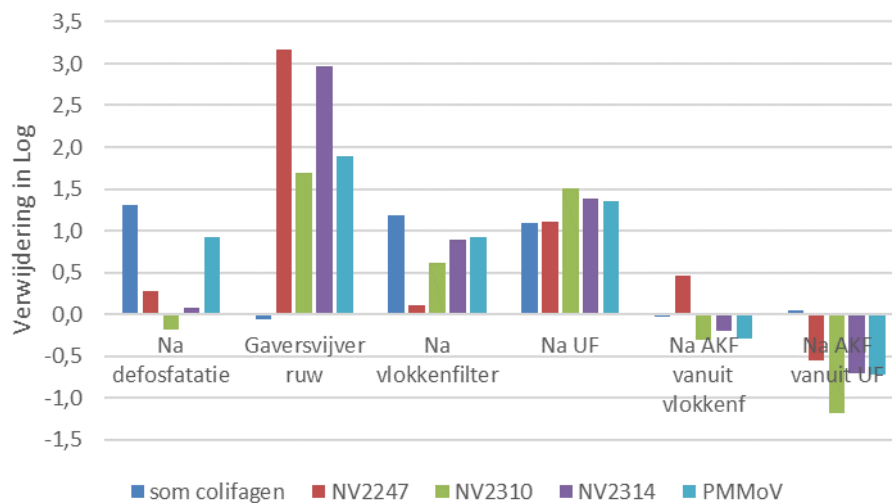
4.1 De Gavers

Bij productielocatie De Gavers is bij 6 monsterpunten ruim 100 liter water bemonsterd en onderzocht op de aanwezigheid van somatische colifagen, natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314, crAssphage en PMMoV, en de ziekteverwekkende virussen adenovirus, enterovirus, en norovirus. Hoewel het de bedoeling was om 1000 liter ter plaatse te bemonsteren en te concentreren door middel van hemoflow, bleek het door de als gevolg van het door de corona pandemie gehanteerde quarantainemaatregelen voor de monsternemer niet mogelijk te zijn naar België te reizen. Daarom is gekozen voor het bemonsteren van 100 liter water, en dit te transporteren naar KWR. Hierdoor wordt de totale gevoeligheid van de virusdetectie ongeveer een log minder, wat met name bij de ziekteverwekkende virussen lastig kan zijn omdat deze hierdoor mogelijk onder de detectie grens komen. In Figuur 10 zijn de resultaten van de analyses weergegeven.



Figuur 10. Het aantal somatische colifagen (pvc/l), natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314, en de indicatorvirussen PMMoV en crAssphage (kopieën per liter) in het ruwe water en water na zuiveringsstappen bij productielocatie De Gavers. De aantallen enterovirus, norovirus en adenovirus waren lager dan de detectiegrens en zijn daarom niet in deze figuur weergegeven.

De klassieke indicator somatische colifagen wordt gevonden in het ruwe water, en na een aantal zuiveringsstappen in lage concentratie. De natuurlijke virussen worden in het ruwe water waargenomen in een concentratie van tussen de 10⁷ en 10⁸ virussen per liter. De verwijdering van deze virussen door processtappen kan door deze hoge concentratie gedurende het gehele zuiveringsproces worden gevolgd. De nieuwe indicatorvirussen PMMoV en crAssphage worden beide gedetecteerd in het ruwe water. CrAssphage is na de 1^e zuiveringsstap niet meer detecteerbaar. PMMoV is wel gedurende het gehele zuiveringsproces te detecteren. De monsters zijn ook onderzocht op de voor de mens ziekteverwekkende virussen norovirus, enterovirus en adenovirus. Deze virussen werden in geen van de monsters aangetroffen, en zijn daarom niet weergegeven in Figuur 10.



Figuur 11. De verwijdering van colifagen, natuurlijke virussen en PMMoV door de verschillende zuivering procedés.

In Figuur 11 is de verwijdering weergegeven van de indicatorvirussen en somatische colifagen na de verschillende zuiveringsstappen. De 1^e zuiveringsstap betreft na nitrificatie/defosfatatie en deze processen laten weinig verwijdering zien van natuurlijke virussen en ongeveer 1 log voor somatische colifagen en PMMoV (Tabel 9, Tabel 10). Na de nitrificatie/defosfatatiestap volgt een coagulatie/vlokkenfiltratie waarna het water in de Gavers vijver wordt verzameld. De concentratie van NV2247 en NV2314 is ongeveer 3 log lager dan bij het eerder monsterpunt, wat op het conto kan worden geschreven van de coagulatie/vlokkenfiltratie. Bij een eerdere studie is gebleken dat NV2310 minder goed wordt verwijderd door coagulatie/sedimentatie. Dat wordt ook nu weer waargenomen. De verwijdering van NV2310 is met 1,7 log ongeveer 1,5 log minder dan de twee andere natuurlijke virussen. De verwijdering van PMMoV is met 1,9 log ongeveer gelijk aan de verwijdering van NV2310. Na de Gavers vijver wordt de waterstroom gesplitst. Ongeveer een derde deel gaat naar de ultrafiltratie installatie, en twee derde gaat door de vlokkenfilters in de nabehandeling. De UF laat voor alle onderzochte virussen een redelijk gelijke verwijdering zien van 1,1 - 1,5 log. UF selecteert primair op grootte, maar ook electrostatische interacties spelen een rol (20), en blijkbaar worden deze virussen, in gelijke mate tegengehouden. Omdat de UF door een poriegrootte van 10 - 100 nm geen absolute barrière is kunnen virussen toch nog passeren. In een eerdere studie was de verwijdering bij productielocatie de Gavers door de UF ongeveer 3 log (21). Waarom de verwijdering door de UF nu lager is, is niet bekend. De vlokkenfilters in de nabehandeling verwijderen ongeveer een log somatische colifagen, en minder dan een log van de natuurlijke virussen en PMMoV. Het water na de UF en de vlokkenfilters wordt vervolgens weer gemengd, en behandeld met AKF. Het water afkomstig van de vlokkenfilters bevat meer virussen dan het effluent van de UF. Ten opzichte van het water direct na de UF neemt daarom door het mengen van de waterstromen en passage door de AKF de aantallen virussen weer iets toe. De totale verwijdering door de zuivering bedraagt 2,4 log voor somatische colifagen, 3,4-4,0 log voor NV2247, NV2314 en PMMoV, en 1,8 log voor NV2310. Deze virusmarker wordt niet goed verwijderd door coagulatie/sedimentatie processen, en de gemeten verwijdering van NV2310 is vooral door de UF bewerkstelligd.

Tabel 9. De gemeten virusaantallen in het ruwe water en na zuiveringsprocessen.

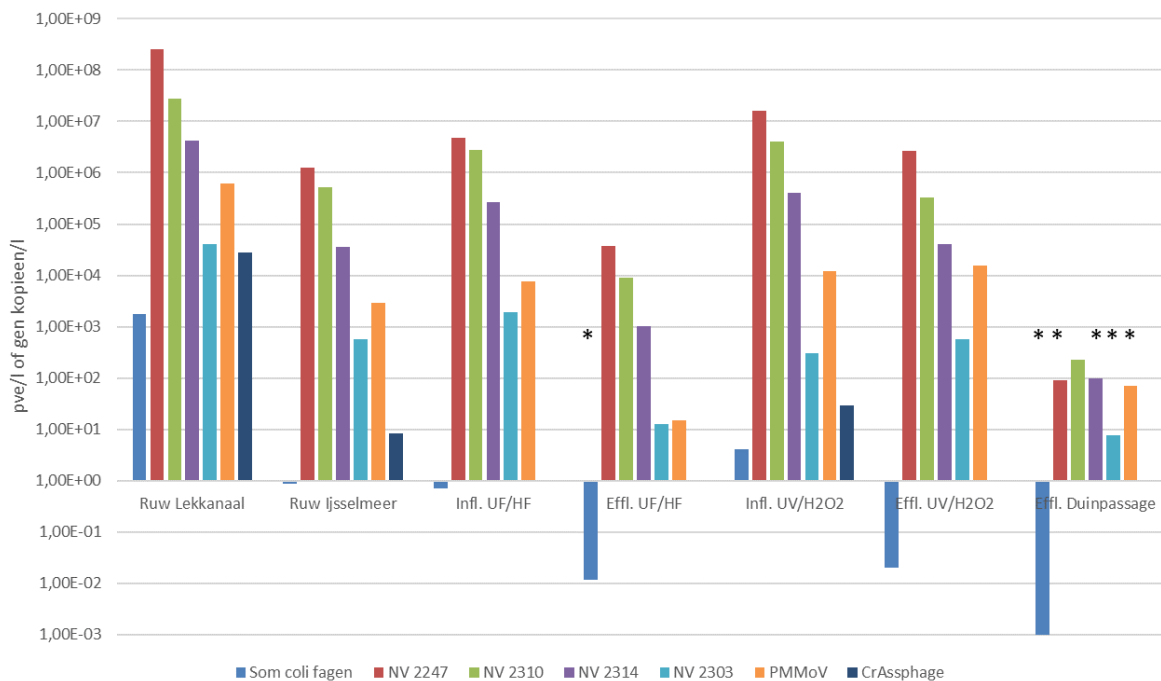
	Somatische colifagen	NV 2247	NV 2310	NV 2314	PMMoV	CrAssphage
	pve/l	gk/l	gk/l	gk/l	gk/l	gk/l
Kanaal	$2,2 \times 10^1$	$6,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$2,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$
Na defosfatatie	$1,1 \times 10^0$	$3,5 \times 10^7$	$4,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$3,5 \times 10^4$	
Gaversvijver ruw	$1,3 \times 10^0$	$2,4 \times 10^4$	$9,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^4$	$4,4 \times 10^2$	
Na Vlokkenfilter	$8,1 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^4$	$2,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^3$	$5,3 \times 10^1$	
Na UF	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^3$	$3,1 \times 10^5$	$9,3 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	
Na AKF	$8,1 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^3$	$4,8 \times 10^6$	$4,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	

Tabel 10. Logverwijdering van de verschillende virusmarkers door de zuiveringsprocessen

Proces	Proces in Figuur X	Somatische colifagen	NV 2247	NV 2310	NV 2314	PMMoV
Na defosfatatie	1 vs 2	1,3	0,3	-0,2	0,1	0,9
Gaversvijver ruw	2 vs 3	-0,1	3,2	1,7	3,0	1,9
Na vlokkenfilter	3 vs 4	1,2	0,1	0,6	0,9	0,9
Na UF	3 vs 5	1,1	1,1	1,5	1,4	1,3
Na AKF vanuit vlokkenf	4 vs 6	0,0	0,5	-0,3	-0,2	-0,3
Totale verwijdering	1 vs 6	2,4	4,0	1,8	3,7	3,4

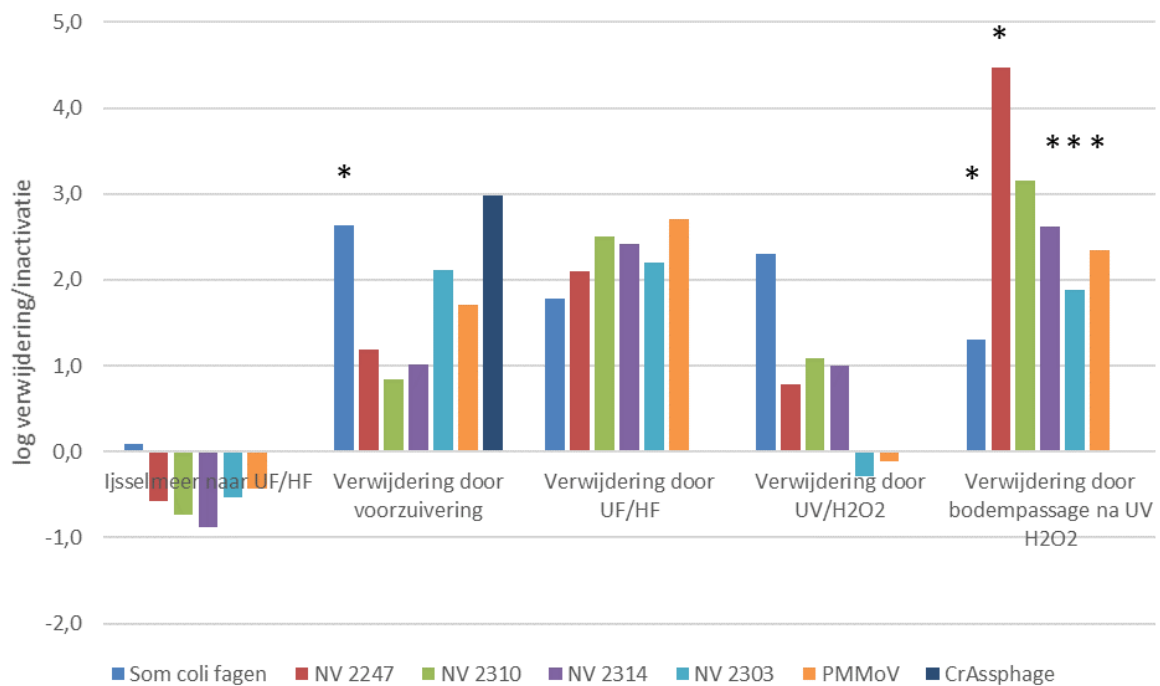
4.2 Monsterlocaties van PWN

De monsters van PWN locaties zijn geconcentreerd door middel van Hemoflow en onderzocht op de aanwezigheid en concentratie van somatische colifagen, natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314, crAssphage en PMMoV, en de ziekteverwekkende virussen adenovirus 40/41, enterovirus, en norovirus. Enterovirus, adenovirus en norovirus zijn, ondanks de grote monstervolumes, niet aangetroffen in de watermonsters. De natuurlijke virussen, somatische colifagen, PMMoV en CrAssphage zijn wel aangetroffen, en zijn weergegeven in Figuur 12.



Figuur 12. Concentratie somatische colifagen, natuurlijke virussen, PMMoV en CrAssphage tijdens drinkwaterproductie bij productielocatie Andijk, membraanfabriek bij Heemskerk en duinpassage in Wijk aan Zee. De gegeven concentraties zijn na hemo-flow-centrifugatie opwerking. Adenovirus, enterovirus en norovirus zijn ook gemeten maar niet aangetroffen, en daarom niet in deze figuur weergegeven. * = onder detectielimiet.

Figuur 12 laat zien dat het ruwe water in het Lekkanaal de hoogste concentratie van de gemeten virussen bevat. In het ruwe water van het IJsselmeer zijn de aantallen minimaal 2 logeenheden lager. In het ruwe water zijn de natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314 in de hoogste concentratie aanwezig. Virus NV2303 en de twee indicatorvirussen PMMoV en CrAssphage zijn ook aanwezig, maar in lagere concentratie. Somatische colifagen worden gevonden in het water van het Lekkanaal, en ook in het IJsselmeer, maar daar in een veel lagere concentratie. Het water uit het Lekkanaal ondergaat een voorzuivering (coagulatie/sedimentatie gevolgd door snelfiltratie) waarna het na menging met water vanaf Andijk naar de zuivering gaat. De beide zuiveringsstraten UF/HF en UV/H₂O₂ en bodempassage in het duin zorgen voor een reductie van het aantal virussen. In Figuur 13 is de verwijdering door deze processen weergegeven.



Figuur 13. Log verwijdering van natuurlijke virussen en PMMoV tijdens drinkwaterproductie bij ps. Andijk, membraanfabriek bij Heemskerk en duinpassage in Wijk aan Zee. * > - waarde

Het ruwe water uit het Lekkanaal wordt voorbehandeld door middel van coagulatie/sedimentatie, gevolgd door snelfiltratie. Daarna wordt het water verder behandeld door UV/H₂O₂. De voorzuivering laat al een verwijdering van virussen zien. Met name somatische colifagen en crAssphagen worden met ongeveer 3 log verwijderd. PMMoV en NV2303 worden met ongeveer 2 log verwijderd, terwijl de overige natuurlijke virussen met ongeveer een log worden verwijderd.

UF/HF verwijdert virussen primair op basis van grootte, al kunnen andere viruseigenschappen ook een rol spelen. Kleinere virussen kunnen een UF membraan soms nog passeren, maar een RO membraan is in theorie een volledige barrière. Echter virussen kunnen soms passeren door imperfecties/beschadigingen in de membraan, of in de installatie (lekkende appendages/seals/O-ringen). Voor de UF/HF zijn de natuurlijke virussen en PMMoV aanwezig in concentraties van minimaal 10³ virussen/l tot meer dan 10⁶ virussen per liter. Met de virusconcentraties aanwezig in het voedingswater is het goed mogelijk een virusreductie door UF/HF processen te meten. Ook somatische colifagen worden in de voeding gemeten, maar in lage concentraties, waardoor verwijdering hiermee lastiger is vast te stellen. Figuur 13 laat zien dat de verwijdering door UF/HF met alle gemeten virussen tussen de 2,1 (NV2247) en 2,7 log (PMMoV) bedraagt. De gemeten verwijdering van somatische colifagen is iets lager dan 2 log. Bij eerdere metingen (nog niet gerapporteerd) worden vaak hogere verwijderingen geregistreerd van ongeveer 3 log voor de UF, en tot onder de detectiegrens na HF. Waarom de verwijdering hier tijdens deze metingen minder is, is niet bekend.

UV/H₂O₂ inactieveert virussen, maar verwijdert ze niet. Somatische colifagen worden gedetecteerd door middel van een plaque test, en deze test detecteert infectieuze fagen. Door UV/H₂O₂ geïnactiveerde fagen worden door deze test niet geteld. Alle andere virussen worden gedetecteerd middels de qPCR. qPCR zal ook door de UV/H₂O₂ geïnactiveerde virussen gedeeltelijk registeren, omdat het DNA ook in geïnactiveerde virussen nog (gedeeltelijk) intact is. Dit blijkt ook uit de gemeten verwijdering/inactivatie. Somatische colifagen laten in dit proces een inactivatie zien van 2,3 log. De andere met qPCR gedetecteerde markers laten een vermindering zien van ongeveer een log, of helemaal geen vermindering van signaal.

Na de UV/H₂O₂ AKF en UF/HF behandeling ondergaat het water een bodempassage door de duinen. Deze stap is erg effectief in het verwijderen van virussen. De verwijdering van de gemeten virussen is groot, en in het water na bodempassage zijn de meeste virussen in aantal gedaald tot onder de detectiegrens. Dat betekent dat de verwijdering groter kan zijn dan kan worden vastgesteld met de metingen. De metingen laten zien dat met virussen die in hoge concentratie voorkomen in het ruwe water, virusverwijdering meetbaar is door de gehele zuivering. Na bodempassage is de concentratie van de meeste virussen zo laag, dat deze onder de detectiegrens ligt.

Tabel 11. Log verwijdering van natuurlijke virussen en PMMoV tijdens drinkwaterproductie bij WPJ Andijk, membraanfabriek bij Heemskerk en duinpassage in Wijk aan Zee. * > - waarde

Proces	Proces in Figuur 2	Somatische colifagen	NV 2247	NV 2310	NV 2314	NV 2303	PMMoV
IJsselmeer naar UF/HF	1 vs 3	0,1	-0,6	-0,7	-0,9	-0,5	-0,4
Lekkanaal naar UV/H ₂ O ₂	2 vs 5	2,6	1,2	0,8	1,0	2,1	1,7
UF/HF	3 vs 4	1,8	2,1	2,5	2,4	2,2	2,7
UV/H ₂ O ₂	5 vs 6	>2,3	0,8	1,1	1,0	-0,3	-0,1
Duinpassage	6 vs 7	>1,3	>4,5	3,2	>2,6	>1,9	> 2,3
Totale verw vanuit Lekk	2 vs 7	>6,2	>6,4	5,1	>4,6	>3,7	>4,0
Totale verw IJsselmeer	1 vs 7	>2,9	>4,1	3,4	>2,6	>1,9	>1,6

Tabel 12. Concentratie natuurlijke virussen, somatische colifagen en PMMoV tijdens drinkwaterproductie bij ps. Andijk, membraanfabriek bij Heemskerk en duinpassage in Wijk aan Zee. De gegeven concentraties zijn na hemoflow-centricon opwerking, met uitzondering van de somatische colifagen waarvoor geen concentratiestap is toegepast.

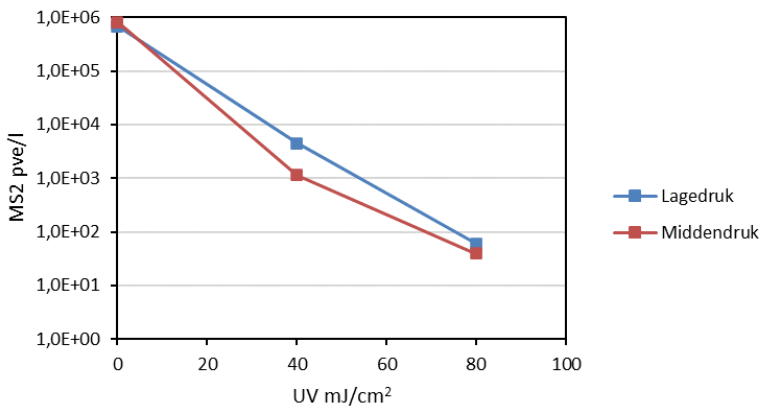
	Somatische colifagen	NV 2247	NV 2310	NV 2314	NV 2303	PMMoV	crAssphage
	pve/l	gk/l	gk/l	gk/l	gk/l	gk/l	gk/l
Ruw Lekkanaal	1,8x10 ³	2,5x10 ⁸	2,8x10 ⁷	4,3x10 ⁶	4,0x10 ⁴	6,2x10 ⁵	2,8x10 ⁴
Ruw IJsselmeer	8,8x10 ⁻¹	1,3x10 ⁶	5,2x10 ⁵	3,5x10 ⁴	5,7x10 ²	2,9x10 ³	8,3x10 ⁰
Influent UF/HF	7,2x10 ⁻¹	4,8x10 ⁶	2,8x10 ⁶	2,6x10 ⁵	2,0x10 ³	7,6x10 ³	
Effluent UF/HF	1,2x10 ⁻²	3,8x10 ⁴	8,9x10 ³	1,0x10 ³	1,2x10 ¹	1,5x10 ¹	
Influent UV/H ₂ O ₂	4,0x10 ⁺⁰	1,6x10 ⁷	4,0x10 ⁶	4,1x10 ⁵	3,0x10 ²	1,2x10 ⁴	3,0x10 ¹
Effluent UV/H ₂ O ₂	<2,0x10 ⁻²	2,7x10 ⁶	3,3x10 ⁵	4,1x10 ⁴	5,8x10 ²	1,5x10 ⁴	
Effluent Duinpassage	<1,0x10 ⁻³	<9,1x10 ¹	2,3x10 ²	<9,7x10 ¹	7,6x10 ⁰	<7,0x10 ¹	

5 Discussie

5.1 Het meten van UV schade aan virussen en bacteriofagen.

In deze studie zijn natuurlijke virussen en een gedoseerde bacteriofaag MS2 blootgesteld aan LP-UV en MP-UV. Voor MS2 is dit eerder gedaan, en ook in de literatuur is beschreven hoe de inactivatie verloopt. De in deze studie uitgevoerde experimenten gedaan met MP-UV wijken af van eerder gepubliceerde resultaten.

Om de inactivatie van deze studie te vergelijken met eerdere resultaten zijn de gegevens uit Figuur 5 genormaliseerd weergegeven in Figuur 14. In Figuur 15 is de inactivatie van MS2 door UV in eerdere studies te zien.



Figuur 14. De genormaliseerde inactivatie van MS2 na blootstelling aan LP-UV en MP-UV in water afkomstig van het Lekkanaal. Gegeven is het gemiddelde (n=2) met de standaarddeviatie (erg klein en daardoor niet zichtbaar). Dit figuur is gelijk aan Figuur 5.

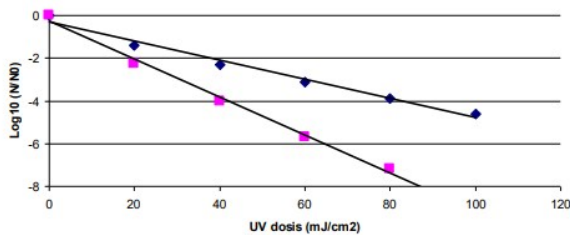


Fig 2. Inactivatie van 1x10⁸ pve/ml MS2 met LP-UV (blauwe meetpunten) en MP-UV (roze meetpunten).

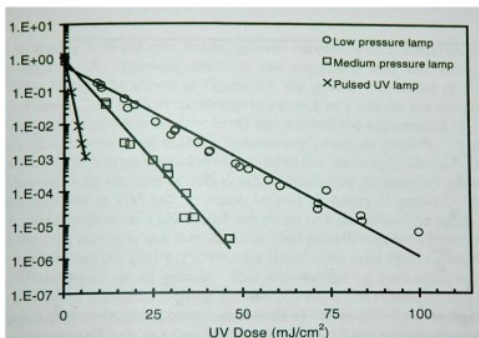


Fig 3. Inactivatie van MS2 met LP-UV en MP-UV (uit Malley, 2004).

Figuur 15. De inactivatie van MS2 door LP-UV en MP-UV in eerder beschreven studies.

Een vergelijking van de gegevens van deze studie met eerdere experimenten laat voor LP-UV een gelijke inactivatie zien. De MP-UV inactivatie verloopt minder goed dan is waargenomen bij eerdere experimenten, en vertoont een knik bij 40 mJ/cm². De eerdere experimenten zijn uitgevoerd in een fosfaatbuffer, terwijl deze experimenten, vanwege de vereiste aanwezigheid van natuurlijke virussen in het water, zijn uitgevoerd met Lekwater. De LP-UV inactivatie verloopt gelijk met eerdere waarnemingen, maar MP-UV niet, en het is daarom niet uit te sluiten dat het verschil in watermatrix (fosfaatbuffer vs oppervlaktewater) van invloed is op de inactivatie door MP-UV. Mogelijk wordt de transmissie van verschillende golflengten van MP-UV tegengehouden, en kan hiermee het verschil met fosfaatbuffer worden verklaard, maar dit is (nog) niet verder onderzocht. Een andere optie is dat MS2 beschermd wordt tegen de UV-straling door deeltjes die aanwezig zijn in het Lekwater, wat niet het geval is in een artificiële fosfaatbuffer. MS2 heeft dan minder UV-straling ontvangen dan berekend (17, 18). Echter, dit effect zou dan ook op moeten treden bij de lagedruk-experimenten maar is hier minder duidelijk zichtbaar.

Ook de DNA schade door MP-UV laat een lastig te verklaren resultaat zien (Figuur 6, Figuur 7). Er is meer schade bij 40 mJ/cm² dan bij 80 mJ/cm². Dat is erg onwaarschijnlijk en is ook geen meetruis aangezien de resultaten van de duplo-metingen nagenoeg gelijk zijn aan elkaar. Wat de reden hiervan is, is op basis van deze informatie niet te geven. Omdat de inactivatie van MS2 met de plaque assay bij 80 mJ/cm² hoger is dan bij 40 mJ/cm², is het uitgesloten dat monsters zijn omgewisseld.

UV beschadigt zowel het DNA/RNA van het virus als het capsid, de eiwitmantel om het virus. LP-UV geeft vooral beschadiging aan het DNA, terwijl MP-UV door een groter golflengtebereik ook beschadigingen aan het capsid initieert. De DNA schade is lastig met voldoende gevoeligheid te kwantificeren, omdat DNA of RNA beschadiging niet in alle gevallen resulteert in DNA schade die van grote invloed is op de qPCR. Er zijn verschillende methoden beschreven om de gevoeligheid van het meten van schade aan DNA door UV te verhogen. Een langer DNA fragment “vangt” meer beschadiging, en zal daardoor een duidelijker resultaat laten zien bij de qPCR. Figuur 16 laat hiervan, weliswaar op antibioticaresistentiegenen als target, een voorbeeld zien. Om een langer amplicon te kunnen maken is het wel noodzakelijk om voldoende genetische informatie te hebben van het doelvirus.

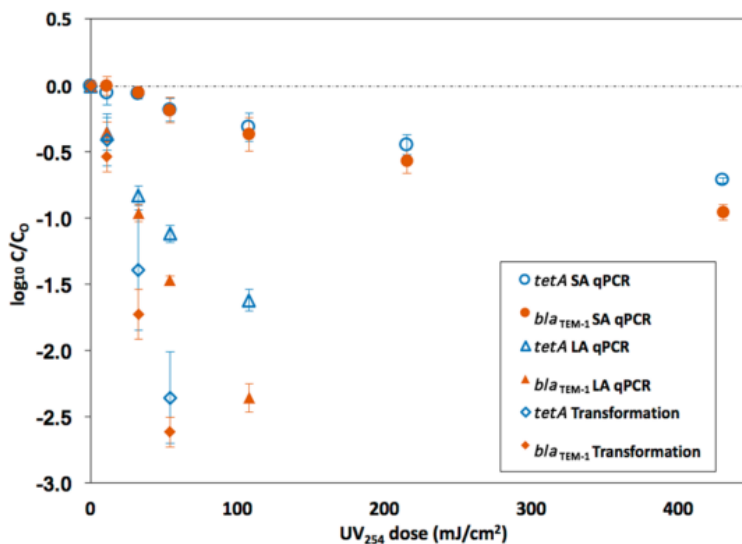


Figure 3. *tetA* and *bla*_{TEM-1} degradation versus UV dose measured with qPCR short amplicon (SA), long amplicon (LA), and transformation assays. The error bars indicate one standard deviation from the mean ($n \geq 3$). For visibility, data has been pooled.

Figuur 16. Inactivatie van ARGs *tetA* en *bla*_{TEM} gemeten met een kort amplicon, een lang amplicon en de transformatietest. Uit (22).

Naast het vergroten van de amplicon lengte, zijn ook andere methoden beschreven om het effect en de schade van UV op virussen beter te kunnen bepalen. Een voorbeeld daarvan is enzymatic treatment PCR (ET-PCR). Bij deze methode wordt naast schade aan het RNA ook schade aan het capsid gemeten. Deze methode is veel gevoeliger, maar tot nu toe alleen getest op MS2 in labexperimenten (19). In de eerdere testen is de reguliere qPCR vergeleken met ET-PCR. MS2 werd daarin blootgesteld aan 100 mJ/cm² met LP-UV en MP-UV, waarna met de qPCR een Ct toename werd gemeten van 2 respectievelijk 3 Ct. ET-PCR liet onder deze condities een toename zien van 9 en 15 Ct voor respectievelijk LP-UV en MP-UV. Omdat 3,3 Ct gelijk staat aan een vermeerdering van DNA met een factor 10, is de ET-PCR methode mogelijk 100 tot 1000 keer gevoeliger, en daardoor veel beter in staat om DNA schade aan virussen door UV aan te tonen. Deze methode zou kunnen worden getest op de natuurlijke virussen, om te bepalen of de inactivatie van natuurlijke virussen na blootstelling aan UV net als MS2 gevoelig kan worden gemeten. Als dit mogelijk is, dan kunnen de natuurlijke virussen ook worden ingezet om UV desinfectie, en mogelijk ook andere desinfectieprocessen door te meten op de inactivatie van virussen.

In deze studie is de DNA schade aan natuurlijke virussen bepaald met korte amplicons van ongeveer 100 baseparen. Deze amplicons zijn specifiek ontworpen voor een goede kwantificatie van virussen in watermonsters, maar zijn te kort om schade aan het DNA weer te geven. Met deze korte amplicons is de qPCR niet gevoelig genoeg. Resumerend ontstaat er wel schade door UV aan het DNA, maar is die schade met de huidige qPCR amplicons niet goed vast te stellen. Door langere amplicons, of het gebruik van een andere methode zoals ET-PCR is het misschien mogelijk om UV schade gevoeliger te kunnen vaststellen.

5.2 Samenvatting van de resultaten van virusverwijdering door zuiveringsprocessen bij De Gavers en locaties van PWN.

Bij de productielocatie De Gavers en een aantal locaties van PWN zijn eenmalig groot volume monsters genomen om een beeld te krijgen van de verwijdering van somatische colifagen, natuurlijke virussen en de nieuwe virusmerkers CrAssphage en PMMoV. Daarnaast zijn drie belangrijke in het water voorkomende voor de mens ziekteverwekkende virussen, namelijk Adenovirus 40/41, Enterovirus, en Norovirus gemeten. Ondanks het nemen van groot volumes zijn Adenovirus 40/41, Enterovirus, en Norovirus niet aangetroffen. Dit zal mede veroorzaakt worden doordat een aantal monsternames door coronamaatregelen moest worden uitgesteld van de winter naar het voorjaar, aangezien bekend is dat de concentratie pathogene virussen het hoogste is in de winter (13). De nieuwe merkers CrAssphage en PMMoV zijn wel aangetroffen, waarbij CrAssphage in de laagste concentratie werd aangetroffen. CrAssphage is de meest voorkomende bacteriofaag in het darmkanaal van de mens, en geeft daarmee een indicatie van de fecale verontreiniging van het ruwe water. Ook van PMMoV is bekend dat het in hoge concentratie aanwezig is in humane fecaliën, en ook somatische colifagen zijn gerelateerd aan fecale besmetting. Een vergelijking van het oppervlaktewater van de Gavers, het IJsselmeer en het Lekkanaal laat zien dat ten tijde van de monsternamen het Lekkanaal de hoogste concentratie bevatte van deze drie fecale indicator virussen, gevolgd door het IJsselmeer en daarna het ruwe water van de Gavers. Dit is een indicatie dat de fecale belasting van de bemonsterde waterlocaties IJsselmeer en het ruwe water van de Gavers op dat moment mogelijk minder hoog was, en is een mogelijke verklaring waarom geen ziekteverwekkende (want afkomstig van humane feces) virussen zijn gevonden. Omdat een doel van het onderzoek was om eigenschappen van ziekteverwekkende virussen te vergelijken met alle markervirussen, is dit voor het onderzoek jammer. Door op vooropgezette momenten het oppervlaktewater te meten op fecale verontreiniging, bijvoorbeeld door het meten van de bovengenoemde fecale indicatoren, is het waarschijnlijk mogelijk om het moment van monsternamen beter gelijk te laten lopen met een hogere fecale verontreiniging van het oppervlaktewater. De virusconcentraties bij Nederlandse oppervlaktewater-innamepunten zijn het hoogst in de wintermaanden, dus zouden metingen idealiter in de wintermaanden worden gepland. Ook zijn innamepunten bekend waar de fecale verontreiniging relatief hoger is omdat er minder verblijftijd is tussen de RWZI-lozingspunten en de innamepunten (zoals het Lekkanaal bij Nieuwegein en de Maas bij Roosteren of het Lateraal kanaal bij Heel). Desondanks is bij de bemonstering in december 2020 van het Lekkanaal geen van de ziekteverwekkende virussen aangetroffen.

Bij coagulatie/sedimentatie en snelfiltratie zijn de onderlinge verschillen tussen de virussen op het gebied van verwijdering door deze processen groot. Virus NV2310 wordt door deze processen het minst verwijderd, wat een indicatie is dat dit virus eigenschappen heeft die ervoor zorgen dat het virus niet gemakkelijk hecht aan deeltjes in het water.

Eerdere metingen bij de Gavers (21) lieten zien dat de virusverwijdering door de defosfatatie en de vlokkenfilters in februari groter was (tussen 1,7 en 2,6 log) dan in juni (tussen 0,2 en 0,9 log). Ook tijdens deze studie (monsternamen op 25 mei) laten deze processen weinig verwijdering zien (tussen de 0 en 0,9 log) voor NV2247, NV2310 en NV2314, en PMMoV. Somatische colifagen worden tijdens deze studie verwijderd met 1,3, resp 1,2 log bij defosfatatie en vlokkenfiltratie. Tijdens deze studie zijn alleen monsters genomen in mei, maar de eerdere studie laat zien dat er een aanzienlijk verschil kan zijn tussen de verwijdering door coagulatie/sedimentatie/filtratie processen in de verschillende maanden.

Op beide locaties wordt gebruik gemaakt van membraanzuivering, UF bij de Gavers en UF/HF bij PWN. De verwijdering bedraagt bij de Gavers tussen de 1,1 en 1,5 log voor de gemeten virussen. Dit is minder dan bij eerdere metingen is vastgesteld. Destijds werd een virusverwijdering van de natuurlijke virussen gemeten van 3-4 log. Waarom de verwijdering nu lager is, is niet bekend. Bij PWN wordt gebruik gemaakt van UF en HF, en verwijderen de membranen tussen de 1,8 en 2,7 log.

Duinpassage is een effectieve procedure om virussen te verwijderen, en dat blijkt ook nu uit de resultaten. NV2310 wordt met 3,2 log verwijderd, en de concentratie van de andere gemeten virussen neemt af tot onder de detectiegrens.

UV/H₂O₂ inactieveert virussen, maar laat het DNA/RNA afhankelijk van de dosis vaak gedeeltelijk intact. Om deze reden meet je met de qPCR geen duidelijke virusafname na UV/H₂O₂. Daarom is het kwantificeren van virussen voor en na UV/H₂O₂ met qPCR, als maat voor de virusafname, geen goede methode. Om de effectiviteit te meten van UV/H₂O₂ kan, indien ze aanwezig zijn in een voldoende hoge concentratie, gebruik worden gemaakt van bacteriofagen die kunnen worden gemeten met een plaque assay.

De monsternamen bij de Gavers en de locaties van PWN zijn één keer gedaan, en bovenstaande resultaten zijn het resultaat van één meting. Om een beter en meer betrouwbaar beeld te krijgen van virussen door de verschillende zuiveringsstappen zijn meer metingen nodig. Daarom worden bovenstaande resultaten als indicatief beschouwd.

6 Conclusies en aanbevelingen

6.1 Conclusies

6.1.1 Conclusies over viruseigenschappen

Met qPCR wordt geringe beschadiging gemeten van het DNA na behandeling met UV tot dosis van 80 mJ/cm² van de drie gemeten natuurlijke virussen. Ook MS2 laat weinig beschadiging zien. De plaque assay laat zien dat MS2 bij 80 mJ/cm² ongeveer 4 log is geïnactiveerd.

De standaard gebruikte qPCR methode om natuurlijke virussen te kwantificeren is niet geschikt om DNA schade vast te stellen, maar het is op verschillende manieren mogelijk de qPCR methode zo aan te passen dat deze methode vermoedelijk beter in staat zal zijn om DNA schade te meten. Dat betekent dat het met een andere of aangepaste methode naar verwachting beter mogelijk is om gevoelig UV schade aan (natuurlijke) virussen te meten.

De virussen NV2247, NV2310, NV2314 en NV2303 hebben een grootte van tussen de 30 en 100 nm. Virus NV2247 en MS2 werden in zeer lage concentratie gedetecteerd na het 10 nm filter. Vermoedelijk is de grootte van NV2247 daarom ongeveer gelijk aan die van MS2, en zou dan rond de 20 - 30 nm bedragen.

6.1.2 Conclusies over het meten van de virusverwijdering door zuiveringsprocessen

De natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314, de markers PMMoV en CrAssphage en somatische colifagen zijn aangetroffen in het ruwe water van de productielocaties Andijk en de Gavers. In 1000 liter (Andijk) en 100 liter (de Gavers) zijn geen voor de mens ziekteverwekkende Adenovirus 40/41, Enterovirus, en Norovirus aangetroffen.

Hoewel de dataset klein is, laten de fecale indicatorvirussen somatische colifagen, PMMoV en CrAssphage een gelijke trend zien bij oppervlaktewater met vermoedelijk verschillende gradaties van fecale vervuiling.

Membranefiltratie laat voor alle in deze studie geteste virussen een redelijk gelijk verwijderingsprofiel zien. Bij de Gavers is de gemeten verwijdering door UF tussen de 1,1 en 1,5 log voor de drie natuurlijke virussen, som colifagen en PMMoV, terwijl bij PWN Heemskerk voor de UF/HF een verwijdering is gemeten van 1,8 log voor somatische colifagen tot 2,7 log voor PMMoV met tussenliggende waarden voor 4 gemeten natuurlijke virussen. In een eerder onderzoek met natuurlijke virussen bij drinkwaterproductielocatie De Gavers werd door de UF meer dan 3 log verwijderd van de natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314 (21). Ook bij de UF/HF bij Heemskerk laat bij een ander onderzoek betere verwijdering zien. Het is niet bekend waarom in deze studie minder verwijdering wordt vastgesteld, en meer en frequentere metingen kunnen een beter beeld geven van de virusverwijdering, en processen die dat proces beïnvloeden.

Virusinactivatie door oxidatieve processen, zoals UVH₂O₂ kan met virussen die worden gekwantificeerd door middel van qPCR niet goed worden bepaald. Dit geldt in deze studie voor de natuurlijke virussen en PMMoV. Somatische colifagen, kunnen de inactivatie wel kwantificeren, omdat ze middels de plaque assay worden bepaald, mits ze in voldoende hoge concentratie voorkomen in het te onderzoeken water. Helaas is dat vaak niet het geval.

Duinpassage zorgt voor veel virusverwijdering, waarin NV2310 een virusverwijdering laat zien van 3,2 log. De andere virussen nemen in concentratie af tot onder de detectielimiet.

Coagulatie/vlokkenfiltratie bij de Gavers laat een wisselende virusverwijdering zien. Virus NV2247 en NV2310 worden met ongeveer 3 log verwijderd, terwijl de somatische colifagen geen verwijdering laten zien.

6.2 Aanbevelingen

Het bepalen van de DNA schade door UV of andere oxidatieve processen aan virusmerkers zoals de natuurlijke virussen, PMMoV en CrAssphage is met de huidige qPCR niet mogelijk. Omdat somatische colifagen vaak niet in een voldoende hoge concentratie aanwezig zijn in het ruwe water, kunnen ook deze hier niet voor worden ingezet. Aanbevolen wordt om bestaande methodieken, zoals het aanpassen van de qPCR amplicons, en de mogelijkheid van ET-PCR, of andere technieken die schade aan virussen kunnen vaststellen (23), te onderzoeken, om op deze wijze toch de snel en gevoelig schade van UV en oxidatieve technieken te kunnen vaststellen. Een andere mogelijkheid is de toepassing van de EMA/PMA-qPCR waarmee onderscheid kan worden gemaakt tussen virussen met een intact of niet-intact membraan (24). Mocht dit succesvol zijn, dan is het mogelijk om de inactivatie door UV en oxidatieve technieken in een full scale zuivering te bepalen door middel van de natuurlijke virusmerkers en PMMoV. Waar de natuurlijke virussen nu alleen nog ingezet kunnen worden voor de bepalen van de virusverwijdering door fysische processen (deeltjesverwijdering), kunnen ze dan ook voor oxidatieve processen worden ingezet. Dat maakt het in potentie mogelijk om met enkele virusmerkers de gehele zuivering door te meten.

De in deze studie gemeten nieuwe indicatoren, somatische colifagen, PMMoV en CrAssphage, met een waarschijnlijke relatie met fecale verontreiniging, kunnen gedurende een langere tijd naast elkaar worden gemeten in oppervlaktewater bij inname punten. Door deze metingen ook te koppelen aan andere fecale indicatoren, zoals *E. coli* en Enterococci, zou het, bij een duidelijke relatie tussen deze parameters, mogelijk moeten zijn gevoeliger fecale belasting van het water te meten dan nu wordt gedaan door middel van *E. coli* en enterococci. Dit kan gevoeliger, omdat de fecale virusindicatoren, en dan met name PMMoV in een veel hogere concentratie dan *E. coli* en enterococci voorkomen in fecaal belast oppervlaktewater.

Het doormeten van twee zuiveringen in deze studie was een 1^e aanzet tot het beter in kaart brengen van de verwijdering van zowel het scala aan indicatorvirussen als de ziekteverwekkers. Helaas waren de ziekteverwekkers in te lage concentratie aanwezig. De wel gemeten indicatorvirussen zijn gemeten door de gehele zuivering tot aan het reine water, echter maar eenmalig. Dat maakt het moeilijk om de resultaten, en met name resultaten die anders zijn dan verwacht, zoals de minder goede performance van de UF en de UF/HF, te duiden. Om een goed beeld te krijgen van virusverwijdering zal er gedurende een langere tijd bij een zuivering moeten worden gemeten met groot volume monsters. Dan kan met meer zekerheid worden bepaald hoe effectief virussen tijdens de verschillende seizoenen, en door verschillende zuiveringsprocessen worden verwijderd of geïnactiveerd.

7 Referenties

1. Stachler E, Kelty C, Sivaganesan M, Li X, Bibby K, Shanks OC. 2017. Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement. *Environmental Science & Technology* 51:9146-9154.
2. Farkas K, Walker DI, Adriaenssens EM, McDonald JE, Hillary LS, Malham SK, Jones DL. 2020. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Research* 181:115926.
3. Hornstra L. 2016. Nieuwe indicatororganismen om de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen te bepalen. KWR, BTO 2016.041. Nieuwegein.
4. Heijnen L, van der Veer A, Hornstra L. 2018. Nieuwe virussen als procesindicator voor zuiveringsstappen. KWR, BTO 2018.036. Nieuwegein.
5. Hornstra LM, Rodrigues da Silva T, Blankert B, Heijnen L, Beerendonk EF, Cornelissen ER, Medema GJ. 2019. Monitoring the integrity of reverse osmosis membranes using novel indigenous freshwater viruses and bacteriophages (Open Access). *Environmental Science: Water Research & Technology* 5:1535-1544.
6. Kitajima M, Sassi HP, Torrey JR. 2018. Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *npj Clean Water* 1:19.
7. Farkas K, Adriaenssens EM, Walker DI, McDonald JE, Malham SK, Jones DL. 2019. Critical Evaluation of CrAssphage as a Molecular Marker for Human-Derived Wastewater Contamination in the Aquatic Environment. *Food and Environmental Virology* 11:113-119.
8. Kato R, Asami T, Utagawa E, Furumai H, Katayama H. 2018. Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation-sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan. *Water Research* 132:61-70.
9. Asami T, Katayama H, Torrey JR, Visvanathan C, Furumai H. 2016. Evaluation of virus removal efficiency of coagulation-sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand. *Water Research* 101:84-94.
10. Shkoporov AN, Khokhlova EV, Fitzgerald CB, Stockdale SR, Draper LA, Ross RP, Hill C. 2018. Φ CrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects *Bacteroides intestinalis*. *Nature Communications* 9:4781.
11. Guerin E, Shkoporov A, Stockdale SR, Clooney AG, Ryan FJ, Sutton TDS, Draper LA, Gonzalez-Tortuero E, Ross RP, Hill C. 2018. Biology and Taxonomy of crAss-like Bacteriophages, the Most Abundant Virus in the Human Gut. *Cell Host & Microbe* 24:653-664.e656.
12. USEPA. 2015. Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality. USEPA, EPA 820-R-15-098. Washington, DC, USA.
13. Lodder WJ, de Roda Husman AM. 2005. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1453-1461.
14. Bolton JR, Linden KG. 2003. Standardization of Methods for Fluence (UV Dose) Determination in Bench-Scale UV Experiments. *Journal of Environmental Engineering* 129:209-215.
15. Lodder WJ, Wuite M, de Roda Husman AM, Rutjes SA. 2013. Environmental Surveillance of Human Parechoviruses in Sewage in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 79:6423-6428.
16. Haramoto E, Kitajima M, Kishida N, Konno Y, Katayama H, Asami M, Akiba M. 2013. Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 79:7413.
17. Templeton MR, Andrews RC, Hofmann R. 2005. Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light. *Water Research* 39:3487-3500.
18. Templeton MR, Andrews RC, Hofmann R. 2007. Removal of particle-associated bacteriophages by dual-media filtration at different filter cycle stages and impacts on subsequent UV disinfection. *Water Research* 41:2393-2406.
19. Hornstra LM. 2013. De inactivatie van MS2 door lage druk en midden druk UV. KWR, BTO 2013.027(s). Nieuwegein.
20. Gentile GJ, Cruz MC, Rajal VB, Fidalgo de Cortalezzi MM. 2018. Electrostatic interactions in virus removal by ultrafiltration membranes. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6:1314-1321.
21. Hornstra LM. 2020. Natuurlijke virussen om de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen te bepalen. KWR, BTO 2020.009. Nieuwegein.
22. Chang PH, Juhrend B, Olson TM, Marrs CF, Wigginton KR. 2017. Degradation of Extracellular Antibiotic Resistance Genes with UV254 Treatment. *Environmental Science & Technology* 51:6185-6192.

23. Monteiro S, Santos R. 2018. Enzymatic and viability RT-qPCR assays for evaluation of enterovirus, hepatitis A virus and norovirus inactivation: Implications for public health risk assessment. *Journal of Applied Microbiology* 124:965-976.
24. van Bel N, Heijnen L, van der Veen A. 2018. EMA/PMA-qPCR methodeontwikkeling voor de detectie van infectieuze en niet-infectieuze Adenovirussen in water KWR, BTO 2018.016. Nieuwegein.

Determination of the "Petri Factor"

Steps:

1. Draw a 0.5 cm x 0.5 cm grid and place the center of the grid at the center of the collimated beam
2. Measure the UV irradiance (with a radiometer) every 0.5 cm in the x and y directions and place the readings into columns **S** and **X** below. It is only necessary to take readings out to 0.5 cm beyond the radius of the Petri dish (or other container to be used). The units do not matter since ratios are calculated.
3. The Petri factor is calculated in Cell **CW151** and is also displayed in Cell **K34**.

UV Distribution across the Petri Dish for a low pressure UV Lamp

		Meter				Meter	
x	y	Reading	Ratio	x	y	Reading	Ratio
0	-10,0	0,00	0,000	-10,0	0	0,00	0,000
0	-9,5	0,00	0,000	-9,5	0	0,00	0,000
0	-9,0	0,00	0,000	-9,0	0	0,00	0,000
0	-8,5	0,00	0,000	-8,5	0	0,00	0,000
0	-8,0	0,00	0,000	-8,0	0	0,00	0,000
0	-7,5	0,00	0,000	-7,5	0	0,00	0,000
0	-7,0	0,00	0,000	-7,0	0	0,00	0,000
0	-6,5	0,00	0,000	-6,5	0	0,00	0,000
0	-6,0	0,00	0,000	-6,0	0	0,00	0,000
0	-5,5	0,00	0,000	-5,5	0	0,00	0,000
0	-5,0	0,00	0,000	-5,0	0	0,00	0,000
0	-4,5	3,54	0,983	-4,5	0	3,30	0,922
0	-4,0	3,59	0,997	-4,0	0	3,36	0,939
0	-3,5	3,60	1,000	-3,5	0	3,41	0,953
0	-3,0	3,61	1,003	-3,0	0	3,46	0,966
0	-2,5	3,62	1,006	-2,5	0	3,50	0,978
0	-2,0	3,64	1,011	-2,0	0	3,54	0,989
0	-1,5	3,64	1,011	-1,5	0	3,56	0,994
0	-1,0	3,63	1,008	-1,0	0	3,57	0,997
0	-0,5	3,62	1,006	-0,5	0	3,58	1,000
0	0,0	3,60	1,000	0,0	0	3,58	1,000
0	0,5	3,59	0,997	0,5	0	3,59	1,003
0	1,0	3,56	0,989	1,0	0	3,58	1,000
0	1,5	3,53	0,981	1,5	0	3,56	0,994
0	2,0	3,50	0,972	2,0	0	3,54	0,989
0	2,5	3,46	0,961	2,5	0	3,52	0,983
0	3,0	3,41	0,947	3,0	0	3,48	0,972
0	3,5	3,37	0,936	3,5	0	3,42	0,955
0	4,0	3,32	0,922	4,0	0	3,38	0,944
0	4,5	3,26	0,906	4,5	0	3,32	0,927
0	5,0	0,00	0,000	5,0	0	0,00	0,000
0	5,5	0,00	0,000	5,5	0	0,00	0,000
0	6,0	0,00	0,000	6,0	0	0,00	0,000
0	6,5	0,00	0,000	6,5	0	0,00	0,000
0	7,0	0,00	0,000	7,0	0	0,00	0,000
0	7,5	0,00	0,000	7,5	0	0,00	0,000
0	8,0	0,00	0,000	8,0	0	0,00	0,000
0	8,5	0,00	0,000	8,5	0	0,00	0,000
0	9,0	0,00	0,000	9,0	0	0,00	0,000
0	9,5	0,00	0,000	9,5	0	0,00	0,000
0	10,0	0,00	0,000	10,0	0	0,00	0,000

Berekening 'Petri Factor'

Determination of the "Petri Factor"									
Steps:									
1. Draw a 0.5 cm x 0.5 cm grid and place the center of the grid at the center of the collimated beam									
2. Measure the UV irradiance (with a radiometer) every 0.5 cm in the x and y directions and place the readings into columns C and H below. It is only necessary to take readings out to 0.5 cm beyond the radius of the Petri dish (or other container to be used). The units do not matter since ratios are calculated.									
3. Place the Petri dish "inner" diameter into Cell H43. Measure carefully with a plastic mm ruler or better with a pair of calipers.									
4. The Petri factor is calculated in Cell AC76 and is automatically transferred to the "Fluence Calculations" Worksheet.									
UV Distribution across the Petri Dish for a low pressure UV Lamp									
x	y	Meter Reading		Ratio	x	y	Meter Reading		Ratio
		y					x		
		uW/cm2					uW/cm2		
0	-6,0		0,000		-6,0	0		0,000	
0	-5,5		0,000		-5,5	0		0,000	
0	-5,0		0,000		-5,0	0		0,000	
0	-4,5	1,280	0,996		-4,5	0	1,229	0,972	
0	-4,0	1,285	1,000		-4,0	0	1,241	0,981	
0	-3,5	1,288	1,002		-3,5	0	1,249	0,987	
0	-3,0	1,290	1,004		-3,0	0	1,253	0,991	
0	-2,5	1,290	1,004		-2,5	0	1,255	0,992	
0	-2,0	1,292	1,005		-2,0	0	1,258	0,994	
0	-1,5	1,294	1,007		-1,5	0	1,260	0,996	
0	-1,0	1,292	1,005		-1,0	0	1,260	0,996	
0	-0,5	1,290	1,004		-0,5	0	1,262	0,998	
0	0,0	1,285	1,000		0,0	0	1,265	1,000	
0	0,5	1,279	0,995		0,5	0	1,265	1,000	
0	1,0	1,271	0,989		1,0	0	1,262	0,998	
0	1,5	1,262	0,982		1,5	0	1,260	0,996	
0	2,0	1,253	0,975		2,0	0	1,258	0,994	
0	2,5	1,242	0,967		2,5	0	1,252	0,990	
0	3,0	1,234	0,960		3,0	0	1,245	0,984	
0	3,5	1,225	0,953		3,5	0	1,245	0,984	
0	4,0	1,214	0,945		4,0	0	1,243	0,983	
0	4,5	1,202	0,935		4,5	0	1,235	0,976	
0	5,0		0,000		5,0	0		0,000	
0	5,5		0,000		5,5	0		0,000	
0	6,0		0,000		6,0	0		0,000	
Petri Dish Diameter = 8,90 cm									

Water absorptie

Calculation of Water Absorbance in 1 cm Path					
In order to determine the Water Factor in 'Dose Calculations' worksheet, INSERT the absorption spectrum (1 cm cell, 200-300 nm) of the solution to be irradiated in the YELLOW cells on this worksheet.					
THEN, to determine the Water Factor, copy the values from the BLUE cells on this worksheet to the YELLOW highlighted cells on the 'Dose Calculations' worksheet.					
Wavelength/ nm	Water Sample abs/ 1 cm	Average Abs in 5 nm band	Wavelength Interval	Average Abs Coeff (cm-1) in 5 nm band	
200	0,7650		200-204	0,70174	
201	0,7284		205-209	0,58804	
202	0,6958	0,7017	210-214	0,48304	
203	0,6714		215-219	0,36674	
204	0,6481		220-224	0,26318	
205	0,6279		225-229	0,18508	
206	0,6083		230-234	0,13768	
207	0,5886	0,5880	235-239	0,11168	
208	0,5673		240-244	0,09804	
209	0,5481		245-249	0,09048	
210	0,5276		250-254	0,08594	
211	0,5058		255-259	0,08228	
212	0,4837	0,4830	260-264	0,07914	
213	0,4610		265-269	0,07584	
214	0,4371		270-274	0,07192	
215	0,4137		275-279	0,0676	
216	0,3901		280-284	0,06296	
217	0,3665	0,3667	285-289	0,0582	
218	0,3431		290-294	0,05354	
219	0,3203		295-299	0,04916	
220	0,3019				
221	0,2813				

