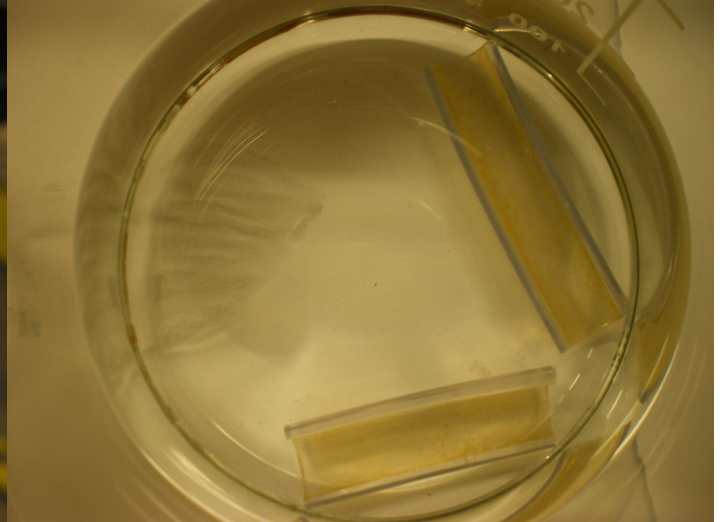
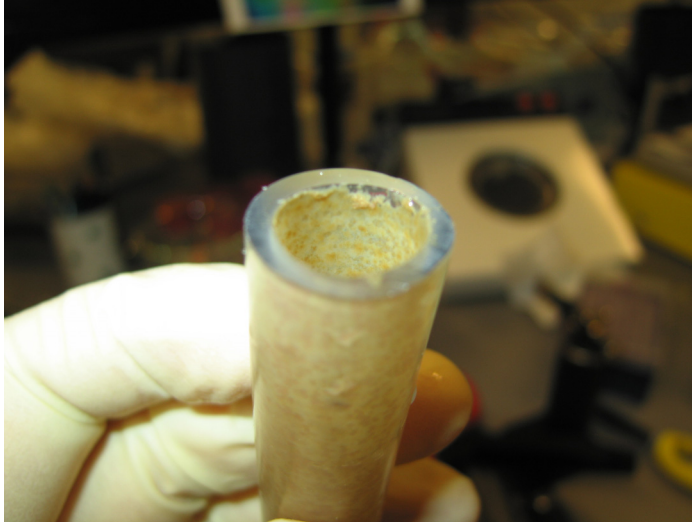
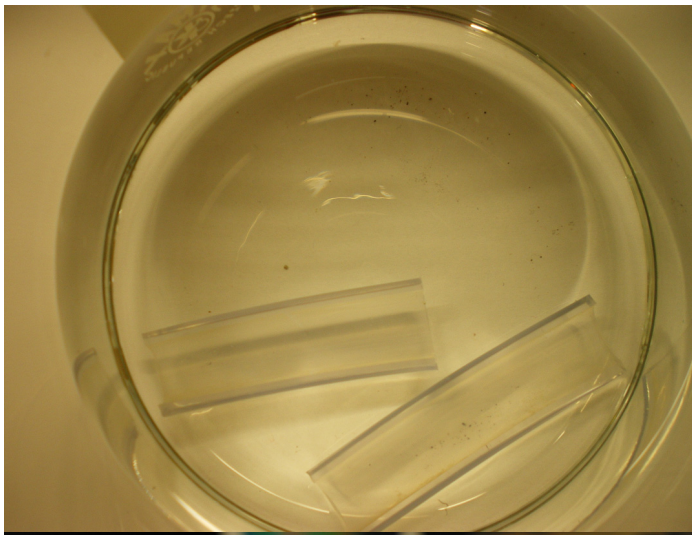




Ontwikkeling van een laboratoriumtest ter bepaling van de effectiviteit van reinigingsmiddelen en procedures om biofilms te verwijderen

BTO 2010.047
Oktober 2010

Ontwikkeling van een laboratoriumtest ter bepaling van de effectiviteit van reinigingsmiddelen en procedures om biofilms te verwijderen

BTO 2010.047
Oktober 2010

© 2010 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

Ontwikkeling van een laboratoriumtest ter bepaling van de effectiviteit van reinigingsmiddelen en procedures om biofilms te verwijderen

Projectnummer

B111723

Onderzoeksprogramma 's

Microbiologie en Waterbehandeling

Projectmanager

Niels Dammers

Opdrachtgever

BTO

Kwaliteitsborger

Dick van der Kooij

Auteurs

Wim Hijnen, Sarah Lahondes, Asmail Asgadaouan, Emile Cornelissen en D. van der Kooij

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Samenvatting

Biofouling van spiraal-gewonden membranen (SWM) wordt veroorzaakt door de groei en accumulatie van biomassa in het voedingskanaal van de membranen. Periodiek schoonmaken of Cleaning in place (CIP) van deze membranen is belangrijk om het probleem van biofouling te beheersen en daarmee een economisch toepasbaar proces te realiseren. Verwijdering van biofilms in CIP procedures is meestal een zaak van “trial and error” in combinatie met informatie van leveranciers van commercieel verkrijgbare chemische producten. Er is behoefte aan een kosten effectieve, simpele en betrouwbare test om de efficiëntie van deze reinigingsproducten en procedures te evalueren. De studie gepresenteerd in dit rapport is het vervolg op eerdere onderzoeken om een dergelijke test te ontwikkelen en is toegespitst op drie aspecten:

- productie van standaard biofilmmonsters om middelen en procedures te testen onder goed geconditioneerde omstandigheden;
- kwantificering van de biomassa concentratie in deze biofilms met analytische methoden die geschikt zijn voor de destructieve condities bij de reiniging;
- een simpele en flexibele laboratorium test om chemicaliën en procedures te testen.

Het startpunt was een concept testprotocol waarmee resultaten werden behaald die nog niet wezen op een robuuste test met reproduceerbare resultaten. Belangrijke doelstelling was om het bestaande protocol te optimaliseren en te evalueren of met de geoptimaliseerde methode testmiddelen en procedures reproduceerbaar van elkaar kunnen worden onderscheiden op reinigingseffect (cleaning efficiency).

Biofilm productie

De productie van stabiele en homogene biofilmmonsters is verder onderzocht en ontwikkeld. De conclusie was dat PVC-P gebruikt kan worden als een substratum voor hechting en groei van biofilms en dat daarmee stabiele en homogene monsters kunnen worden gemaakt. Voorwaarde is dat de operationele condities als volgt zijn: een systeem zonder nutrient- en zuurstoflimitatie waarin het water bij een temperatuur van 25°C in het donker wordt gerecirculeerd en circa eens per uur wordt ververs. De minimum biofilm productietijd is circa 6 weken. Door verschil o.a. in langsstroomsnelheid kan de weerstand van de geproduceerde biofilm voor reiniging variëren. Dit laat zien dat er behoefte is aan extra onderzoek naar het effect van de biofilmeigenschappen die kunnen variëren naar leeftijd, samenstelling (combinatie met andere geaccumuleerde materialen zoals metalen) en historie van de biofilm (reiniging, biociden) op de efficiëntie van reiniging. In de laatste fase is een nieuw biofilm productie unit getest om direct toepasbare biofilmplaatjes te produceren om beter geconditioneerde omstandigheden. Voorlopige resultaten laten zien dat dit systeem met PVC-P plaatjes een alternatief is voor de biofilmmonsters geproduceerd van PVC-P slang.

Biomassa concentraties

De volgende aspecten van de biomassa isolatie en bepaling zijn geëvalueerd en geoptimaliseerd:

- de reinigingsprocedure van de borstels die worden gebruikt om de biofilm te scheiden van het oppervlak;
- homogenisatie van de biofilm suspensies voor biomassa analyse;
- monsteropslag voor analyse.

Dit leverde een gestandaardiseerde procedure op om biomassa concentraties in biofilmmonsters van reinigingstesten te meten.

In eerdere studies zijn adenosinetrifosfaat (ATP), totaal directe celtelling (TDC) en de koolhydratenbepaling volgens Dubois (CH) gebruikt om de reinigingsefficiëntie (cleaning efficiency of CE) te bepalen. In de huidige studie is de TOC analyse die is aangepast voor biomassa deeltjes ook meegenomen. De TDC resultaten waren te variabel en de bepaling in gereinigde monsters was soms problematisch door klustering van cellen. ATP is niet geschikt om de hoeveelheid geïnactiveerde biomassa na een chemische reiniging te bepalen. De ATP-reductie onder dergelijke condities staat voor de mate van penetratie van de chemische middelen in de biofilm en de inactivatie en/of celinhoud lekkage uit de biofilm. Opvallend was dat de trends in CE die met de ATP parameter werden bepaald overeenkwam met de trends bepaald met CH als totaal parameter. Vanwege deze overeenkomst en

omdat de parameter goedkoop en snel is en een goede indruk geeft van de initiële biomassa concentratie (proportioneel gecorreleerd met CH) wordt ATP standaard meegenomen. De koolhydraten bepaling volgens Dubois (CH) is de meest betrouwbare biomassa parameter gebleken waarmee reproduceerbaar de reinigingsefficiëntie kan worden bepaald. TOC is mogelijk een serieuze alternatieve parameter. De gegevens van dit onderzoek laten zien dat gebaseerd op biomassa-koolstof met deze bepaling minimaal twee maal zo veel biomassa wordt gemeten dan met de CH bepaling.

Resultaten van reinigingstesten

De laboratoriumtest met een schudtafel waar biofilmonsters worden geweekt in milli-Q water met of zonder chemicaliën (referenties) is een betrouwbaar protocol om de biofilm reinigingsefficiëntie te bepalen. Met de huidige laboratoriumtest konden reinigingsprocedures worden geëvalueerd en onderscheiden. De waargenomen trends waren in overeenstemming met de theoretische verwachtingen.

Validatie onderzoek nodig

Oriënterende experimenten uit eerdere onderzoeken toonden dat de CE waarden bepaald met PVC-P biofilm in de test qua orde van grootte overeenkwamen met CE waarden bepaald voor biofilms in SWM bepaald in een CIP test en in een laboratoriumtest met membraanstukjes (validatie). Meer vergelijkende gegevens met de geoptimaliseerde test zijn nodig voor een volledige validatie van de laboratoriumtest.

Conclusies en aanbevelingen

De laboratoriumtest om de efficiëntie van reinigingsmiddelen en procedures te bepalen om biofilms te verwijderen is geoptimaliseerd en met de huidige test kan reproduceerbaar de reinigingsefficiëntie van een reinigingsmiddel of reinigingsprocedure worden bepaald. De volgende aspecten worden aanbevolen voor verder onderzoek:

- De test kan worden gebruikt voor een studie naar de reinigingsefficiëntie van geselecteerde producten en procedures die in de praktijk worden toegepast.
- De test is bedoeld als een snelle en kosten effectieve manier om reinigingsmiddelen en procedures af te stemmen op de verwijdering van biofilms. De PVC-P biofilms zijn niet hetzelfde als biofilms op membranen. Verdere validatie van de test door vergelijking van de reinigingsefficiëntie bepaald in de laboratoriumtest met PVC-P biofilm en met de reinigingsefficiëntie bepaald in testen uitgevoerd in SWM elementen.
- Meer onderzoek naar de relatie van biofilmeigenschappen zoals samenstelling (microbiologisch en fysisch/chemisch), ouderdom en mate van hechting met de reinigingsefficiëntie.
- Membranen zijn vaak vervuild met een combinatie van biofilm en anorganische componenten (Fe, Mg, Al, Ca etc.) en PVC biofilms bevatten deze componenten afhankelijk van de kwaliteit van het aangeboden water (visueel zichtbaar). Door ICP als analysetechniek toe te voegen aan de parameters kan de test worden uitgebreid met de bepaling van de efficiëntie van middelen en procedures om deze vorm van vervuiling te verwijderen.
- Het gebruik van TOC als een alternatieve biomassa analyses.
- In het testprotocol is een referentie reiniging met een gecombineerde oplossing van NaOH en SDS opgenomen. Deze heeft een hoge CE waarde en introductie van een referentie reiniging met lagere efficiëntie wordt aanbevolen.

Inhoud

Samenvatting	1
Inhoud	3
Lijst met afkortingen	4
1 Inleiding	5
2 Achtergrond en uitgevoerd onderzoek	7
2.1 Cleaning of membranes: background	7
2.2 Development of a laboratory method for testing membrane cleaning procedures	9
2.2.1 Principle of the test	9
2.2.2 Production of biofilm samples	9
2.2.3 Biofilm samples and biomass concentrations	9
2.2.4 Cleaning test procedure	11
2.3 Results, conclusion and discussion BTO/Medina project	11
3 Onderzoek 2010: materialen en methoden	13
3.1 Biofilm productie	13
3.2 Reinigingstest en de reinigingsefficiëntie	15
3.3 Reinigingsmiddelen	16
3.4 Biofilm isolatie en homogenisatie	17
3.5 Biomassa analyse technieken	17
3.6 Experimenteel overzicht	18
4 Resultaten en discussie	19
4.1 Biofilm productie units	19
4.2 Reinigingstesten: invloed van de biofilmcondities	21
4.2.1 Sub-optimale condities in de biofilm productie units	21
4.2.2 Reproduceerbaarheid en effect van de ouderdom van de biofilm	23
4.3 Effect van verschillende behandelingen	24
4.3.1 Effect van twee organische zuren	24
4.3.2 Effect van een aanvullende zuurbehandeling	25
4.3.3 Effect van de enkelvoudige behandeling met loog en SDS	25
4.3.4 Verband tussen de verschillende biomassa parameters	27
5 Conclusies en aanbevelingen	29
6 Referenties	31
Appendix 1: major experimental results of cleaning tests in the BTO/Medina project	33
Cleaning efficiency for biofilms on polymeric surfaces	33
Validation tests	34

Lijst met afkortingen

ATP	Adenosinetrifosfaat
BCT	Batch cleaning test
BFM	Biofilm Monitor
BFS	Biofilm Formation Set-up
BSQP	Biofilm square productie unit
BPU	Biofilm productie unit
BVS	Biofilmvormingssnelheid
CE	Cleaning efficiency
CH	Carbohydrates
CIP	Cleaning In Place
CCT	Column cleaning test
EPS	Extra Polymere Substanties
HES	Hoge Energetisch Sonificatie
HP	Hexa-Penta monitor
ICP	Inductively coupled plasma
LES	Lage Energetische Sonificatie
NF	Nanofiltration
NPOC	Non-purgeable organic carbon
PI	Pressure indicator
PVC-P	Polyvinylchloride
RB	Referentie behandeling
RLU	Relatieve Licht Unit
RO	Reverse Osmosis
SWM	Spiraal-gewonden Membranen
TDC	Total Direct cell Count
TOC	Total Organic Carbon

1 Inleiding

Hoge druk membraanfiltratie, zoals omgekeerde osmose (RO) en nanofiltratie (NF) wordt in toenemende mate toegepast bij de drinkwaterbereiding, de afvalwaterbehandeling, ontzouting en voor de productie van proceswater. Een groot probleem bij de toepassing van deze processen is het optreden van membraanvervuiling van spiraalgewonden NF- en RO-membraanelementen, resulterend in operationele problemen zoals afname van de capaciteit en kwaliteitsverlies van het productwater. De oorzaak van membraanvervuiling is in vele gevallen het optreden van bacteriële adhesie en groei op het oppervlak van het membraan en de voedingspacer in spiraalgewonden membraanelementen met als gevolg in biofouling. In de afgelopen jaren is in het kader van BTO veel onderzoek verricht naar diverse aspecten van dit probleem, zoals (i) selectie van geschikte parameters en methoden voor het bepalen van de biofoulingpotentie van het voedingswater, (ii) relaties tussen deze biofoulingpotentie parameters en operationele problemen, (iii) invloed van voorbehandelingsprocessen op de biofouling(potentie), (iv) zogenoemde 'early-warning' systemen, (v) invloed van membraanreiniging en (vi) een economische afweging tussen voorbehandelen en reinigen. Conclusies en aanbevelingen van dit onderzoek zijn gerapporteerd in het BTO/AwwaRF-rapport getiteld "Biofouling of spiral-wound membranes in water treatment" (Van der Kooij et al., 2010).

In 2009 is met de BTO-expertgroep Biofouling een inventarisatie gemaakt van nog openstaande vragen met betrekking tot biofouling van spiraalgewonden membraanelementen. Hieruit kwam naar voren dat er nog een gebrek was aan een gevalideerde testmethode en protocol voor de beoordeling van membraanreinigingsprocedures om biofilms te verwijderen. In dit rapport wordt het vervolgonderzoek beschreven naar een dergelijke methode. Het onderzoek borduurt voort op het onderzoek dat is uitgevoerd in een BTO project dat was gekoppeld aan een Europees project MEbrane based Desalination an INtegrated Approach (MEDINA). De gegevens van dit onderzoek zijn gerapporteerd naar het internationale projectteam en deze rapportages zijn opgenomen in het onderliggende rapport.

De belangrijkste bevindingen van dit onderzoek waren dat er voor de ontwikkeling van een robuuste test meer aandacht uit zou moeten gaan naar de biofilmproductie en biomassabepaling als belangrijke onderdelen van de test. In 2010 is dit onderzoek gedaan en de resultaten hiervan staan beschreven in dit rapport.

2 Achtergrond en uitgevoerd onderzoek

In dit hoofdstuk is onderzoek beschreven van het BTO project dat uitgevoerd en gerapporteerd is in samenhang met het MEDINA project (Engelstalig). Hoofddoel was om een laboratoriumtest te ontwikkelen ter beoordeling van de efficiëntie van reinigingsmiddelen en procedures om biofilms van spiraal-gewonden membranen te verwijderen. Het hoofdstuk bevat een theoretische beschrijving van het proces van reiniging, een beschrijving van de laboratoriumtest zoals die is ontwikkeld en de conclusies van het BTO/Medina project zoals dat in begin 2009 is afgesloten. In Bijlage 1 zijn de belangrijkste resultaten van reinigingstesten van het BTO/Medina project vermeld.

2.1 Cleaning of membranes: background

During membrane cleaning, the membrane installation is temporarily taken out of operation and cleaned for a cleaning in place (CIP) procedure. CIP is usually carried out on the total membrane installation or on parts of the installation (e.g. membrane stage, process line). The effectiveness of CIP depends on the cleaning moment and the CIP procedure. The use of membrane cleaning can result in a loss of membrane integrity (Trägårdh, 1989). Furthermore, the environmental- and toxicological aspects of the use and discharge of membrane cleaning agents are important, but these topics are outside the scope of this work.

The cleaning moment is essential, hence if CIP is applied too early and too frequently, unnecessary costs are made and a possibility exist that membranes will be damaged by the membrane cleaning agents. If CIP is applied too late, membrane fouling might lead to irrecoverable losses in productivity and permeate quality of the membrane installation. The moment of cleaning is based on practical experience with membrane installations and is given by membrane suppliers (Hickman, 1991). The following criteria are used to determine the moment of membrane cleaning:

- 10%-15% reduction of the MTC (Graham et al, 1989; Darton and Turner, 1991; Hickman, 1991; Speth et al, 1998; Gwon et al, 2003);
- 10% reduction of the TMP (Graham et al, 1989; Hickman, 1991);
- 10% increase of salt passage (Hickman, 1991);
- 15%-50% increase of NPD (Graham et al, 1989; Hickman, 1991; Speth et al, 1998).

A CIP protocol consists of one or more cleaning steps with intermittent rinsing of the membrane elements with water. Within one cleaning step, a number of parameters is important for effective cleaning i) type and concentration (or pH) of cleaning agent, ii) flow velocity during membrane cleaning (cross flow velocity) iii) temperature during membrane cleaning, and iv) duration of the cleaning (incl. rinsing time and soaking time) (see Figure 2.1). Different *types of cleaning agents* are arranged into classes based on the cleaning function. The following classification is used in literature (Whittaker et al, 1984; Kane en Middlemiss, 1985; Trägårdh, 1989): (i) acids, (ii) alkalines, (iii) complexing agents or anti-precipitants, (iv) biocides, (v) detergents, (vi) enzymes and (vii) chaotrophic agents. Table 2.1 presents an overview of the influence of several types of cleaning agents on different types of membrane fouling.

Table 2.1. Influence of the type of cleaning agent on membrane fouling

	<i>Membrane fouling</i>			
	<i>Particles</i>	<i>Scaling</i>	<i>Organic</i>	<i>Biofilm</i>
Acids		X		
Alkalines			X	o
Complexing agents		X		o
Biocides				X
Detergents	X		X	X
Enzymes			X	X
Chaotrophic agents			X	X

X direct effect; o indirect effect

The function of acid cleaning agents (e.g. citric acid, sulfuric acid and phosphoric acid) is to dissolve inorganic precipitates and the inorganic matrix in a biofilm. Alkaline or caustic cleaning agents (e.g. NaOH, Na₂CO₃) are used for dissolving organic deposits, thereby removing biological material from membrane surfaces (and spacer material). Complexing agents or anti-precipitants (e.g. EDTA) remove metals and other precipitating ions from the foulant layer on the membrane, and are usually applied in combination with other cleaning agents. Biocides (e.g. chlorine, chloramines, organic peroxides, sodium bisulphite) inactivate micro-organisms by toxicity, and can be divided into oxidizing and non-oxidizing products. Detergents or surfactants are used for the removal of organic and biological material from membrane surfaces. Detergents or surfactants decrease the surface tension of the water, resulting in better hydration and solubility of the fouling layer and prevent re-precipitation of fouling on the membrane. Enzymes hydrolyzing the extra polymeric substances (EPS) formed by micro-organisms, which causes a reduction of the attachment of biofilms on the membrane surface. Finally, chaotropic cleaning agents (e.g. urea and sodium dodecyl sulphate (SDS)) accomplish denaturation of proteins, resulting in better solvability of organic compounds.

The *concentration of the cleaning agent* determines (partially) the cleaning rate (Liu et al, 2001). Membrane cleaning is an interface reaction between cleaning agents in a liquid phase and membrane fouling in a solid phase. Increasing the concentration of cleaning agents results in an increase of both reaction kinetics and transfer rate of cleaning agents into the fouling layer on the membrane. Usually, this transfer rate is the limiting factor during membrane cleaning (Liu et al, 2001).

The *flow rate during membrane cleaning* (cross flow velocity) has a direct impact on the shear forces between cleaning agents in the solution and the fouling layer on the membrane. Although high cross flow velocities (2.0 m/s) are preferred (Bryers, 2000), membrane manufacturers recommend to keep the feed pressure (or the differential pressure across the pressure vessels) under 4 bars, which limits the cross flow velocity (0.1-0.2 m/s) (Dow Liquid Separations, technical manual). For spiral wound membrane elements, there is a risk of “telescoping” at high cross flow velocities, resulting in pressing the membrane envelopes out of the pressure tube. By using mixtures of water and air during membrane cleaning, increased turbulence is achieved which results in high shear forces at the membrane surface. Biofouling can be partly controlled by the use of periodical air/water cleaning of NF/RO spiral wound elements (Cornelissen et al, 2007).

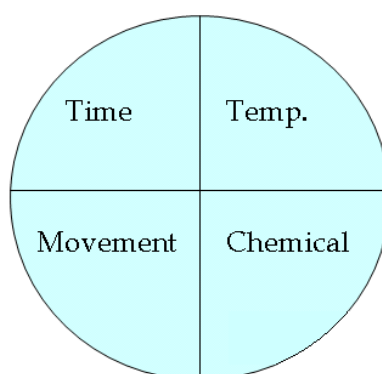


Figure 2.1. Four parameters of a CIP procedure influencing the effectiveness of cleaning

The *temperature* during the cleaning procedure determines the reaction rate of membrane cleaning and the solubility of the cleaning agents in water (Liu et al, 2001). Usually, more effective membrane cleaning occurs at elevated temperatures. However, increasing the temperature can be applied to a certain limit, with respect to the stability of the membrane material. For polymeric membranes, this limit is usually set at around 50 °C (Hickman, 1991).

The *duration of cleaning* (rinsing time and soaking time) has a major effect on the cleaning effectiveness. Short cleaning times can result in insufficient removal of membrane fouling. During membrane cleaning,

the membrane installation is out of operation, therefore long CIP procedures result in (unnecessary) downtimes. Usually, membrane fouling can be removed with one hour recirculation of membrane cleaning agents (Hickman, 1991). For membrane fouling which is hard to remove, like calciumsulphate precipitates, certain polymeric structures and attached biofilms, procedures of more than 8 hours might be necessary (Hickman, 1991).

2.2 Development of a laboratory method for testing membrane cleaning procedures

Periodic cleaning in place (CIP) is commonly applied for controlling biofouling of spiral-wound membranes (SWM) used for desalination and in water treatment to ensure water production. The collection of detailed quantitative information about effects of cleaning procedures at full-scale plants is an option to obtain the optimal cleaning conditions. Precondition is that the information is complete and collected systematically during daily practice, but inquiries show that this is not easy to establish and cleaning conditions are tailored to the local situation. An additional method to obtain the required information is described in this chapter. A laboratory test is developed which enables the quantification of the efficacy of membrane cleaning procedures to remove biomass from biofouled spiral-wound membrane elements.

2.2.1 Principle of the test

The major requirements for a robust and cost effective laboratory test which gives reproducible results on distinctive features with predictive value are: (i) standardized production of biofilm samples as surrogate for membrane biofilms, (ii) distinctive parameters to quantify the biofilm concentration; (iii) a simple test which simulates soaking and rinsing of a CIP procedure and (iv) the cleaning efficiencies (CE) calculated from this test using certain (combinations of) chemicals should give the same ranking as for the CE of the CIP procedures of spiral-wound membranes using the similar (combinations of) chemicals.

2.2.2 Production of biofilm samples

A biofilm production method was developed using segments of polymer tubing with attached biomass grown on the surface. The major tubing material used was polyvinylchloride (PVC-P) tubing (Ø 1.2 or 1.8 cm) because of its high biofilm formation potential (van der Kooij and Veenendaal, 2001). Polyamide (PA) and polypropylene (PP) tubing, which represent the materials of membrane and spacer, respectively, were used incidentally. Biofilm was grown on the inside surface of the polymer tubing by flowing non-chlorinated tap water (0.1-0.2 m/s) through these tubes (Figure 1). For PA and PP tubing biofilm formation was enhanced by supplementing acetate (100 µg C/l) to the water. The non-chlorinated tap water, produced from anaerobic groundwater, had a temperature range of 15 - 23 °C and the average turbidity, pH and NPOC were 0.16 FTU, 8.2, and 2 mg C/l, respectively. To validate the results of the laboratory tests with biomass attached to polymer, additional tests were performed with membrane material from spiral-wound membranes (SWM), either in CIP tests with membrane elements or in a laboratory batch test with SWM samples obtained by sampling for membrane autopsies.

2.2.3 Biofilm samples and biomass concentrations

A large variety of methods is available to quantify biomass concentrations. These methods include heterotrophic plate counts and total direct microscopic cell count (TDC), but also biochemical methods aiming at quantifying the constituents of bacterial cells and their excreted extra-cellular materials, e.g., adenosinetriphosphate (ATP), carbohydrates (CH), proteins, DNA, phospholipids, and muramic acids (Ridgway et al., 1983; Flemming et al., 1993; Ridgway and Flemming, 1996; Vrouwenvelder et al., 1998). CH measured with the method of Dubois (1956) and ATP were selected as the biomass parameters. The selection of these parameters was based on experimental data from a model membrane biofouling study showing correlation between these parameters and the normalized pressure drop in spiral-wound membranes (Hijnen et al, 2010). ATP quantifies the active biomass in the biofilm and with the CH method the concentration of carbohydrates in the bacterial cells and in the extracellular material is determined. The set of parameters was supplemented with TDC as a microbiological parameter.

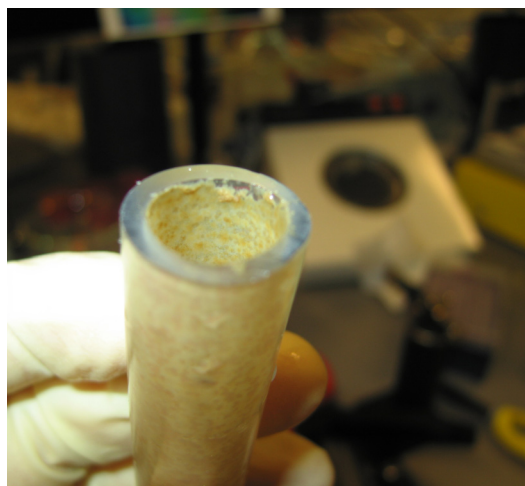
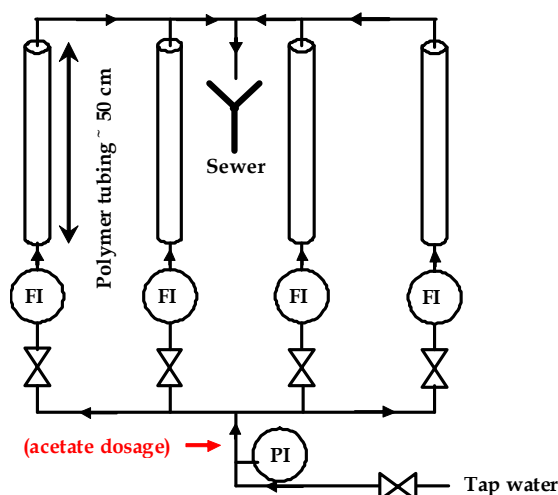


Figure 1. Biofilm production unit (BPU) with PVC-P tubes and an example of a biofilm on the surface of PVC-P tubing.

Microbial growth on the surface of the PVC-P tubes was clearly demonstrated by an increase of the ATP concentration from around 1 ng.cm^{-2} after two weeks to a more stable concentration of $20\text{-}60 \text{ ng.cm}^{-2}$ after four weeks. The CH parameter detected biofilm growth on the PVC-P after one month due to a lower level of detection CH content in the biofilm ($5\text{--}10 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$) (Figure 2a).

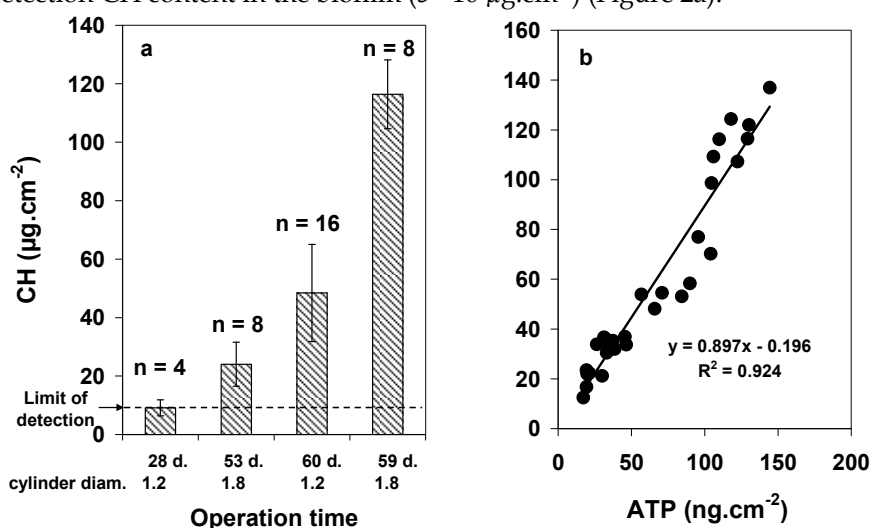


Figure 2. (a) The carbohydrate (CH) concentration of biofilms on PVC-P samples ($\varnothing$ 1.2 or 1.8 cm) after different periods of operation in the biomass production unit and (b) the relationship between ATP and CH concentrations of the PVC-P biofilm samples.

The average ATP concentration in the biofilm samples used for cleaning tests ranged from $30\text{--}140 \text{ ng.cm}^{-2}$, depending on the operation time of the biofilm production unit. Average CH concentrations ranged from $25\text{--}180 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$ (>30 days of operation time). ATP and TDC were positively correlated but the relationship was not proportional, due to the varying ATP content in bacterial cells. Moreover, microscopic images of TDC showed clustered cells, especially in biofilm samples after cleaning which hampers an accurate quantification of biomass. From the relationship between ATP and CH in the biofilm, a ratio of $0.9 \pm 0.05 \text{ }\mu\text{g CH per ng ATP}$ was calculated (Figure 2b). Biofilm samples from spiral-wound membranes (SWM) used for validation tests had ATP concentrations ranging from $<1\text{--}2 \text{ ng.cm}^{-2}$ and CH concentrations ranged from $<10\text{--}50 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$. Part of these samples were collected on site, transported and stored before use.

2.2.4 Cleaning test procedure

Three different tests were applied to determine the effects of cleaning procedures. The first set up consisted of a flow set up using fixed PVC-P cylinders ($\varnothing$ 1.2 cm; 1.6-5.0 cm) with biofilm to test the effect of air-water cleaning (AWC). The cylinders were flushed with demineralized water at ambient temperature and different velocities (0.6 – 3.7 m/s) with or without air supply (0 – 7.4 m/s) to test effects of different air/water-ratios. Batch cleaning test (BCT) with biofilm samples (polymer tubing or SWM samples) were carried out in 200 ml solution agitated on an orbital shaker at 100 RPM during 1 hour and rinsed in 200 ml milliQ-water under the same conditions during 15 minutes, thus simulating soaking and mild rinsing. A column cleaning test (CCT) was used to verify the effect of flushing conditions after soaking (0.11 m/s; 15 minutes non chlorinated tap water). Prior to flushing the PVC-P biofilm cylinders in the column were soaked either in milliQ-water (reference) or in the cleaning solution during 20 minutes at room temperature.

The cleaning efficiency (CE) of the different tests was calculated from the reduction in biomass concentrations as (i) the log units reduction of the ATP concentration and (ii) the percentage reduction of CH concentration. The untreated or reference biofilm samples in the AWC and the first batch-cleaning tests (BCT) were randomly cut biofilm samples from the produced biofouled surface. Because of high variability in these data in the subsequent BCT and CCT protocols an adjoining biofilm sample next to the cleaned biofilm sample was treated in milliQ-water and used as reference biofilm sample for calculations of CE.

2.3 Results, conclusion and discussion BTO/Medina project

A summary of the major results of the experimental work is presented in Appendix 1. The results of these experiment showed that:

- removal of attached biomass was rather limited, viz. $CE < 0.5 \log \text{ATP}$ and $< 0.2 \log \text{CH}$ (50%) for biofilms attached to PVC-P or SWM material in laboratory tests and CIP tests with intact SWM elements;
- chemical treatment and mild rinsing in a batch test were more effective in removing biofilms than intensive mechanical cleaning with air/water flushing;
- biofilm removal observed in CIP and laboratory protocols with SWM and PVC-P biofilms were in the same order of magnitude. This demonstrates that the laboratory test protocol can be used to evaluate biofilm removal efficiency of membrane cleaning procedures;
- different cleaning procedures did not show distinctive differences in biomass removal. However, the number of tests was too limited and the variability in the observed CE values was too high to draw decisive conclusions about effects of different chemical under different conditions (concentration, combination, time and temperature). Furthermore, no systematic data on the effect of individual chemicals were collected which hampers comparison with literature data.

The production of a reproducible and homogenous biofilm and the quantification of biomass concentrations with reproducible analytical methods are preconditions for a robust laboratory test with distinctive features. This study confirmed that ATP is a suitable measure for the amount of active biomass present on a surface and can be used to study mechanical cleaning procedures. However, when chemicals are used, the parameter is no longer proportional to the total amount of biomass, because damage of cellular membranes lead to release of ATP from the cells. CH analysis appears to be valuable, but the CH concentration may vary in biofilms depending on age. Consequently, this put demands on the biofilm production period. Attached biofilms with an age of about 2 months were found suitable for testing. Application of total direct cell count was hampered by conditions at which TDC values were not representative for the amount of biomass.

On the basis of the results the batch test in a rotary shaker was selected as a preferred laboratory test: PVC-P biofilm samples are mildly agitated in a cleaning solution on an orbital batch for one hour and rinsed for 15 minutes under the same conditions. The results can be verified with SWM biofilm samples. The cleaning efficiency is assessed with CH analysis. Since ATP is a cheap and easy to determine biomass parameter and ATP reduction showed similar trends in biomass removal this parameter is a valuable additional parameter. Future research should be focused on optimization of biofilm production and biomass quantification and on the assessment of the reproducibility of the laboratory test. More systematic studies with different cleaning procedures and comparative studies with CIP tests are

required to select the most optimal cleaning procedures for biofilm removal and validate the results for the membrane cleaning practice.

3 Onderzoek 2010: materialen en methoden

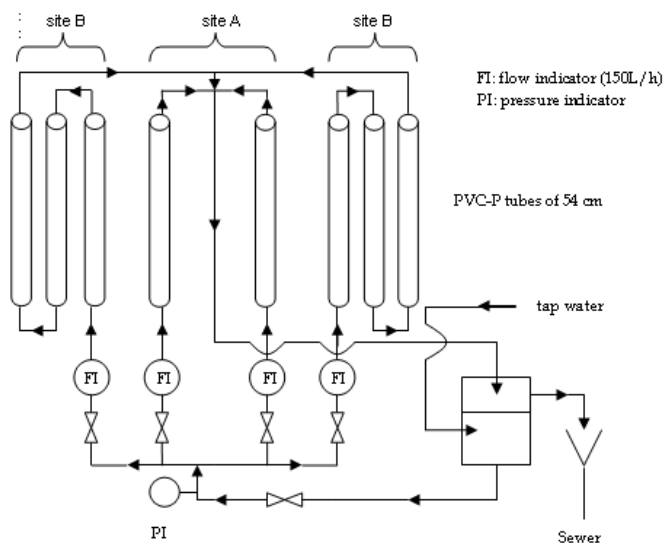
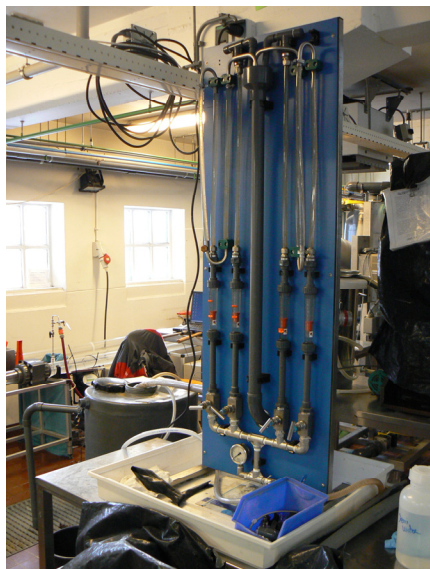
Het onderzoek in 2010 richtte zich op de optimalisatie van methoden voor de productie van biofilmmonsters, de analyse van de biofilm concentraties en de reproduceerbaarheid van de laboratoriumtest.

3.1 Biofilm productie

Bij de productie biofilmmonsters op PVC-P is uitgevoerd in vier verschillende systemen:

- Biofilm formation set-up (Biofilmvorming in een slang; BFS)
- Biofilm monitor (Biofilmvorming in slang segmenten; BFM)
- Hexa-Penta Monitor (Biofilmvorming in slang segmenten; HP)
- Biofilm square production unit (biofilmvorming op vierkante plaatjes, BSQP)

De BFS set-up (Figure 3.1) is gemaakt van acht parallelle PVC-P slangen met een interne diameter van 1.20 cm en een lengte van 54 cm. Drinkwater wordt via een buffervat van 25 liter met een debiet van 150 liter/uur gerecirculeerd (Iwaki Magneet Pomp – 70L/min – CB 844). De temperatuur in het vat is met een verwarmingsspiraal geregeld op maximaal 23°C en de inhoud van het systeem wordt in minder dan 1 uur ververs met nieuw drinkwater (Tabel 3.1). Om kortsluitstroming te voorkomen en vers water direct mee te nemen in het recirculatiewater is de vers wateraanvoer dicht bij de opening voor het recirculatiewater gelocaliseerd en de overstort van overtollige water aan de bovenkant gesitueerd.



Figuur 3.1: Schema en foto van BFS set-up

Het gebruik van de biofilmmonitor als unit om PVC-P ringen met biofilm te produceren was gebaseerd op het feit dat daarmee de flexibiliteit van de test en de beschikbaarheid van aparte biofilmmonsters (bij de BFS wordt 1 van de 8 slangen volledig geofferd voor een volledige test) werden vergroot. In de glazen BFM buis zijn PVC stukken van 5 cm met een inwendige diameter van 1.8 cm gestapeld en strak opgesloten in de glazen buis (Figuur 3.2). De BFM werd gevoed vanuit het recirculatievat van de BFS met eenzelfde type pomp en een inwendige snelheid in de PVC-P ringen van 200 l/h. De inwendige watersnelheid in de PVC-P stukjes was lager dan in de BFS (Tabel 3.1).

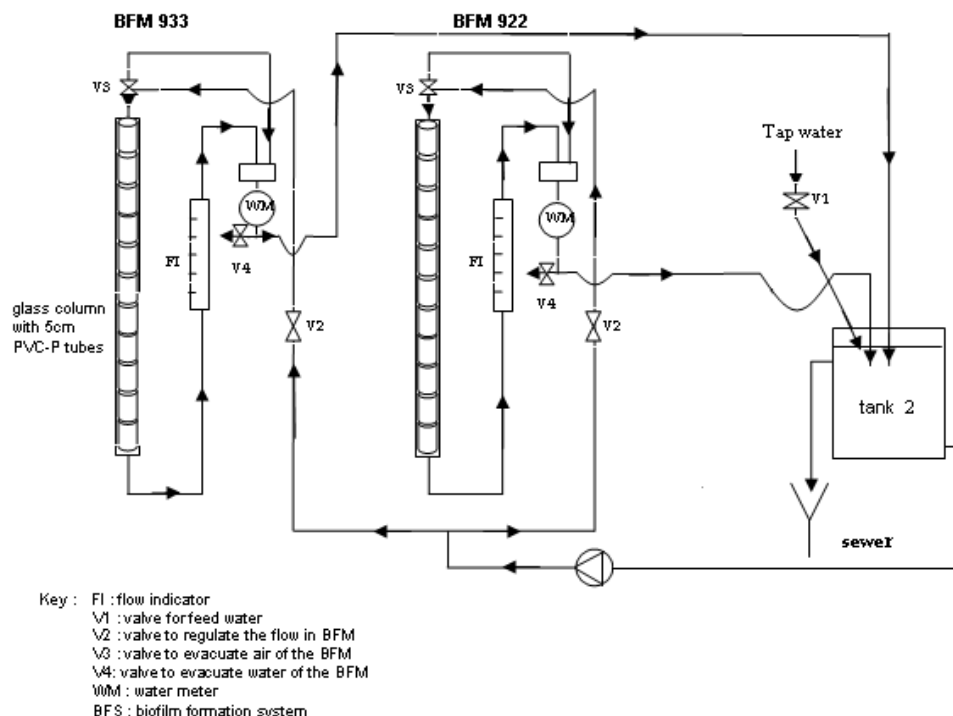
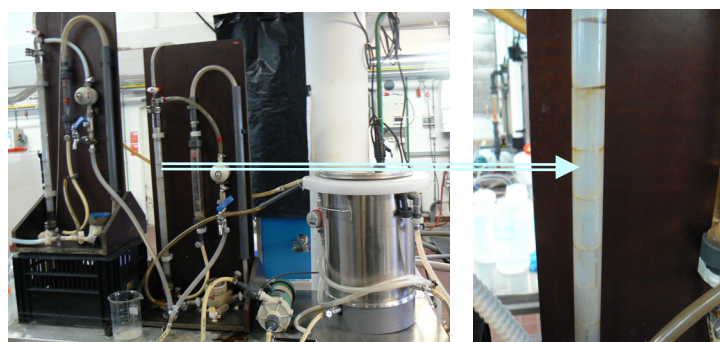
De Hexa-Penta-monitor (HP) is een systeem dat qua principe gelijk is aan de biofilmmonitor: een glazen buis (diameter van 2,8 cm en lengte van 68 cm) met daarin 20 gestapelde stukjes PVC-P slang (2,5 cm in lengte) met een inwendige diameter van 1,2 cm (zelfde slang als gebruikt bij de BFS unit). De ringen

zitten hier niet strak opgesloten in de glazen buis. In dit systeem wordt eveneens drinkwater bij 25°C gerecirculeerd, alleen de inwendige snelheid en de verversingsgraad zijn beide lager (tabel 3.1). Het recirculatie-debiet is 160 l/h en de hieruit afgeleide snelheid in de buis is lager dan in beide andere units (Tabel 3.1).

Tabel 3.1: De condities van de verschillende biofilm productie units

	BFS ^a	BFM ^a	BSQP	HP
Debiet l/h	150	200	350	160
Diameter (cm)	1.2	1.8		2.8
Oppervlak recirculatiesysteem (m ²)	0.000113	0.000254	3 x 2	0.000575
Systeem volume (l)	26	26	3.6	0.8
Waterverversing l/h	32± 3.8	32± 3.8	3± 1.1	0.13
Snelheid in slang (m/s)	0.369	0.218	0.097	0.077
Temperatuur	23°C	23°C	19-20°C	25°C
Water ververs tijd (min)	48 ± 6 min	48 ± 6 min	72 ± 30 min	369

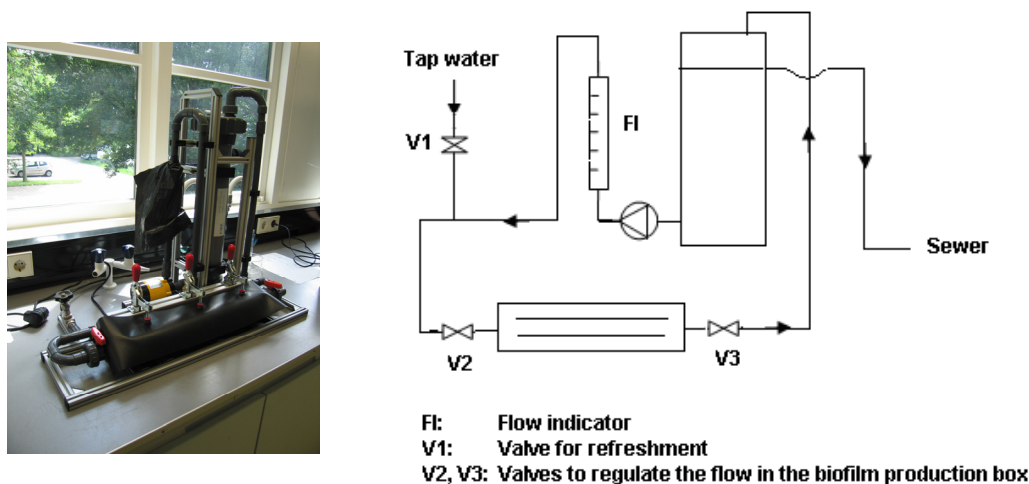
^a Geoptimaliseerd recirculatie systeem



Figuur 3.2: Foto en schema van de BFM set-up

De biofilm square productie (BSQP) unit is gemaakt van een hard PVC behuizing waarin rechthoekige PVC-P plaatjes (3 x 2 cm) zijn geplaatst in de stroomrichting in twee parallelle rijen (Figuur 3.3). Het systeem heeft een bufferreservoir van 3,6 liter met warmtespiraal waaruit het drinkwater wordt

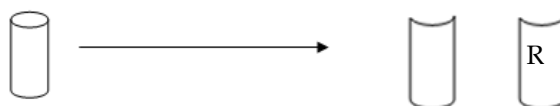
gerecirculeerd met een pomp (Mag-drive centrifugal, 10L/min, V0311168) en een debiet van 350 l/h. Er is een inkomend vers water debiet van 2-5 l/h vlak voor de reactor en het water wordt via een overstort geloosd. De reden om deze opstelling in de laatste fase van het onderzoek te ontwikkelen was omdat de biofilmproductie in de BFS en BFM niet altijd een bruikbare biofilm opleverde. De recirculatiecondities in de BFS en BFM zoals regiem van verversing waren niet goed bekend en daardoor onbeheersbaar.



Figuur 3.3: BSQP set-up foto en schema

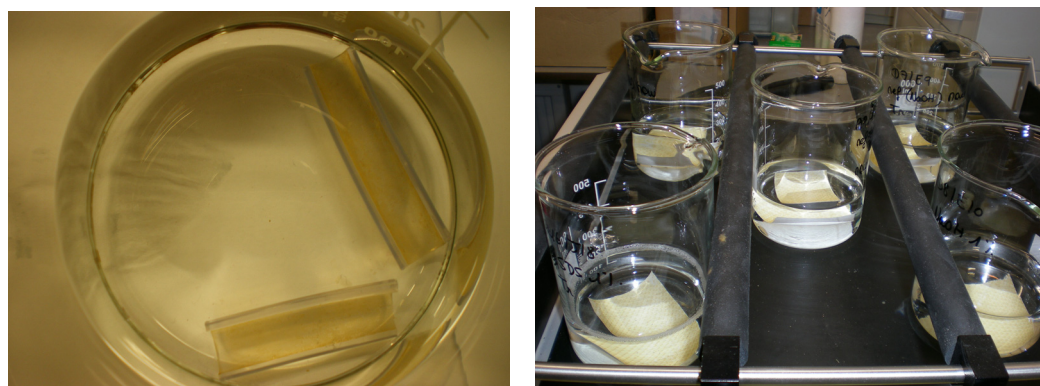
3.2 Reinigingstest en de reinigingsefficiëntie

Uit de verschillende biofilm productie units zijn stukjes PVC-slang (4-5 cm lang) of plaatjes (2/3 cm) uitgenomen voor een test. De test bepaalt het effect van een reiniging met een chemische verbinding door de biofilm concentratie op het behandelde stukje PVC-P te vergelijken met de biofilm concentratie op een referentie stukje dat op dezelfde wijze is behandeld in water maar zonder de chemische verbinding (controle). Om de variatie in de bepaling zo klein mogelijk te maken zijn aangrenzende PVC stukjes genomen (Figuur 3.4).



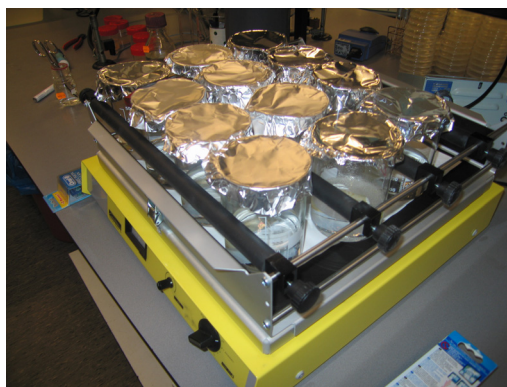
Figuur 3.4. De bemonstering van de PVC-P stukjes voor de test (R = referentie)

Voor de reinigingstest worden biofilmmonsters gebracht in 200 ml milli-Q water met of zonder schoonmaakmiddel (referentie) in een 600 ml bekerglas (groot/hog model). Voorbeeld hiervan met PVC-P biofilm en een membraan biofilm is gepresenteerd in Figuur 3.5.



Figuur 3.5. PVC-P biofilm en membraan biofilm in de 600 ml bekerglazen

Deze bekertjes worden afgedekt met aluminiumfolie en op een schudtafel (orbital shaker IKA 20 - orbital diameter = 30 mm) bij een snelheid van 100 RPM gedurende 1 uur bij ca. 20°C geschud (Figuur 3.6). De oplossing was duidelijk in beweging en de materialen werden niet of heel licht in beweging gebracht. Dit proces in de bekers met reinigingsmiddel wordt gevolgd door een spoeling in 200 ml MilliQ water (na verwijdering van de reinigingsvloeistof) onder dezelfde condities en een tijd van 30 minuten.



Figur 3.6: Schudtafel met bekers in bedrijf

De reinigingsefficiëntie (cleaning efficiency of CE) is bepaald op grond van de afname in biofilm concentratie ten gevolg van de behandeling met het reinigingsmiddel. Een biofilmmonster werd in twee gelijke delen verdeeld. Een deel werd behandeld in 200 MilliQ water (Referentie) en het andere deel in de reinigungsoplossing. De CE is berekend uit de procentuele afname van de biofilmconcentratie bepaald met een chemische bepaling (CH of TOC) of de logaritmische verlaging bepaald met een biochemische bepaling adenosinetrifosfaat (ATP).

3.3 Reinigingsmiddelen

Omdat in het samenwerkingsproject ook uitspraken werden verwacht over effectiviteit van verschillende reinigingsmiddelen en procedures is de testontwikkeling in de eerdere fasen van het onderzoek uitgevoerd met verschillende reinigingsmiddelen en procedures (Biraud, 2007; Balthazard, 2009). In het huidige onderzoek waar de nadruk lag op de bepaling van de reproduceerbaarheid van de test is een beperkte selectie van middelen en procedures bekeken (Tabel 3.2). De combinatie van NaOH en SDS (1/1%) is gekozen als standaard reinigingsmiddel. Daarnaast zijn een aantal zuren afzonderlijk of in combinatie met SDS getest.

Tabel 3.2: Lijst van onderzochte chemicaliën met hun functie, toegepaste concentratie en pH

Reinigingsmiddel	Soort	Functie	Concentratie - pH
NaOH	Loog	hydrolyseren, oplossen	1% - 12,7 0,05% - 12,0
SDS ^a	Surfactant	emulgeren en dispergeren	1% - 7,1
NaOH/SDS	Loog/surfactant	hydrolyseren, oplossen emulgeren en dispergeren	1%/1% - 12,7
Citroen zuur (CZ)	Zuur	Oplossen	1% - 2,2
CZ/SDS	Zuur/surfactant	emulgeren, dispergeren, oplossen	1%/1% - (2,2) 3%/1% (<2,2)
Organisch zuur (OZ)	Zuur	Oplossen	1% - 2,4
OZ/SDS	Zuur/surfactant	emulgeren, dispergeren, oplossen	1%/1% - (2,4) 3%/1% - (<2,4)
HCl	Zuur	Oplossen	0.0125% - 2,4

^a kritische micel concentratie = 0,23% en Mw = 288

3.4 Biofilm isolatie en homogenisatie

De biofilm concentraties zijn met een standaard procedure bepaald. De biofilmmonsters werden in 40 ml MilliQ water gedurende 2 minuten geborsteld om de biofilm te scheiden van het oppervlak. Om de rest van de biofilm op het oppervlak en in de borstel in suspensie te brengen, worden de suspensies inclusief borstel gedurende 1 minuut met hoge energetische sonificatie (HES; Branson W-250 system 20 kHz with a sonotrode-tip diameter=6.5mm at 45% amplitude) behandeld (Figuur 3.6). Voor de ATP bepaling worden direct monsters genomen uit de suspensie. Voor de CH en TOC bepaling worden de monsters bij 4°C bewaard. Deze methodiek is in dit onderzoek geoptimaliseerd ter vergroting van de homogeniteit van de biofilmsuspensie (verlenging van de HES duur) en ter voorkoming van biofilm introductie door verontreinigde borstels (intensivering van de reiniging van de borstels).



Figuur 3.6. HES behandeling van de biofilmsuspensie met borstel en biofilmmonster

3.5 Biomassa analyse technieken

Een essentieel onderdeel van de reinigingstest is de bepaling van de hoeveelheid biomassa op oppervlakken voor en na de reiniging. In een eerder onderzoek is gebleken dat ATP en de koolhydratenbepaling biomassa metingen die een kwantitatief verband hebben met de hoeveelheid biomassa in membranen die een weerstandsprobleem veroorzaakt (Hijnen et al., 2010). Mede op grond hiervan zijn de volgende analysetechnieken in de ontwikkeling van de reinigingstest betrokken:

- ATP (Magic and Van der Kooij, 2005)
- Totale directe celtelling (TDC; Hobbie et al., 1977)
- Koolhydraten CH volgens Dubois et al. (1956)
- Totale Organische Koolstof (TOC)

ATP bepaling

De bepaling van het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP) richt zich op de celinhoud van levende bacteriën. Het ATP gehalte in een deelmonster (in duplo) van de biomassasuspensie wordt met de enzymatische analyse bepaald en omgerekend naar het ATP gehalte per cm² onderzocht oppervlak. Vooraf is onderkend dat deze bepaling in een reinigingstest met chemicaliën minder geschikt is omdat de ATP afname model staat voor het lekken en afbraak van ATP en niet voor de verwijdering van de totale biomassa. De bepaling is echter relatief simpel en goedkoop en kan wel worden gebruikt bij beoordeling van mechanische reiniging (lucht/water spoelen; Cornelissen et al, 2009). Daarnaast levert de effectiviteit om ATP te verwijderen een indicatie op in de mate waarin de chemicaliën de biofilm kan binnendringen en inactiveren.

TDC bepaling

De totale directe celtelling (TDC) is een techniek waarbij het aantal cellen in een deelmonster van de biomassa suspensie wordt bepaald door deze op een membraanfilter te isoleren uit het deelmonster en te kleuren met een fluorescente verbinding die aan DNA en RNA hecht en daarmee dode en levende cellen zichtbaar maakt voor microscopische telling. Het aantal getelde cellen wordt omgerekend naar het aantal per cm² onderzocht oppervlak.

CH bepaling

De koolhydraten (CH) bepaling is gebaseerd op een complexvorming tussen mono-, oligo- en polysacchariden en methylesters die met spectrofotometrie kan worden gemeten. De bepaling is in de literatuur bekend als de fenol-zwavelzuur methode van Dubois (1956) en beschreven als de meest eenvoudige en betrouwbare koolhydraatmethode (Masuko et al., 2005). De ondergrens van de bepaling zoals ontwikkeld door Dubois is 50-450 nmol. In het protocol zoals toegepast in het huidige onderzoek is de ondergrens bepaald op 22 nmol glucose (1 mg/l). In een deelmonster van de biomassasuspensie (in duplo) wordt met de chemische analyse het koolhydraten gehalte bepaald en uitgedrukt in microgram glucose equivalenten per cm² onderzocht oppervlak.

TOC bepaling

De bepaling van het gehalte totaal organisch koolstof in een deelmonster van de biomassasuspensie is gebaseerd op de NPOC (non-purgeable organische koolstof) bepaling. Een aangezuurd monsters (pH =2) wordt doorgeblazen met lucht om de anorganisch koolstof te verwijderen en vervolgens in een verbrandingsbuis met katalysator bij 680°C geoxideerd. Het geproduceerde CO₂ wordt bepaald met een infrarood detector en omgerekend naar hoeveelheid C in mg/l en vervolgens naar microgram C per cm² onderzocht oppervlak. Een belangrijke voorwaarde voor een goede TOC analyse van een biomassa suspensie is het meemeten van deeltjes. In het huidige TOC apparaat wordt het monster met een slangmaat van 500 µm aangevoerd waardoor deeltjes kleiner dan deze maat in de analyse worden meegenomen. De detectiegrens of aantoonbaarheidsgrens voor de TOC bepaling is 0,1 mg C/l.

3.6 Experimenteel overzicht

Een conclusie van het eerdere onderzoek was dat er nog een grote variabiliteit zit in de vastgestelde reinigingsefficiëntie (§2.2.7). De onderdelen van de test die hierop van invloed zijn, zijn:

- de kwaliteit van de geproduceerde biofilm;
- homogenisatie van de biofilmmonsters na isolatie.

Beide aspecten zijn nader onderzocht, geoptimaliseerd en toegepast in reinigingsproeven.

Met deze geoptimaliseerde methoden zijn twee experimenten uitgevoerd:

- Een experiment om de effectiviteit te bepalen van twee verschillende organische zuren om biofilms te verwijderen.
- Een experiment om de reproduceerbaarheid van de test te bepalen. Hierbij is (i) de invloed van de biofilmproductie (duur en hydraulische condities) op de effectiviteit van een standaardreiniging met een gecombineerde oplossing van NaOH (1%) en SDS (1%) bepaald. Daarnaast (ii) zijn testen uitgevoerd om het onderscheidend vermogen van de test te bepalen. Hierbij is het effect van NaOH en SDS vergeleken met de gecombineerde oplossing van beide stoffen en het gebruik van een aanvullende zuurbehandeling met citroenzuur.

4 Resultaten en discussie

4.1 Biofilm productie units

Blanco PVC-P slang en vierkante plaatjes die gebruikt zijn in de biofilmproductie units (BPU) zijn onderzocht op de aanwezigheid van biofilm. Op grond van de ATP waarden blijkt dat op het blanco materiaal sprake is van bacteriegroei (Tabel 4.1). De gehalten CH die zijn gemeten in de monsters waren rond de detectiegrens van de bepaling. Deze is afhankelijk van het onderzochte oppervlak. Het TOC gehalte was duidelijk boven de detectiegrens.

Table 4.1. De biomassa concentraties op blanco PVC-P slang en PVC-P plaatjes (detectiegrens is op basis van ondergrens van de analysetechnieken in water en het onderzochte oppervlak)

	Slang (8,0±1,4 cm ²)			Plaatjes (12,0±0,3 cm ²)		
Blanko	ATP pg/cm ²	CH µg/cm ²	TOC µg/cm ²	ATP pg/cm ²	CH µg/cm ²	TOC µg/cm ²
I	294	4.4	14.8	18.7	4.6	7.5
II	132	5.2	16.6	41.6	4.9	7.1
III	74	6.1	9.6	62.0	4.6	9.1
AVG	166.7	5.3	13.7	40.7	4.7	7.9
Rel. SD	68	16	27	53	5	13
Detectiegrens	5,0	5,0	0,4	3,3	3,0	0,4

Bij de twee experimenten van dit onderzoek zijn verschillende biofilmmonsters gebruikt. In het eerste experiment is gebruik gemaakt van PVC-P biofilmmonsters geproduceerd met de HP unit. Stukjes slang waarin water gedurende 160 dagen was gerecirculeerd bij een temperatuur van 37°C zijn voor de test gebruikt. De hydraulische condities zijn verder gelijk aan de condities vermeld in tabel 3.1.

In het tweede experiment zijn biofilmmonsters van de vier beschreven BPUs gebruikt die zijn geproduceerd onder de condities zoals beschreven in tabel 3.1. De biofilmontwikkeling in de drie verschillende BPU's (HP en geoptimaliseerde BFS, BFM) met PVC-P slang is bepaald door na 2, 4, 7 en 9 weken monsters uit de systemen te onderzoeken. Op grond van de metingen blijkt dat de belangrijkste lineaire groei plaats vindt in de eerste 7 weken en dat daarna de toename afneemt (Figuur 4.1). De variabiliteit in de biomassa parameters staat vermeld in tabel 4.2. Uit deze gegevens blijkt dat de biomassa concentratie in de referentie monsters van de HP en BFS units een relatieve standaard afwijking heeft van gemiddeld ca. 15% (10,8 – 18,1%) voor de verschillende parameters. Op de BFM stukjes werd een grotere spreiding van 23,5 – 39,6% aangetroffen.

Tabel 4.2. De Relatieve standaard afwijking (SD/gemiddelde %) voor de biomassa concentraties bepaald met de verschillende parameters (SD) op verschillende tijdstippen van de productie (leeftijden van 2, 4, 7, 9 weken)

Referenties	ATP (n=24 ^a ;18 ^b) (ng/cm ²)	CH (n=24 ^a ;18 ^b) (µg/cm ²)	TOC (n=24 ^a ;18 ^b) (µg/cm ²)
HP	17,7±13,6	10,8±2,5	15,3±6,2
BFS	13,3±7,5	12,2±4,5	18,1±9,9
BFM	39,6±48,0	25,9±21,4	23,5±11,2

^a HP en BFS biofilm; ^b BFM biofilm

Het verschil van biomassa concentratie op het ruwe materiaal en de referenties is het effect van de mechanische behandeling in MilliQ water. Uit de gegevens blijkt dat deze behandeling geen groot effect (meestal niet significant gelet op de SD van de concentraties) had op de aanwezige biofilm (Tabel 4.3). Soms is een toename te zien. Dit kan worden verklaard doordat de stukjes qua locatie in de productie unit niet direct gekoppeld waren. Deze waarneming benadrukt het belang van de bepaling van het reinigingseffect door gebruik te maken van aangrenzende biofilmmonsters (Figuur 3.4).

Tabel 4.3. Biofilm groei op de PVC-P materialen in de diverse units en de mate van verwijdering bij de behandeling in MilliQ water door het ruwe materiaal voor de controle behandeling in MilliQ te vergelijken met de monsters na de behandeling (referentie monsters)

ATP (pg/cm ²)				
Tijd (dagen)	HP voor	SD	HP na	SD
14	3.2E+04	1.5E+03	1.8E+04	6.2E+03
28	3.4E+05	2.6E+04	3.7E+05	8.4E+04
49	6.5E+05	3.1E+04	6.5E+05	2.1E+04
63	7.6E+05	7.0E+04	7.0E+05	7.4E+04
Tijd (dagen)	BFS voor	SD	BFS na	SD
14	1.0E+05	1.0E+05	7.6E+04	6.8E+03
28	4.4E+05	2.6E+04	2.2E+05	4.8E+04
49	3.2E+05	6.7E+03	3.2E+05	5.5E+04
63	5.7E+05	2.2E+04	6.1E+05	3.3E+04
Tijd (dagen)	BFM voor	SD	BFM na	SD
14	7.4E+04	4.7E+04	7.4E+04	7.0E+04
28	1.6E+05	5.7E+04	4.6E+05	5.3E+04
49			3.9E+05	4.7E+04

CH (µg/cm ²)				
Tijd (dagen)	HP voor	SD	HP na	SD
14	13.9	0.4	10.8	1.0
28	101.0	11.3	104.6	15.0
49	246.2	9.1	258.4	27.9
63	281.4	7.4	259.3	22.9
Tijd (dagen)	BFS voor	SD	BFS na	SD
14	33.8	26.8	30.9	3.2
28	145.4	4.7	119.9	22.7
49	242.8	10.8	226.0	20.7
63	246.6	44.8	232.6	24.3
Tijd (dagen)	BFM voor	SD	BFM na	SD
14	36.8	9.4	35.2	17.8
28	102.8	37.3	160.4	22.9
49			335.4	42.8

TOC (µg C/cm ²)				
Tijd (dagen)	HP voor	SD	HP na	SD
14	24.2	2.6	15.7	3.2
28	96.6	9.7	97.9	20.5
49	135.7	4.5	128.1	11.5
63	186.7	6.2	212.4	23.3
Tijd (dagen)	BFS voor	SD	BFS na	SD
14	28.9	7.2	29.0	4.6
28	71.1	15.6	145.5	47.4
49	187.5	47.7	203.5	22.4
63	169.7	11.2	219.8	28.0
Tijd (dagen)	BFM voor	SD	BFM na	SD
14	28.9	7.2	48.3	12.9
28	71.1	15.6	154.5	50.8
49			244.6	27.2

Op grond van de lineaire biomassa toename op het PVC-P oppervlak in de diverse units is in analogie met de biofilmmonitor de biofilm vormingsnelheid of BVS berekend en weergegeven tot een

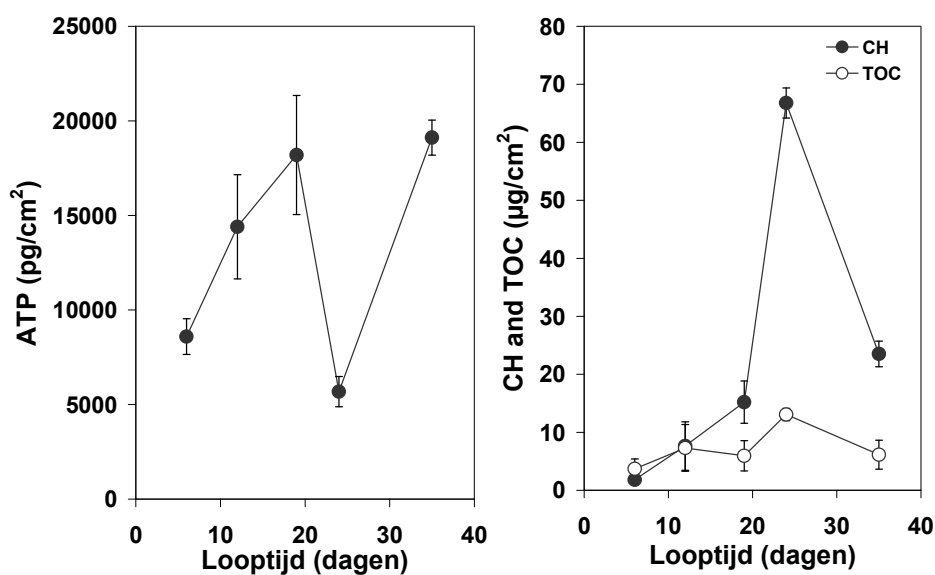
significantie niveau (P) van 0,1 of 10% (Tabel 4.4; $R^2 > 0,9$ door beperkt aantal gegevens). De hoogste BVS werd gemeten in de HP unit en was ca. 17 ng/cm².d. De snelheid bepaald voor de BFS was ca. een factor 2 lager en voor de BFM kon door het ontbreken van waarden de BVS niet worden bepaald. Een lagere snelheid in de BFS kan worden verklaard door een 4-5 maal hogere stroomsnelheid in de buizen vergeleken met de stroomsnelheid in de HP unit (Tabel 3.1). De geschatte BVS berekend op grond van CH concentraties was voor de HP unit ca. 7 µg/cm².d en voor de BFS unit 5-6 µg/cm².d. De BVS gebaseerd op de TOC concentraties waren een factor 2 lager.

Tabel 4.4. De groeisnelheid van de biofilm op de PVC-P in de verschillende productie units gemeten met de verschillende biofilm parameters en gebaseerd op de ruwe stukjes PVC-P en de stukjes na behandeling in MilliQ water (referenties)

Units	Groeisnelheid	Ruw		Referenties	
		Helling	P ^a	Helling	P ^a
HP	ATP (ng/cm ² .d)	17,4±1,9	0.06	17.6±3,2	0.11
	CH (µg/cm ² .d)	6,7±0,2	0.02	7.1±0,2	0.015
	TOC (µg/cm ² .d)	3,1±0,4	0.02	3.6±0,7	0.03
BFS	ATP (ng/cm ² .d)	-	ns ^b	9.9±2,1	0.04
	CH (µg/cm ² .d)	5,9±0,9	0.1	5.5±0,4	0.04
	TOC (µg/cm ² .d)	3,3±0,9	0.07	-	ns
BFM	ATP (ng/cm ² .d)	nb ^c	-	-	ns
	CH (µg/cm ² .d)	nb	-	8.6±0,1	0.01
	TOC (µg/cm ² .d)	nb	-	5.5±0,9	0.1

^a Significantie niveau van de regressie analyse; ^b ns = niet significant ($P > 0.11$); ^c nb = niet bepaald

De biofilmgroei in de plaatjes van de BSQP monitor die pas in het laatste stadium klaar was om te testen, stagneerde na de eerste 20 dagen (Figuur 4.1) door onbekende redenen waardoor de ATP, CH en TOC concentraties duidelijk lager waren dan in de andere biofilm productie units.



Figuur 4.1. De biofilmgroei op de PVC-P plaatjes in de BSQP unit

4.2 Reinigingstesten: invloed van de biofilmcondities

4.2.1 Sub-optimale condities in de biofilm productie units

Bij de ontwikkeling van test is gebleken dat de condities in de biofilm productie unit van essentieel belang zijn voor een geschikte biofilm. In de eerdere BFS en BFM opstellingen bleken de volgende condities essentieel voor een geschikte biofilm:

- Een constante en verhoogde temperatuur van ca. 25°C;

- Een goede verversing van het recirculatie water en geen extra biofilmvorming (voorkom limitatie van zuurstof en nutrienten).

Als voorbeeld van de sub-optimale biofilm condities zijn in Tabel 4.5 de resultaten gegeven van herhalings testen met biofilmmonsters uit drie units: HP, BFS en BFM. De gebruikte reinigungsoplossing was bij deze test een combinatie van NaOH (1%) met SDS (1%). De HP biofilms waren afkomstig van een goed geconditioneerd systeem qua temperatuur en recirculatie. De BFS en BFM units functioneerden onder een variabele temperatuur (10-20°C) in een systeem waar geen goede menging van het verse water met de recirculatiestroom was en extra biofilm op andere delen te zien was.

De biofilmverwijdering was bij de HP biofilm duidelijk minder effectief dan bij beide andere biofilms. Uit de visuele waarnemingen bleek dat de biofilm van de BFM/BFS units niet goed gehecht was aan het PVC-P oppervlak (Figuur 4.2).

Tabel 4.5. Het reinigingseffect (variatie coëfficiënt) van NaOH/SDS (1%) op PVC-P biofilmmonsters uit drie verschillende units

BPP units (n)	Cleaning efficiency ATP			Cleaning efficiency CH		
	CE (log)	Max	Min	CE (%)	Max	Min
HP (6)	1,8 (8,4%)	2,0	1,6	62,5 (7,0%)	68,3	56,9
BFS (6)	3,9 (6,4%)	4,2	3,5	98,8 (1,2%)	99,5	96,4
BFM (6)	2,5 (14,8%)	3,0	2,0	92,3 (12,3%)	99,7	72,0

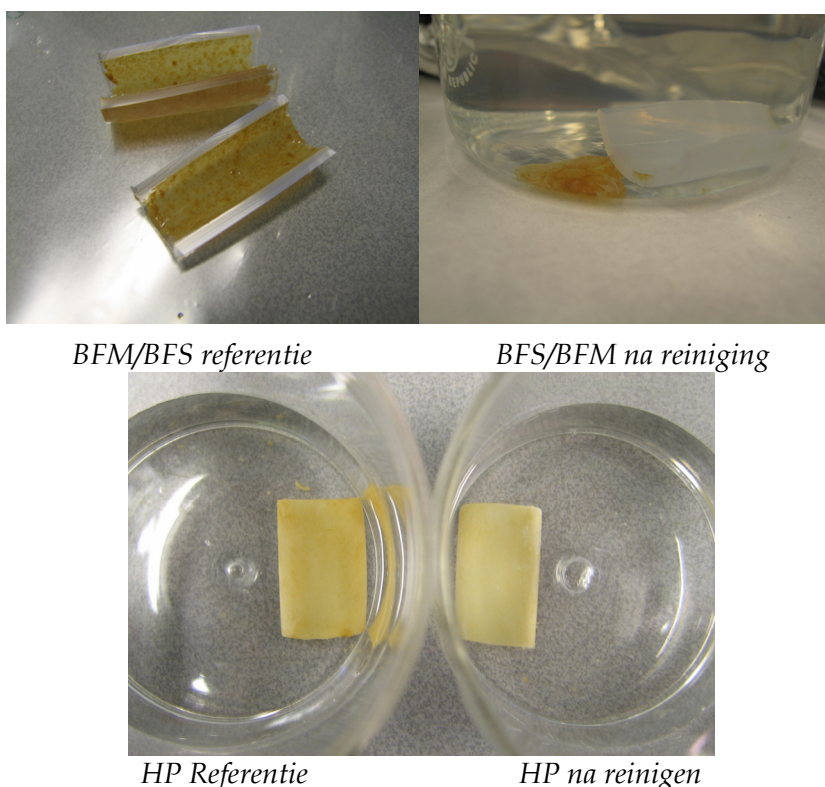


Figure 4.2: Referenties en gereinigde PVC-P stukjes van de BFM/BFS units (boven) en de HP unit (onder)

Verder valt op dat de ATP reductie door de behandeling in alle gevallen duidelijk hoger is dan de CH verwijdering. Dit is in alle volgende testen ook waargenomen en maakt duidelijk dat een ATP afname door een chemische behandeling van de biofilm niet overeenkomt met de verwijdering van de totale biomassa. In het hierna beschreven experiment is uitgegaan van de geoptimaliseerde biofilm productie units waarvan de productie van biofilm eerder uitvoerig is beschreven (par. 4.1).

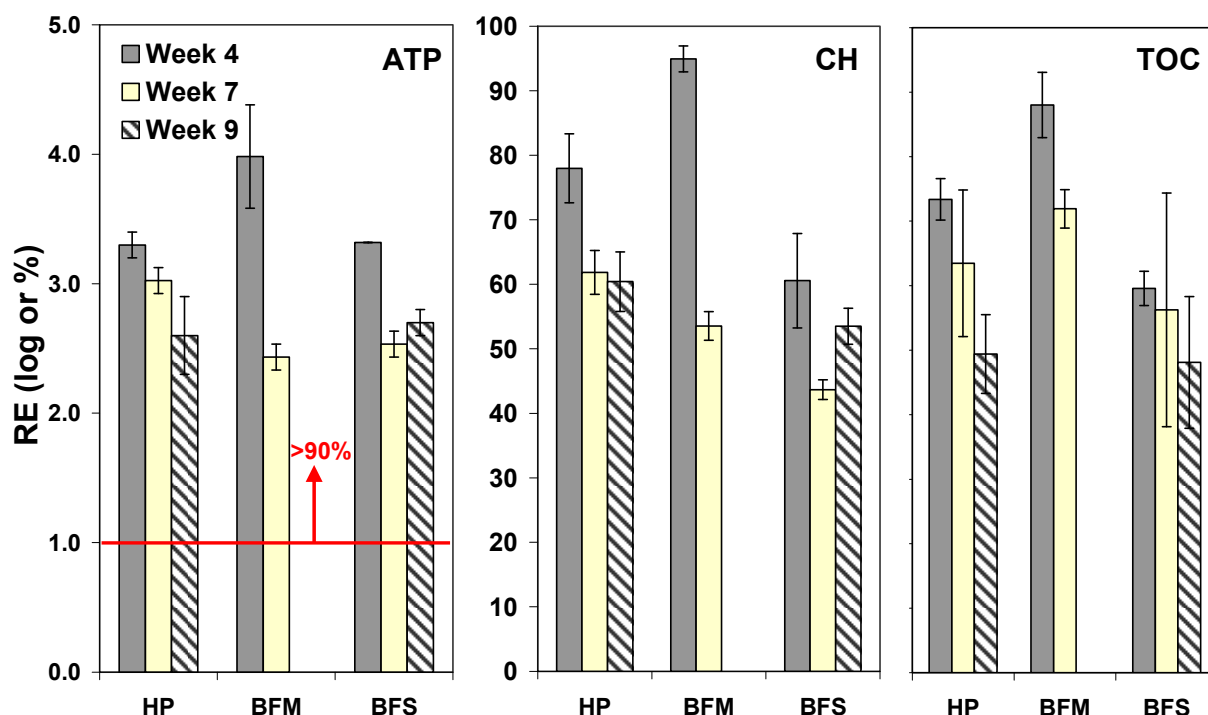
4.2.2 Reproduceerbaarheid en effect van de ouderdom van de biofilm

Om vast te stellen wat de invloed is van de biofilmlleeftijd op de reinigingsefficiëntie zijn biofilmmonsters na 4, 7 en 9 weken groei uit de verschillende BPU's getest met een *referentie behandeling* (RB) bestaande uit NaOH/SDS (1%; par. 4.1). Er werden van iedere BPU 3 monsters per keer onderzocht zodat ook een beeld werd verkregen van de reproduceerbaarheid van de test. In figuur 4.3 zijn de gegevens van alle biofilmmonsters voor de verschillende parameters gepresenteerd.

De ATP reductie varieert tussen 2,5 en 4,0 log en is duidelijk hoger dan de verwijdering van CH en TOC waar de CE waarden variëren tussen 45 en 95%. De variatie in de CE waarden bepaald met ATP en CH is lager (Rel. SD $\leq 10\%$) dan bepaald met de TOC als biomassa parameter ($\leq 20\%$). Uit de gegevens blijkt dat er verschillen worden waargenomen tussen de CE waarden bepaald voor de verschillende biofilms. De trends in de CE waarden voor de drie verschillende parameters blijken redelijk vergelijkbaar te zijn (verdere statistische analyse moet nog worden uitgevoerd):

- voor de biofilm van 4 weken werden over het algemeen de hoogste CE waarden bepaald;
- tussen de biofilm van 7 en 9 weken was nauwelijks verschil tussen de CE waarden;
- gebaseerd op de CH en TOC gegevens van week 7 en 9 is de volgende trend waar te nemen in CE waarden wat betreft de verschillende biofilms: HP ~ BFM > BFS.

Dit zijn trends die passen in de verwachte verschillen: (i) afnemende CE waarden bij oudere biofilms en (ii) lagere CE waarden bij biofilms die zijn geproduceerd onder condities van een hogere waterflow (BFS stroomsnelheid is de hoogste; Tabel 3.1).



Figuur 4.3. De CE waarden voor de verschillende biofilmmonsters bepaald na groeiperioden van 4, 7 en 9 weken berekend uit de drie toegepaste biomassa parameters

Op grond van deze gegevens kan worden geconcludeerd dat voor de test een biofilm productietijd van 4 weken te kort is. Eerder werd op basis van CH productie een productie tijd van ca. 6 weken bepaald. Onder de groeicondities in de HP, BFS en BFM units lijkt een productie tijd tussen 6 en 9 weken te kunnen worden gehanteerd. Daarnaast blijkt dat de hydraulische condities waaronder de biofilm worden geproduceerd van belang is voor de kwaliteit van de biofilmmonsters die worden getest.

De PVC-P biofilm geproduceerd met de HP en BFS units zijn goed bruikbaar; de BFM is minder betrouwbaar gebleken omdat na 9 weken de biofilm niet meer goed gehecht zat op het oppervlak (ontbrekende kolommen in Figuur 4.3). Omdat de biofilm dichtheid van de BSQP unit na ca. 40 dagen

nog te beperkt was, zijn de gegevens hiervan niet goed vergelijkbaar. De eerste CE waarden van deze plaatjes wijzen wel op een vergelijkbaar effect met de andere PVC-P biofilms (Fig. 4.6).

4.3 Effect van verschillende behandelingen

4.3.1 Effect van twee organische zuren

Een zuurbehandeling is vaak onderdeel van een membraanreiniging. Doel van deze behandeling is met name om de in de biofilm opgehoopte anorganische componenten te verwijderen (met name Ca, Fe, Mg). In deze test is met HP biofilmmonsters de CE van een zuurbehandeling met twee verschillende organische zuren bepaald: citroenzuur (CZ) en een ander organisch zuur (OZ). Een gecombineerde zuur/detergent (SDS) behandeling is uitgevoerd gevolgd door een loogbehandeling (2 stappenreiniging). De pH werd daarbij gevarieerd door een zuuroplossing van 1 of 3% toe te passen (pH van 2.4 en 2.2). Deze tweetrapsreiniging is vergeleken met een enkelvoudige zuur/SDS behandeling en de *referentie behandeling* (RB; NaOH/SDS behandeling).

De referentie behandeling met NaOH/SDS (1%) had een CE waarde voor ATP en CH van respectievelijk 2,0 log en 68,9% (Tabel 4.6), waarden die goed overeenkomen met eerder bepaalde waarden (Tabel 4.5 voor HP biofilm en Figuur 4.4). Bij de eerste test waren CE waarden van de verschillende zuurbehandelingen in alle gevallen lager dan de referentie behandeling met NaOH en er werden geen duidelijk verschillen tussen OZ en CZ geconstateerd. In deze test bleek het ATP gehalte duidelijk minder en niet te worden verlaagd; er werd zelfs soms een beperkte toename gevonden. Dit kan wijzen op benutting van deze organische zuren in de biofilm wanneer de concentraties hiervoor laag genoeg zijn (juiste pH). Daarom is in een tweede test het effect van een enkelvoudige zuurbehandeling vergeleken met een enkelvoudige HCl behandeling bij dezelfde pH. Ook in deze test bleek de ATP reductie beperkt maar kon de hypothese van ATP toename door opname van de organische zuren niet worden bevestigd. Om te kijken of een ATP toename gekoppeld was aan de aanwezigheid van SDS is test 3 een herhaling van test 2 in aanwezigheid van SDS. Ook bij deze test bleek de ATP reductie lager dan de referentietest met loog maar bleek geen ATP toename op te treden. De mogelijke verklaring voor de ATP toename in test 1 ligt in de waarneming dat deze werd gevonden bij relatief hoge biofilm concentraties (ATP en CH) op de PVC-P stukjes. De biofilm concentraties op de stukjes waar geen ATP toename werd gevonden waren duidelijk lager (gegevens niet getoond in dit rapport).

Uit de testen 2 en 3 bleek dat de enkelvoudige zuurbehandeling de laagste CE waarden voor CH (9,6 – 32,5%) vertoonde (Tabel 4.6). In combinatie met SDS nam de biofilm verwijdering met 10-20% toe.

Tabel 4.6. De CE waarden bepaald voor verschillende reinigingsbehandelingen met zuur in vergelijking tot een enkelvoudige referentie behandeling met NaOH/SDS bepaald met PVC-P biofilms uit de HP unit

Reinigings oplossingen	Test	ATP (log)	CH (%)
1% SDS/1 % NaOH (RB) ^a	1	2,0	68,9
1% SDS/ 1% OZ	1	-0,2	40,8
1% SDS/ 1% OZ gevolgd door 0,05% NaOH	1	1,1	56,1
1% SDS/ 3% OZ gevolgd door 0,05% NaOH	1	0,6	49,2
1% SDS/ 1% CZ	1	-0,02	50,7
1% SDS/ 1% CZ gevolgd door 0,05% NaOH	1	-0,2	38,1
1% SDS/ 3% CZ gevolgd door 0,05% NaOH	1	-0,2	47,1
0,0125% HCL	2	0,04	32,5
1% OZ	2	0,05	9,6
1% CZ	2	0,06	25,2
1% SDS/0,0125% HCl	3	0,6	39,2
1% SDS/1% OZ	3	0,8	33,8
1% SDS/1% CZ	3	0,7	33,1

^a RB = referentie behandeling

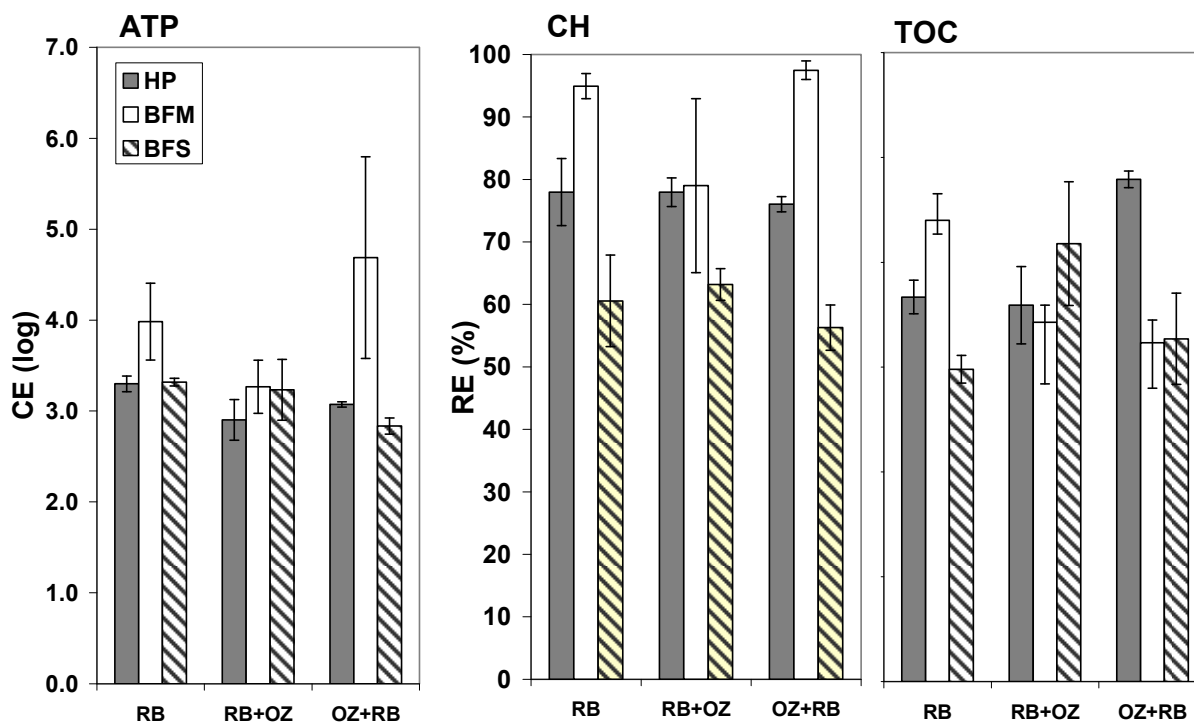
4.3.2 Effect van een aanvullende zuurbehandeling

Naast de RB met NaOH/SDS (1%) zijn een aantal alternatieve behandelingen vergeleken om na te gaan of de test een voldoende onderscheidend vermogen heeft. Met de biofilms van 4 weken productie is de aanvullende waarde van een zuurbehandeling onderzocht door een zuurbehandeling met citroenzuur (1%) toe te voegen als tweede stap voor of na de RB. Het onderzoek is net als het onderzoek naar de reproduceerbaarheid (par. 4.2.2) uitgevoerd met PVC-P biofilms van de verschillende BPU's. De toegevoegde zuurbehandeling had op basis van ATP en CH geen toegevoegde waarde ten aanzien van biofilm verwijdering; de logreductie (ATP) en % CH verwijdering waren met en zonder zuurbehandeling niet verschillend (Figuur 4.4). Met de TOC bepaling werd alleen bij de BFS biofilm met een nageschakelde zuurbehandeling een verhoging van de efficiëntie waargenomen en met de HP biofilm met een voorgeschakelde zuurbehandeling.

4.3.3 Effect van de enkelvoudige behandeling met loog en SDS

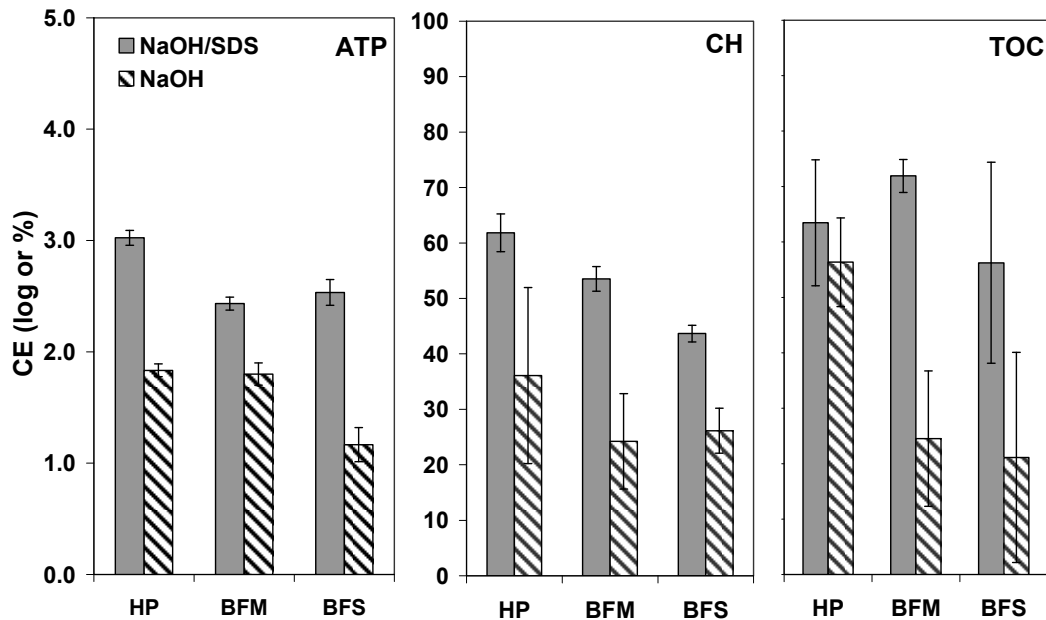
Met de biofilms van 7 en 9 weken productie is een enkelvoudige behandeling met enerzijds NaOH (1%) en anderzijds SDS (1%) vergeleken met de gecombineerde behandeling, de referentie behandeling (RB). Hieruit blijkt dat de enkelvoudige behandelingen beiden een duidelijk lagere effectiviteit hebben om biofilms te verwijderen dan de combinatie van beide middelen (RB).

- Een enkelvoudige NaOH behandeling verlaagt het ATP gehalte met 0,6-1,4 log minder dan de gecombineerde behandeling (Figuur 4.5). De CE waarden voor de CH parameter vertoonden een sterkere variatie. De gemiddelde CE van NaOH gebaseerd op CH was een factor 1,7-2,2 lager dan de gemiddelde CE van de gecombineerde behandeling. Ook voor de CE beoordeeld op grond TOC geldt een hoge variabiliteit; uitgezonderd voor de HP biofilms vertoonden de TOC gegevens dezelfde trend als waargenomen voor beide andere biomassa parameters.
- Een enkelvoudige SDS behandeling was minder effectief dan gecombineerde behandeling (RB) en ook de enkelvoudige loogbehandeling (Figuur 4.6). Hieruit kan worden geconcludeerd dat de toepassing van de combinatie NaOH/SDS een synergistisch effect heeft op de reiniging: de combinatie van beide middelen heeft een grotere reinigingsefficiëntie dan de som van de afzonderlijke middelen.

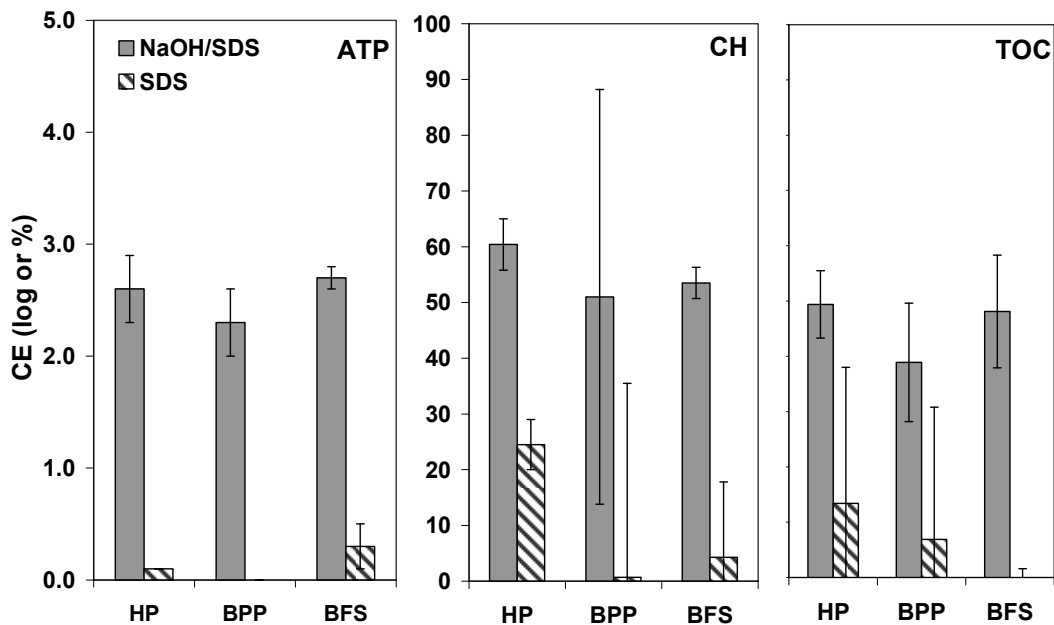


Figuur 4.4. De reinigingsefficiëntie (CE) bepaald van de RB (NaOH/SDS) zonder en met een aanvullende zuurbehandeling (OZ) met citroenzuur (1%) bepaald met 4 weken oude PVC-P biofilms geproduceerd in drie verschillende units (HP, BFS, BFM)

- Ondanks de verschillen tussen de biomassa parameters waarmee de CE is bepaald (ATP = levende biomassa; CH = extracellulair materiaal van de biofilm en TOC = alle organische componenten van de biomassa) zijn de trends in CE waarden overeenkomstig. De grootste variatie van de CE is waargenomen voor de TOC. Mogelijk omdat met deze parameter ook andere componenten zoals TOC van de PVC-P en/of resten reinigingsmiddel worden meebepaald.
- De resultaten laten zien dat met de test de reinigingsefficiëntie van verschillende middelen kunnen worden vergeleken.



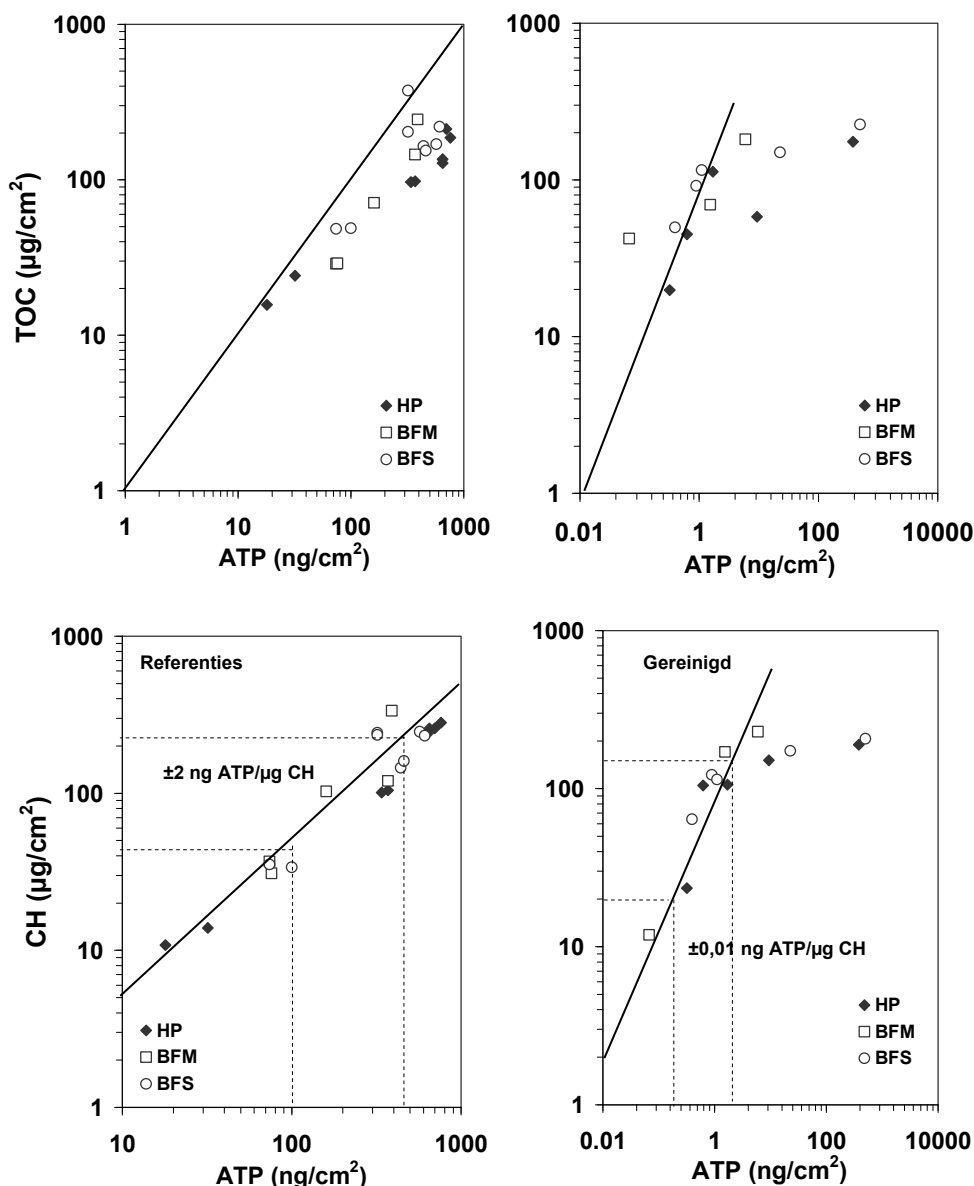
Figuur 4.5. De reinigingsefficiëntie (CE) bepaald van de RB (NaOH/SDS) en van een enkelvoudige loogbehandeling bepaald met 7 weken oude PVC-P biofilms geproduceerd in drie verschillende units (HP, BFM, BFS)



Figuur 4.6. De reinigingsefficiëntie (CE) bepaald van de RB (NaOH/SDS) en van een enkelvoudige SDS behandeling bepaald met 9 weken oude PVC-P biofilms geproduceerd in drie verschillende units (HP, BPP, BFM)

4.3.4 Verband tussen de verschillende biomassa parameters

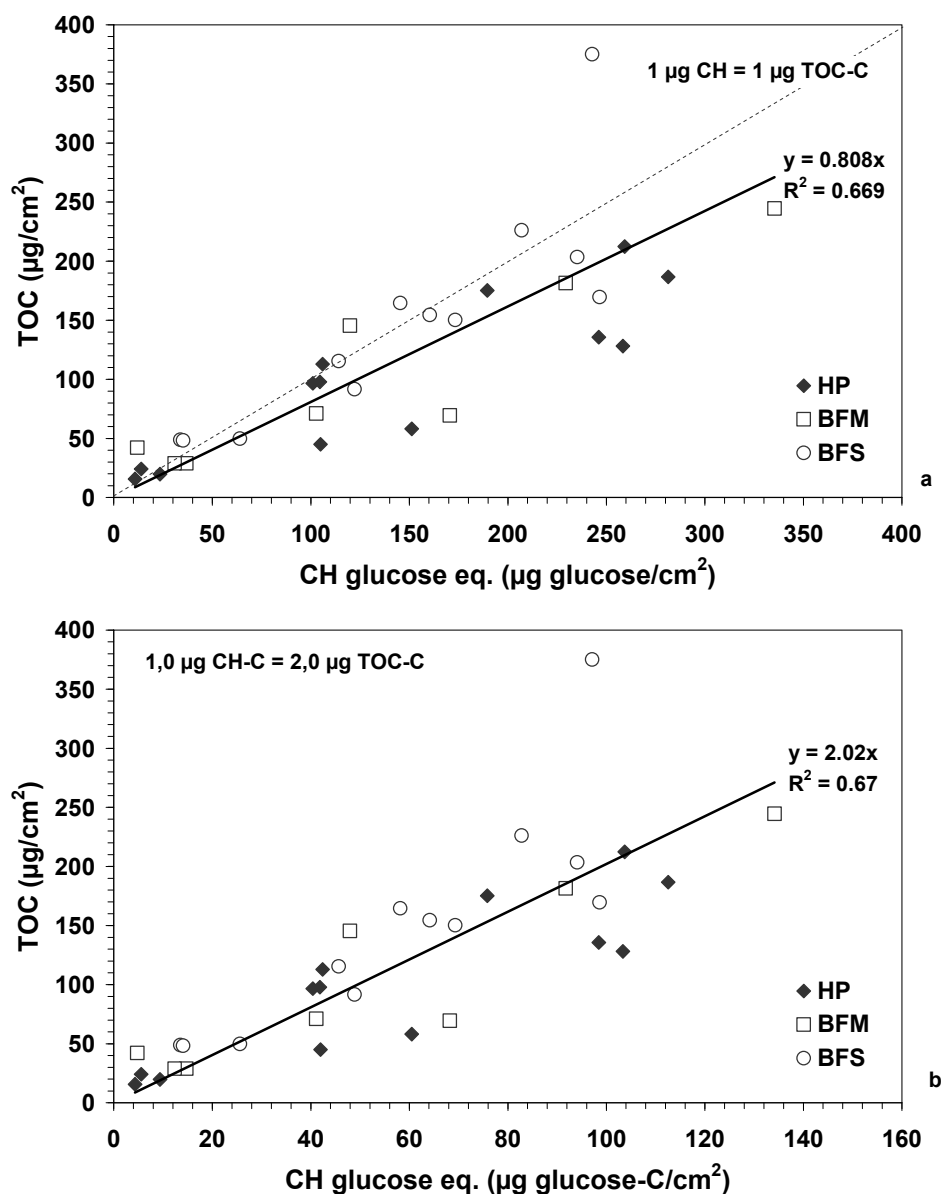
In de voorgaande testen zijn drie verschillende parameters gebruikt om de biofilm verwijdering te kwantificeren. Reden hiervoor is dat voor het kwantificeren van biomassa geen eenduidige parameter is. De resultaten van de testen laten zien dat trends in biofilm verwijdering bepaald met de drie verschillende parameters redelijk overeenkomstig waren. Wel is duidelijk dat de ATP reductie als maat voor biofilmverwijdering altijd hoger is dan de CH en TOC verwijdering. In de onbehandelde referentie biofilms is de ATP concentratie proportioneel gecorreleerd aan het CH gehalte (Figuur 4.8; ca. 2 ng ATP komt overeen met 1 μg CH) maar dat bleek niet het geval voor de verhouding met TOC (afnemende verhouding; Figuur 4.7). Na reiniging is de ATP/CH en ook ATP/TOC verhouding sterk verlaagd; de reiniging heeft een groter effect op de vitaliteit van de biofilm gemeten met ATP dan op de totale hoeveelheid biofilm gemeten met CH en TOC.



Figuur 4.7. Verband tussen de verschillende biomassa parameters (met de lijnen in de figuren wordt een proportioneel verband weergegeven)

Er is een lineair verband tussen de beide chemische parameters CH en TOC (Figuur 4.8) waarbij 1 μg CH/ cm^2 overeenkomt met gemiddeld $0,8 \pm 0,1 \mu\text{g}$ TOC/ cm^2 (Figuur 4.8a). Het koolstof percentage van glucose is echter 40% waardoor 1 μg CH overeen komt met 0,4 μg CH-C (1 μg CH-C $\approx$ 2 μg TOC). Als er vanuit wordt gegaan dat er geen rest reinigingsmiddel (SDS of organische zuren) in de biofilm achterblijft na de spoeling van 30 minuten in MilliQu water dan blijkt uit deze gegevens dat met de CH

bepaling slechts 50% van de totale hoeveelheid biomassa wordt bepaald die met de TOC analyse wordt gemeten (Figuur 4.8b). De invloed van rest reinigingsmiddel op de relatie lijkt verwaarloosbaar; de verhouding TOC/CH-C verhouding berekend uit gemiddelde waarden van de referentie monsters (zie tabel 4.2) is zelfs hoger dan 2,0 voor de verschillende biofilms (HP, BFS en BFM = 3,5, 3,8 en 2,3). Deze monsters zijn niet beïnvloed door contact met reinigingsmiddel.



Figuur 4.8. Het verband tussen de CH en TOC concentraties gemeten op de verschillende oppervlakken voor (referenties) en na reinigen

5 Conclusies en aanbevelingen

Er is een laboratoriumtest ontwikkeld om de effectiviteit van schoonmaakmiddelen en procedures te bepalen om biofilms van oppervlakken te verwijderen. Principe van de test is de productie van een standaard biofilm op kunststof slangmateriaal met een intern substraat (zacht PVC-P) dat wordt gebruikt in een simpele schoonmaaktest met lucht/water spoeling of een rotatiemenger in bekgelazen met verschillende chemische reinigingsmiddelen. Ander kunststof materiaal is ook mogelijk maar dan moet er een extern substraat worden aangevoerd voor de biofilm productie.

In de eerste fase is gebleken dat biofilms sterk gehecht zitten aan oppervlakken en met lucht en water reiniging voor maximaal 30% van PVC-P wordt verwijderd gebaseerd op ATP. Testen met chemische reinigingsprocedures toonden hogere ATP verlaging tot wel 3 log als gevolg van inactivatie van de biofilm. De werkelijke biofilmverwijdering werd bepaald met CH en was vaak niet meer dan 50% en nogal variabel. De effecten die in de laboratoriumtest zijn gemeten, waren in orde van grootte vergelijkbaar met de effecten die werden waargenomen bij Cleaning In Place (CIP) behandelingen met spiraalgewonden membranen. De lage en variabele effectiviteit was reden om de biofilmproductie en analyse kritisch te bekijken en te optimaliseren.

In de tweede fase van het onderzoek is met de geoptimaliseerde biofilmproductie en analyse een onderzoek uitgevoerd naar de reproduceerbaarheid van de test en de invloed van de biofilm eigenschappen en een beperkt aantal variaties in behandeling op de reinigingseffecten. Tevens is naast de koolhydratenbepaling de TOC bepaling (geoptimaliseerd voor biomassa) onderzocht als parameter.

Uit dit onderzoek komen de volgende conclusies en aanbevelingen voor verder onderzoek:

- De huidige laboratoriumtest is geschikt om een vergelijkende studie uit te voeren naar de effecten van een geselecteerd aantal reinigingsmiddelen en procedures die bij waterbedrijven worden maar ook die potentieel interessant lijken;
- Effecten in de laboratoriumtest zijn vergelijkbaar met effecten in spiraalgewonden membranen, maar aanvullende testen met membraan biofilms in de laboratoriumtest en in situ in een installatie zijn nodig om de test te valideren;
- Stabiele biofilms gehecht aan PVC-P kunnen worden geproduceerd voor de test onder goed geconditioneerde omstandigheden. Belangrijke aspecten van de productie zijn een verhoogde en stabiele watertemperatuur en het voorkómen van zuurstof en nutriënten beperking;
- Voor een goede test moet de biofilm 'leeftijd' ca. 6 weken zijn en de referentie en schoongemaakte oppervlakken moeten aangrenzend zijn om de variatie te minimaliseren;
- Het berekenen van het reinigingseffect uit het verschil in biofilm dichtheid op een stukje PVC-P na een mechanische behandeling zonder chemisch middel (referentie) heeft als voordeel dat het berekende reinigingseffect volledig kan worden toegeschreven aan het toegevoegde chemische reinigingsmiddel;
- Het reinigingseffect bepaald voor en na de mechanische reiniging is gering en kan worden gezien als een controle;
- Met een referentie behandeling met een reinigingseffect van ca. 60% is aangetoond dat de test reproduceerbare resultaten levert waarmee
 - o biofilms van elkaar kunnen worden onderscheiden in gevoeligheid voor reiniging
 - o chemische middelen of combinatie van middelen kunnen worden onderscheiden in hun effectiviteit.
- Een biofilm van ca. 4 weken is makkelijker te verwijderen dan een biofilm met een dubbele leeftijd. Tussen een leeftijd van 7 en 9 weken was het effect van de leeftijd niet zichtbaar.
- Een hogere flow conditie (meer shear) veroorzaakt een lagere reinigingseffectiviteit;
- ATP en CH zijn goede en complementaire parameters in de reinigingstest. ATP toont de effectiviteit van penetratie en inactivatie en/of lekkage van celinhoud en CH de verwijdering van de biofilm van het oppervlak.
- De waarde van de TOC bepaling is nog niet duidelijk. Met de TOC resultaten werden dezelfde trends aangetoond als met ATP en CH, alleen de reinigingseffecten waren meer variabel. Omdat

TOC nog meer gaat over de totale biomassa dan CH en de parameter eenvoudiger is uit te voeren, is het nodig om de bruikbaarheid verder te onderzoeken. TOC en CH bleken wel lineair te correleren maar het verband vertoonde een grote variatie. De CH gegevens onderschatten de biomassa concentratie op het oppervlak met ongeveer 50%. Dit is een argument die ervoor pleit om de TOC analyse als biomassa parameter serieus te onderzoeken;

- De gevormde biofilms in de BPU vertoonde een duidelijke bruinkleuring die zeer waarschijnlijk afkomstig is van ijzeraccumulatie. Verwijderen van anorganische componenten die op oppervlakken accumuleren is bij reiniging van membranen ook van belang. Met het uitvoeren van een aanvullende ICP analyses kan het effect van de reiniging op deze componenten in de biofilm worden bepaald.

Eindconclusie en betekenis voor de praktijk

Het is van belang dat de in dit rapport beschreven testprocedure wordt vergeleken met de effectiviteit van dezelfde reinigingsprocedures in de praktijk (validatie). De test is bedoeld als een snelle en kosten effectieve manier om reinigingsmiddelen en procedures af te stemmen op de verwijdering van biofilms. De PVC-P biofilms zijn niet hetzelfde als biofilms op membranen. In het vervolgonderzoek zal naast het testen van verschillende middelen en procedures, aandacht moeten zijn voor een validatie met biofilms op membranen, in situ met modules en CIP procedures en ook in de test met stukjes membraan. Eerste ervaringen met dergelijke validatie testen toonden vergelijkbare effecten maar dit zal met de geoptimaliseerde reinigingstest verder moeten worden bekeken.

6 Referenties

- Bryers, D., 2000. Biofilms II. Process analysis and applications, Ed. James P:337-381.
- Cornelissen, E.R. J.S. Vrouwenvelder, S.G.J. Heijman, X.D. Viallefont, D. Van Der Kooij, L.P. Wessels, 2007. Periodic air-water flushing for control of biofouling in spiral wound membrane elements, *J. Membr. Sci.* 287:94-101.
- Darton, E.G. and E. Buckley, 2001. Thirteen years' experiences treating a seawater RO plant, *Desalination* 134:55-62.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 23, 350-356.
- Flemming, H.-C., Schaule, G., McDonough, R., 1993. How do performance parameters respond to initial biofilm formation on separation membranes. *Vom Wasser* 80, 177-186.
- Graham, S.I., Reitz, R.L., Hickman, C.E., 1989. Improving reverse osmosis performance through periodic cleaning. *Desalination* 74, 113-124.
- Gwon, E, M. Yu, H. Oh and Y. Ylee, 2003. Fouling characteristics of NF and RO operated for removal of dissolved matter from groundwater, *Wat. Res.* 37:2989-2997.
- Hickman, C.E., 1991. Membrane cleaning techniques, AWWA Seminar Proceedings, Membrane Technologies in the Water Industry, Orlando (US, FL), March 10-13.
- Hijnen, W.A.M., Cornelissen, E.R., van der Kooij, D., 2010. Threshold biomass and iron concentrations for pressure drop increase in spiral-wound membrane elements. *Water Research* in Press.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology* 33, 1225-1228.
- Kane, D.R. and N.E. Middlemiss, 1985. Cleaning chemicals – state of knowledge in 1985, in: Lund, D. (ed.); *fouling and cleaning – food processing*, 312-335.
- Liu, C, S. Caothien, J. Hayes, T. Caothuy, T. Otoyoto & T. Ogawa, 2001. Membrane chemical cleaning : from art to science, Proceedings of the membrane technology conference, 2-5th April, San Antonio.
- Ridgway, H.F., Kelly, A., Justice, C., Olson, B.H., 1983. Microbial fouling of Reverse-Osmosis Membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological and ultrastructural analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1066-1084.
- Ridgway, H.F., Flemming, H.-C., 1996. Membrane biofouling, in: Malleviall, J., Odendal, P.E., Wiesner, M.R. (Ed.), *Water treatment membrane processes*. McGraw-Hill, New York.
- Speth, T.F., Summers, R.S., Guess, A.M., 1998. Nanofiltration foulants from a treated surface water. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3612-3617.
- Trägårdh, G. 1989. Membrane cleaning, *Desalination* 71:325-335.
- Van der Kooij, D. and H.R. Veenendaal. 2001. Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance. *Water Sci. Technol. Water Supply* 1(3):39-45.
- Van der Kooij, D., W.A.M. Hijnen and E.R. Cornelissen. 2010. Biofouling of spiral-wound membranes in water treatment. *Water Research* Foundation and KWR, Denver USA and Nieuwegein NL.
- Vrouwenvelder, H.R., Van Paassen, J.A.M., Folmer, H.C., Hofman, J.A.M.H., Nederlof, M.M., Van der Kooij, D., 1998. Biofouling of membranes for drinking water production. *Desalination* 118, 157-166.
- Whittaker, C., H.F. Ridgway and B.H. Olson, 1984, Evaluation of cleaning strategies for removal of biofilms from reverse-osmosis membranes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 395-403.

Appendix 1: major experimental results of cleaning tests in the BTO/Medina project

Cleaning efficiency for biofilms on polymeric surfaces

ATP was assumed to be a suited biomass parameter to assess cleaning efficiencies in the AWC experiments, because in the absence of chemicals no enhanced leakage of ATP from cells occurs. A maximum ATP reduction of 0.6 log (75% removal) was observed for PP samples with biofilm, whereas the removal from PVC-P did not exceeded 0.3 log (50%, Figure 3). Increasing the air supply (air/water A/W ratio) had only a positive effect for PVC-P at an A/W ratio of 1.5 and 2.0.

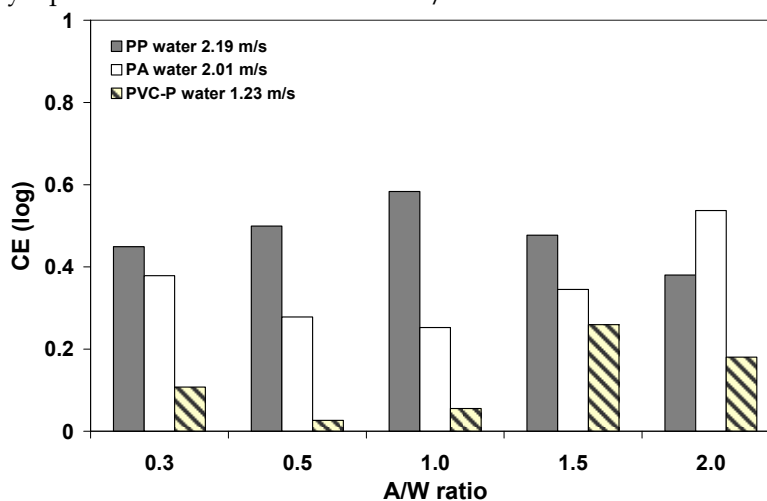


Figure 3 The effect of the air velocity at a constant water flow (see legend) on the reduction of the ATP concentration of biomass attached to PVC-P

In membrane cleaning it is common practice to apply multiple cleaning treatment using alkaline, detergent and acid steps in single or combined solutions with variable sequences. In a batch test with biofilm grown on PVC-P (60 days) the cleaning efficiencies were determined in milliQ water (control) and in MilliQ with NaOH, sodiumdodecylsulphate (SDS) and citric acid in one and in two steps with variable sequences (concentrations of 1%). The control showed some reduction of ATP and CH (Figure 4). ATP reduction for all treatments, including the control, was >50% (0.3 log) and was highest after the two-step treatment with citric acid + SDS and by the treatment with NaOH + Citric. Except for the two-step treatment with SDS + citric acid all two-step treatments showed an increase in ATP reduction. The NaOH treatment caused an unexplained¹ negative CE for CH. The other CE values ranged from 35.5% (citric acid) to the highest removal of about 80 % for the two-step treatments with citric acid + SDS and NaOH + citric acid. These trends were also observed for ATP.

The same chemicals were tested in column tests with additional flushing (15 min) after soaking. No increase in cleaning efficiency was observed despite the additional flushing at velocities observed in SWM (0.1 m/s). In most of these column tests the reduction of the ATP concentration was less than 50% (0.3 log) and the reduction of the CH concentration was less than 20%.

¹ NaOH could have an effect on the efficiency of the hydrolyse step in the CH measurement with H₂SO₄ (no further research performed)

Validation tests

A major requirement of the cleaning test is that the test is predictive for cleaning efficiency and biomass removal by CIP procedures in spiral-wound membranes. In the batch test flushing (shear) is mild compared to the flushing in the membrane elements at flow rates of 0.1-0.2 m/s. In the column test, however, the effect of the additional flushing on biomass removal was negligible as presented above. A pronounced difference between CIP in membrane elements and laboratory tests is the accessibility of the biofilm. In the laboratory test the biofilm is optimal accessible for chemical solutions compared to the accessibility of the surfaces of feed channel in SWM elements during a CIP. To assess the predictive value of the laboratory test validation is necessary. A few comparative tests were carried out.

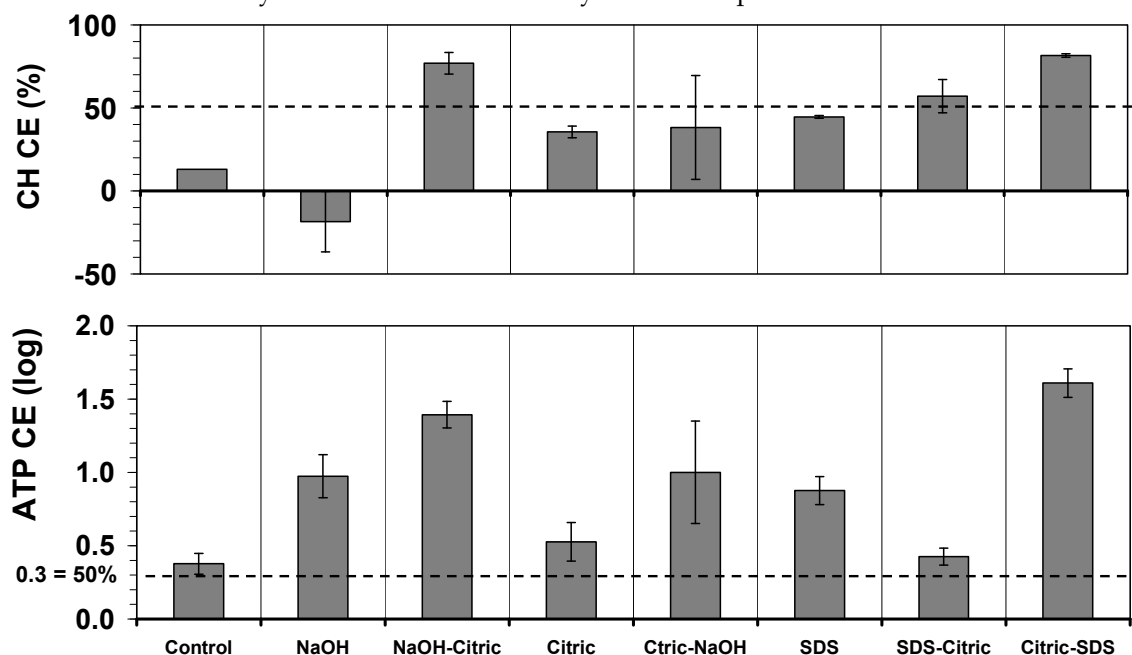


Figure 4 The cleaning efficiency for treatment of PVC-P biofilms with NaOH (1%, pH 12.7), SDS (1%, pH 7.1) and citric acid (1%, pH 2.2) in the batch test in one step or in two steps with different sequences (error bars show the variation in biofilm concentrations of samples of one test).

The cleaning procedures (CP) presented in Table 1 were applied as CIP procedures with membrane elements in a pilot plant (CIP-1) and at bench scale (CIP-2) and compared with similar cleaning procedures in the laboratory batch test (BCT) and the laboratory column test (CCT), respectively. All CPs were two-step treatments. CP#1 is an alkaline + acid, #2 a detergent + acid, #3 a detergent/alkaline + acid and #4 an acid + detergent treatment.

Table 1 Cleaning procedures (CP) applied in the CIP tests with SWM elements and in the laboratory tests with SWM and PVC-P biofilms

CP	Tests ^a	First step		Second step	
		Agents	pH	Agents	pH
#1	CIP-1	NaOH 0.1%	12	HCl 0.2-0.5%	2.0
	BCT/CCT	NaOH 1%/NaOH 0.05%	12.7/12	Citric 1%	2.2
#2	CIP-1	STPP 2%+NaDBBS 0.025%	10	Citric 2% DBNPA 0.05%	2.0
	BCT	SDS 1%	7.1	Citric 1%	2.2
#3	CIP-1/CIP-2/BCT	NaOH 0.1%+SDS 0.03%	12	Oxalic 1%	1.5
#4	CIP-2/BCT	Citric acid 1%	2.2	SDS 1%	7.1

^a CIP = cleaning in place (elements); BCT = batch test and CCT = column test

The data presented in Table 2 show similarities but also differences in CE for the two biomass parameters under different test conditions (tested biofilms and cleaning procedures) with no systematic pattern. Overall from this table and from the results described above it can be concluded that the cleaning efficiencies observed in the batch tests using PVC-P biofilms are in the same order of magnitude

as observed for SWM material. Furthermore, the results show that in most cases ATP removal was more than 1 log unit and CH removal was generally as less than 50% (0.3 log unit). Chemical cleaning results in biomass removal and inactivation and therefore ATP reduction overestimates biofilm removal and CH reduction is a more appropriate parameter to quantify CE. Only in four out of eleven cleaning tests the CH removal was >50%, viz. three laboratory batch tests on PVC-P biofilm with CP #1, #2 and #4 and one CIP tests with SMW biofilm (CIP-2). The higher CH removal observed in the laboratory batch test may indicate the beneficial effect of a better accessibility of the biofilm, but this may also caused by higher biofilm densities on the PVC biofilm samples as deduced from the CH concentrations described before. Nevertheless, the results with SWM biofilms are consistent with those of the laboratory tests and demonstrate that biofilm removal of more than 50% is hard to achieve with CIP procedures in spiral-wound membranes. The wide range of CE values presented in table 2 demonstrates a high variability and no data on reproducibility were collected. This hampers the drawing of decisive conclusions. Biomass quantification with CH analysis in inhomogeneous biofilm samples is identified as one of the possible causes for this variability.

Table 2. The cleaning efficiency (CE) of the different CIP procedures tested with SWM and PVC-P biofilms and determined in different tests based on ATP and CH; variation is presented as the range of 2-4 separate biofilm samples from one test

CP	Biofilm substratum	Test ^a	CE ATP (log) AVG (range)	CE CH (%) AVG (range)
#1 Alkaline – acid	SWM	CIP-1	0.3 (0.3-0.3)	4 (-22-31)
#1 Alkaline – acid	PVC	CCT	0.4 (0.4-0.4)	8 (2-15)
#1 Alkaline – acid	PVC	BCT	1.4 (1.3-1.5)	77 (70-83)
#2 Detergent – acid	SWM	CIP-1	2.2 (2.1-2.4)	28 (27-29)
#2 Detergent – acid	PVC	BCT	0.4 (0.4-0.5)	57 (48-67)
#3 Det./alkaline –acid	SWM	CIP-1	0.5 (0.3-0.7)	44 (31-56)
#3 Det./alkaline –acid	SWM	CIP-2	1.2 (1.1-1.3)	21 (7-36)
#3 Det./alkaline –acid	SWM	BCT	1.8 (1.8-1.8)	29 (26-31)
#4 Acid – detergent	SWM	CIP-2	1.2 (0.9-1.6)	57 (39-74)
#4 Acid – detergent	SWM	BCT	1.2 (1.2-1.2)	12 (-5-29)
#4 Acid – detergent	PVC	BCT	1.6 (1.5-1.7)	82 (81-83)

^a CIP with intact SWM elements and BCT/CCT laboratory test with separate biofilm samples

