

BTO 2005.029
Mei 2005

Effect van chloor, chloordioxide en monochlooramine op biofilms met *Legionella* bij continue doorstroming



BTO 2005.029
Mei 2005

Effect van chloor, chloordioxide en monochlooramine op biofilms met *Legionella* bij continue doorstroming

Beoordeling van een 'dynamisch' biofilm-teststelsel, met ATP en koloniegetal (*Legionella* en HPC) als biomassa-parameters

© 2005 Kiwa N.V.
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.

Kiwa N.V.
Water Research
Groningehaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

Telefoon 030 60 69 511
Fax 030 60 61 165
Internet www.kiwa.nl

Colofon

Titel

Efect van chloor, chloordioxide en
monochlooramine op biofilms met *Legionella*
bij continue doorstroming

Projectnummer

111 546 100

Projectmanager

W.J.M.K. Senden

Kwaliteitsborgers

D. van der Kooij

Auteur

Daniël T. Verhamme

Dit rapport wordt selectief verspreid onder BTO-participanten (PBC) en is verder niet openbaar.

Voorwoord

Dit rapport is een compilatie en evaluatie van de resultaten van onderzoek uitgevoerd in de periode augustus 2003 tot september 2004. Hierin zijn drie fases te onderscheiden (hoofdstuk 1-3). De laatste testfase was zonder de assistentie van Ton Braat en Marijan Aarts van het LMB en met name zonder de praktische samenwerking met Anneke Roosma, in deze vorm niet mogelijk geweest.

Samenvatting

De potentiële aanwezigheid van pathogene *Legionella*-bacteriën in biofilms in (drink-)waterinstallaties ná de watermeter noodzaakt een beheersstrategie mét expertise aangaande chemische desinfectie/bestrijding gericht op biofilms. Dit rapport beschrijft in drie delen (H1-3) de evaluatie van een (hydro-)dynamisch biofilmtestsysteem voor effectiviteitsbepalingen van desinfectiemiddelen. Het betreft een kolom-setup gebaseerd op de Kiwa-biofilmmonitor (BM), waarin water bij gelijkblijvende temperatuur recirculeert, i.e. niet alleen de snelheid is instelbaar maar ook de verblijftijd en de temperatuur van het water in het systeem. Uiteindelijk zijn drie voor drinkwater relevante middelen op *Legionella*-biofilms uitgetest: chloor (Cl_2), chloordioxide (ClO_2) en monochlooramine (NH_2Cl). Teneinde het effect op de biofilm(-populatie) door blootstelling aan deze oxidatieve agentia vast te stellen, is naast bacterieel koloniegetal (voor *Legionella* en HPC) ook ATP, als kwantitatieve indicator voor levende biomassa, in de tijd gevolgd.

In H 1 zijn twee (ongelijke) prototypes van de biofilmmonitor met circulatie (BMC) gebruikt. Twee synthetische materialen (als buisstukjes) zijn gebruikt voor het kweken van biofilm gebruikt: zacht PVC (PVC-P, sterk groei-bevorderend in contact met water) en cross-linked polyethyleen (PE-X, relatief hard en minder groeipotentie). In batch gevormde biofilm op PE-X bleek onder (semi-)continue doorstroming in de BMC zo'n 100x effectiever te bestrijden met ClO_2 dan dynamisch gevormde biofilm op PVC-P. ClO_2 en Cl_2 verschilden niet significant in effectiviteit tegen *Legionella* en HPC in de relatief dunne en niet-sterk gehechte biofilms op PE-X. Maar ClO_2 leek totale inactivatie bij lagere concentraties te bewerkstelligen dan Cl_2 . Bij een relatief snel optredend effect zoals met PE, waarbij derhalve frequente bemonstering gewenst is, is het kolombemonsteringsprocédé hydrodynamisch gezien niet optimaal.

Effectiviteitswaarden (dosis voor X log-eenheden verval) per middel zijn naast waterkwaliteit (pH, temperatuur, DOC, AOC etc.) o.a. afhankelijk van de biofilm zelf (dichtheid (bio)massa, structuur, populatie, substraat/materiaaltype) en al dan niet dynamische condities tijdens vorming en bestrijding (zie literatuur en dit rapport) en krijgen pas vergelijkingswaarde als uitkomsten uit parallelle testen in één systeem onder gestandaardiseerde condities. Met dit vergelijkingsstreven is in H 2 en 3 een verbeterde versie van het BMC-concept getest: een ontwerp bestaande uit vijf parallel geschakelde units. De opstelling bleek per BMC-unit te kunnen functioneren als open dynamisch (chemostaat-)systeem. De kweek van *worst-case* (i.e. op PVC-P) *Legionella*-biofilm volgens een gestandaardiseerd protocol was significant reproduceerbaar. Bovendien was een 100-1000x grotere *Legionella*-populatie (10^7 CFU/cm²) haalbaar dan in batchkweek (zonder en met verversing van water). Maar de monsterstapelning ('top-down' benadering) bleek bij gebruik van sterk groei-bevorderend materiaal (buisstukjes) de homogeniteit in de kolom niet ten goede te komen. De robuustheid van het systeem onder (strikt) turbulente stromingscondities (indien haalbaar) is nog niet getest, hetgeen interessant is voor nader inzicht in desinfectie omdat 'turbulent-gevormde' biofilms minder gevoelig zijn.

Uit de drie experimentenseries bleek (niet verrassend) dat ATP als snelle biomassaparameter net zo geschikt is om de vorming van biofilm als om het verval ervan te volgen: de afname in koloniegetal (afdoding) en ATP-niveau (metabolische inactivering) correleren. Desinfectiemiddelen kunnen derhalve relatief snel getest en vergeleken worden. Maar ter beoordeling van de effectiviteit van een agens is ATP als 'overall' parameter geen vervanger van de koloniegetalbepaling, als het gaat om het effect op een specifieke populatie. Tegelijkertijd is het gebruik van beide parameters niet versterkend/additioneel in de beoordeling van de mate van biofilmverwijdering. Een combinatie van een van de twee met bijvoorbeeld een TOC- of EPS-bepaling is dat wel.

Uit de doseerproeven van H3 resulteerde voor de inactivering van de biofilmpopulatie op PVC-P de volgende effectiviteitreeks: $\text{NH}_2\text{Cl} > \text{Cl}_2 > \text{ClO}_2$. Het minder reactieve NH_2Cl zou dus inderdaad de biofilm beter kunnen penetreren met meer netto-resultaat te plaatse. Desalniettemin is deze uitkomst tegenovergesteld aan die uit recente onderzoekspublicaties (met andere materialen).

Inhoud

Voorwoord	1	
Samenvatting	3	
Inhoud	5	
Inleiding	7	
1	Invloed van chloor en chloordioxide op biofilms op PE en PVC in een dynamische testopstelling	9
1.1	Inleiding	9
1.2	Experimentele procedure	9
1.2.1	Testmateriaal	9
1.2.2	Statische biofilmkweek	9
1.2.3	Dynamische kweek en desinfectie van biofilms	10
1.2.4	Desinfectiemiddelen	10
1.2.5	Biofilmverwijdering	11
1.2.6	Biomassa parameters	11
1.2.7	Data verwerking	11
1.3	Resultaten	11
1.4	Discussie/conclusies	16
2	Invloed van chloordioxide en chloor op de biofilm op PVC-P bij doorstroming in een verbeterde biofilmmonitor met recirculatie	19
2.1	Inleiding	19
2.2	Experimentele procedure	19
2.2.1	Testmateriaal	19
2.2.2	Teststelsel: de verbeterde BMC	19
2.2.3	Biofilmproductie: statisch en dynamisch	20
2.2.4	Doseerproeven	20
2.3	Resultaten	21
2.3.1	Toetsing van BMC-concept als 'open' dynamisch systeem	21
2.3.2	Dosering met ClO ₂ en Cl ₂ : verbruik in water	22
2.3.3	Legionella-biofilm gekweekt onder statische en dynamische condities	23
2.3.4	Desinfectie met ClO ₂	26
2.3.5	Desinfectie met Cl ₂	26
2.4	Discussie/conclusies	28
3	Vergelijking van de invloed van chloor, monochlooramine en chloordioxide op een biofilm in met <i>Legionella</i> in het verbeterde dynamische teststelsel	31
3.1	Inleiding	31
3.2	Experimentele procedure	31
3.2.1	Protocol voor biofilmkweek in de BMC	31

3.2.2	Monochlooramine	33
3.3	Resultaten	33
3.3.1	Gestandaardiseerde kweek in de BMC	33
3.3.2	Desinfectie met NH ₂ Cl	34
3.3.3	Desinfectie met ClO ₂	36
3.3.4	Desinfectie met Cl ₂	38
3.3.5	Verval in ATP vs. verval in CFU	39
3.4	Discussie/conclusies	40
	Referenties	43
I	(bijlage) ClO₂ susceptibility of biofilm-associated <i>Legionella</i> in a batch assay	45
II	(bijlage) "Celvrij" ATP in de waterfase tijdens blootstelling van biofilm aan chloor	51

Inleiding

Dosering van een desinfectiemiddel aan een (drink-)waterinstallatie is één van de strategieën om problemen die een gevolg zijn van biofilmvorming te bestrijden of te voorkomen. Water en biofilm, onder te verdelen in diverse chemische, fysische en biologische parameters, zijn sterk van invloed op de effectiviteit van een desinfectans en dienen derhalve betrokken te worden in spoorwerk naar geschikte (verantwoorde én effectieve) middelen. In de eerste fase - screening van potentiële agentia - voldoen gestandaardiseerde (evt. high-throughput) 'statische' testen in batch, waarmee een desinfectiemiddel beoordeeld kan worden op werkzaamheid t.a.v. afdoding van micro-organismen in (e.g. bijlage I) én verwijdering van biofilm. Om tot een grondig onderbouwde keuze of advies te komen, moet tevens de effectiviteit onder (dis-)continue doorstroming - de geconditioneerd-gesimuleerde praktijksituatie - onderzocht worden. In de literatuur beschreven studies zijn veelal uitgevoerd met 'in-huis' systemen, variërend van bench-scale tot proefinstallatie. Een geharmoniseerde 'dynamische' procedure is niet voorhanden. Ondanks de verscheidenheid aan condities dient gestreefd te worden naar een representatief modelsysteem, waarin (combinaties van) parameters gecontroleerd kunnen worden geëvalueerd. Binnen Kiwa en de bedrijfstak ontbreekt het vooralsnog aan voldoende expertise aangaande de chemische bestrijding (niet-thermische desinfectie) van biofilms. Dergelijke parate kennis dient niet zozeer de (handhaving van de) kwaliteit van het biologisch-stabiele drinkwater in het Nederlandse distributienet, maar is wel noodzakelijk om (potentiële) calamiteiten 'na de watermeter' te voorkomen al dan niet te bestrijden. Een actueel gezondheidsrisico door aanwezigheid van (biofilm-geassocieerde) *Legionella* in installaties maakt een dergelijke beheersstrategie met name gewenst.

De experimentenserie beschreven in dit rapport dienden om inzicht te verkrijgen in de bruikbaarheid van een testsysteem afgeleid van de Kiwa-biofilmmonitor, maar dan met recirculerend temperatuur-gecontroleerd water, voor het bepalen van de effectiviteit van desinfectiemiddelen tegen '*Legionella*-biofilms'. Drie voor drinkwater internationaal-gangbare oxidatieve middelen zijn getest (alsmede geëvalueerd in de parallelle literatuurstudie): chloor, chloordioxide en monochlooramine. De klassieke methode om de concentratie- en tijdsafhankelijke inactivering van een (aan een desinfectans blootgestelde) bacteriepopulatie te volgen, geschiedt via de bepaling van het aantal kolonie-vormende eenheden in tijdreeksmonsters op agarmedia. Daarnaast bestaan verschillende snellere manieren om biologische activiteit in een monster vast te stellen. Een kwantitatieve indicator voor metabolische activiteit ('leven', actieve biomassa) is de aanwezigheid van adenosinetrifosfaat (ATP), als parameter in de microbiële ecologie geïntroduceerd in de jaren zestig van de vorige eeuw (Levin et al., 1964; Holm-Hansen & Booth, 1966; Karl, 1980). Vanaf de jaren zeventig wordt de ATP-bepaling als biomassa-assay toegepast voor de detectie van microbiële fouling (e.g. Picciolo et al., 1977; Characklis et al., 1982). Ridgway et al. (1983) correleerden ruim twintig jaar geleden reeds de bacteriepopulatie met de hoeveelheid biofilm-geassocieerd ATP in (reverse osmose-)waterzuiveringsmembranen.

En de eerste gestandaardiseerde ATP-assay voor de mate van biofilmvorming op synthetische materialen dateert ook uit die tijd (Ludwicka et al., 1984, 1985). Met de introductie van de Kiwa-biofilmmonitor (Van der Kooij et al., 1993) kreeg de ATP-bepaling z'n vaste waarde in de (drink-)water-microbiologische diagnostiek. Het streven is de ATP-methode standaard toe te passen in een (EU-)geharmoniseerde bepaling van de biofilmvormingspotentie van materialen in contact met drinkwater (Van der Kooij et al., 2003b). Vanzelfsprekend is ATP ook bruikbaar om het verval van een bacteriële populatie (in biofilm en water) o.i.v. chemische agentia te volgen (Aftring & Taylor, 1979; Denyer, 1989). Als output van de toetsing van een biofilm-teststelsel beschrijft dit rapport de toepassing van ATP en heterotroof koloniegetal (HPC en *Legionella* apart) als biomassa-parameters, om de effectiviteit van desinfectiemiddelen tegen biofilms onder dynamische condities kwantitatief te beoordelen.

De doelen van het onderzoek zijn:

- optimalisatie van een testcondities en parameters voor het beoordelen van het effect van desinfectiemiddelen op *Legionella* in biofilms;
- beoordelen van de effectiviteit van dosering van chloor, monochlooramine en chloordioxide op biofilms en *Legionella* onder dynamische condities

1 Invloed van chloor en chloordioxide op biofilms op PE en PVC in een dynamische testopstelling

1.1 Inleiding

De Kiwa-biofilmmonitor (BM, Van der Kooij & Veenendaal, 1993) fungeert als (by-pass) doorstroom-testeenheid, geïntegreerd in het leidingnet van een distributiegebied of drinkwaterinstallatie 'na de watermeter'. Om ook de invloed van temperatuur en verblijftijd van water (point-of-entry: leidingwater ter plaatse) op bench-niveau gecontroleerd te kunnen onderzoeken, is vervolgens voortbouwend op de BM een recirculatie-systeem ontwikkeld. Als representatief dynamisch biofilm-testsysteem dient deze circulatie-monitor (BMC) in principe ook bruikbaar te zijn voor het testen van desinfectiemiddelen. Voor deze studie stonden twee pilot-prototypes ter beschikking. Hiermee zijn proeven gedaan met twee desinfectiemiddelen (chloor en chloordioxide), op biofilms gegroeid op buisstukjes van twee typen synthetisch materiaal (cross-linked PE en zacht PVC).

1.2 Experimentele procedure

1.2.1 Testmateriaal

PE-Xa (20x2.2mm; Biroduct) en PE-Xc (16x2.2mm; Teceflex): cross-linked (X) polyethyleen, waarbij 'Xc' een hogere mate aan crosslinkstructuur heeft dan 'Xa'. PVC-P (16x2.0 mm): zacht polyvinylchloride.

1.2.2 Statische biofilmkweek

Testmateriaal (met RVS-draad verzwaarde PE-buisstukjes à ~2 cm lengte; PVC-slang à ~5 cm lengte) werden eerst grondig gewassen met leidingwater (20 min stromend, 24 uur stationair, 20 min stromend). Statische biofilmkweek in Erlenmeyers (Em. met glazen stop) werd geïnduceerd door 30 stukjes PE-Xa of PE-Xc in respectievelijk 2 liter (3-L Em.) en 1.5 liter (2-L Em.) kraanwater (pH 7.9-8.1), waaraan N- en P-bron toegevoegd (7.3 mg/L KNO₃ en 1.85 mg/L KH₂PO₄), te inoculeren met een *L. pneumophila*-positieve mixcultuur (afkomstig van biofilm, LMB-stock -80°C). Kweek vond plaats in een broedstof bij 37°C. Aanwas van biofilm werd gedurende 10-12 weken gevolgd door wekelijkse monsternamen (biofilm- en waterfase), in enkelvoud uit minimaal één Erlenmeyer per materiaaltype, waarop onderstaande biomassa-analyse werd uitgevoerd. Tegelijkertijd werd ook het water (plus P- en N-bron) in alle Erlenmeyers ververst, waarbij het PE-oppervlak:volume ratio zoals bij aanvang (0.38 cm⁻¹) gehandhaafd bleef. Biofilmvorming op PE werd tevens gevolgd onder dynamische condities, in de hieronder beschreven circulatie-biofilmmonitor (BMC*). Voor biofilmkweek op PVC-P

(zonder *Legionella*) is in deze experimentenserie alleen de BMC* gebruikt (geen batchkweek).

1.2.3 Dynamische kweek en desinfectie van biofilms

Groei- en desinfectie-experimenten onder continue doorstroming zijn uitgevoerd in circulatie-biofilmmonitors (twee pilot-opstellingen: BMC*-1&2), aangesloten op het leidingwaternet. De BMC onderscheidt zich van de standaard Kiwa-biofilmmonitor (KBM) doordat het door de kolom stromende water recirculeert en bovendien de temperatuur instelbaar is. Bij een debiet (instelbaar met een afsluiter) van het inkomende water van 15 L/h en een circulatievolume (inhoud kolom plus circuit) van ~0.75 L, heeft het water een verblijftijd van ~3 min in het systeem. Dit water circuleert m.b.v. een centrifugaalpomp via een thermostaat-element (warmtewisselaar), beiden gecontroleerd door een regelsysteem (Yokogawa, Eurotherm). Hiermee is het debiet/de circulatie-stroomsnelheid en de temperatuur (getest: 160 L/h, i.e. 0.1 m/s, 25 en 37°C) instelbaar, af te lezen op respectievelijk een flowmeter en een LED-display.

De dag voor het desinfectie-experiment werden de 'PE-biofilmringen' (ontdaan van RVS-draad) overgebracht naar de BMC. Een gevulde (glazen) kolom bevatte 25-30 materiaalringen (à 2 cm lengte), die (ook bij stilstand) ondergedompeld werden door bovenop drie schone glazen ringen (à 1.5 cm lengte) te plaatsen. De met PVC-P gevulde kolom bevatte bij de start van de biofilmgroei 9 slangstukken (à 5 cm lengte) aangevuld met glazen ringen. Het betreffende desinfectiemiddel werd gedoseerd m.b.v. een peristaltische pomp (Masterflex), aangesloten op het punt in de circulatie waar ook het leidingwater het circuit binnenkomt. Per tijdstip werden in een PE-desinfectietest twee buisstukjes en in de PVC-test één slangstuk gemonsterd. Deze werden overgebracht naar respectievelijk 20 mL (in 50-mL Greinerbuis) en 80 mL (in 100-mL bekersglas) steriel leidingwater (op ijs), met 0.025% natriumthiosulfaat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) als Cl-quencher. Ook werden watermonsters genomen (tappunt onderaan kolom) voor concentratiebepaling van desinfectiemiddel (zonder $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) en voor biomassa-analyse (met $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

1.2.4 Desinfectiemiddelen

Voor de test met PVC-P werd ClO_2 van Guldager (geleverd in twee componenten, 'Ox & Ac') gebruikt, in PE-testen ClO_2 van Halox (via Aquacare, 100-150 mg/L stock, elders electrochemisch bereid). Labstock chloor (5% w/v vrij Cl_2 , 60 g/L NaOCl) was afkomstig van Acros. Stockconcentraties ClO_2 werden direct-spectrofotometrisch gemeten (absorptie bij 360 nm). De ClO_2 -bepaling in watermonsters gebeurde met de indigotrisulfonaat (ITS) methode (Hoigné & Bader, 1980), zoals beschreven door Van Kranen & Van den Burg (1988). Voor de bepaling van Cl_2 (vrij chloor) werd de spectrofotometrische DPD-methode gebruikt (NEN 6480, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, protocol WB Europort).

1.2.5 *Biofilmverwijdering*

Hoge-energie sonificatie (HES) werd toegepast om biofilm van het testmateriaal los te trillen en te suspenderen. Hiervoor werd een Branson W-250 systeem (20 kHz) gebruikt uitgerust met een microtip als sonotrode. De ultrasoundbehandeling (instelling op 30 W outputvermogen) werd uitgevoerd op ijs gedurende 3 minuten en één (op PE-X) of twee (op PVC-P) maal herhaald in vers water. Voor PVC-P vond de laatste behandeling (2x 1.5 min, onderbroken om slangstuk 180° te draaien) plaats in een 50-mL Greinerbuis (met 40 mL water) in plaats van in het bekersglas, om positionering van het 5-cm lange PVC-P slangstuk in het verlengde van de microtip te bewerkstelligen.

1.2.6 *Biomassa parameters*

De ATP-inhoud (actieve biomassa) per gesuspendeerd biofilmmonster werd gekwantificeerd via een enzymatische standaardbepaling (Lumac). Koloniegetallen (serieel verdunde monsters uitgeplaat in tweevoud) werden bepaald op R2A-agar (voor HPC) en BCYE^{+ab}-agar (*Legionella*-selectief) volgens standaardvoorschriften.

1.2.7 *Data verwerking*

ATP- en koloniegetallen per biofilmmonster, i.e. per (opgemeten) materiaaloppervlak, zijn uitgedrukt in respectievelijk ng of pg ATP per cm² en kolonie-vormende eenheden per cm² (N, CFU/cm²). Overleving oftewel (log) inactivatie volgend op dosering van desinfectiemiddel is grafisch weergegeven als N_T (logschaal) of als log(N_T/N₀) tegen de contacttijd (T). Hieruit en via integratie van het gemeten concentratieprofiel (C tegen T) van het desinfectiemiddel kon de desinfectie-efficiëntie, uitgedrukt in CxT-waarden, worden bepaald.

1.3 Resultaten

Op het sterk groei-bevorderende PVC-P (zacht PVC) ontwikkelt zich in contact met drinkwater relatief snel biofilm met een hoge biomassa-concentratie per oppervlak (e.g. Van der Kooij & Veenendaal, 2001). PVC-P wordt daarom niet toegepast in drinkwatersystemen, maar is wel geschikt voor experimentele biofilmstudies. Biofilm op PVC-P heeft een 'los-vaste' verschijningsvorm. De basisbiofilm vertoont een sterke mate van (intrinsieke) hechting met het zachte substraat. Met hoge-energie ultrasound (HES) is een complete verwijdering (> 95%) t.b.v. bepaling van biomassa haalbaar, hoewel de lengte (5 cm) van de buisstukjes in deze proef niet HES-praktisch was. Maar met een consequente HES-uitvoering (vast aantal behandelingen en outputvermogen) is vergelijking van biomassa afkomstig van verschillende slangstukjes uit dezelfde groeifase mogelijk. Een eerste BMC-test, met ClO₂ als desinfectiemiddel, werd uitgevoerd op een PVC-biofilm, die gedurende 6 weken in BMC*-2 onder continue doorstroming met leidingwater (0.1 m/s, 25°C) gevormd was. Eerst werd proef gedraaid met BMC*-1 zonder biofilm-PVC-P, om te bepalen hoeveel ClO₂ gedoseerd moest worden om een

residuele concentratie van ongeveer 0.5 mg/L te bereiken, aangezien dit in batchproeven (Bijlage I) een 'praktische' (tijd-effectiviteit) concentratie was. Kort na de start van dosering aan BMC*-2 met biofilm-PVC-P (ná de eerste monsternamen, t=0), moest de doseersnelheid (door verbruik aan de biofilm) meer dan verwacht naar boven bijgesteld worden (Fig. 1.1A). Deze eerste dosis, met vervolgens een doseeronderbreking, bleek naderhand geen significant effect op de PVC-biofilm te hebben gehad, zodat het tijdstip van herstart als grafisch nulpunt werd genomen (Fig. 1.1B). Na 2.5 uur doseren met ClO₂ bleek de biofilm in de vorm van actieve biomassa (ATP-niveau, 45 ng/cm² bij aanvang) met 64% (0.44 log) gereduceerd te zijn. Dit ging (gecorruleerd) samen met een afname van de heterotrofe bacteriepopulatie (HPC, bij aanvang 1.01x10⁸ CFU/cm²) van 72%, oftewel 0.56 log. Via extrapolatie resulteerde dit in een CxT₉₉ waarde (99% = 2-log inactivatie) van ~350 mg·L⁻¹·min voor desinfectie van PVC-P-biofilm geassocieerde HPC-bacteriën met ClO₂.

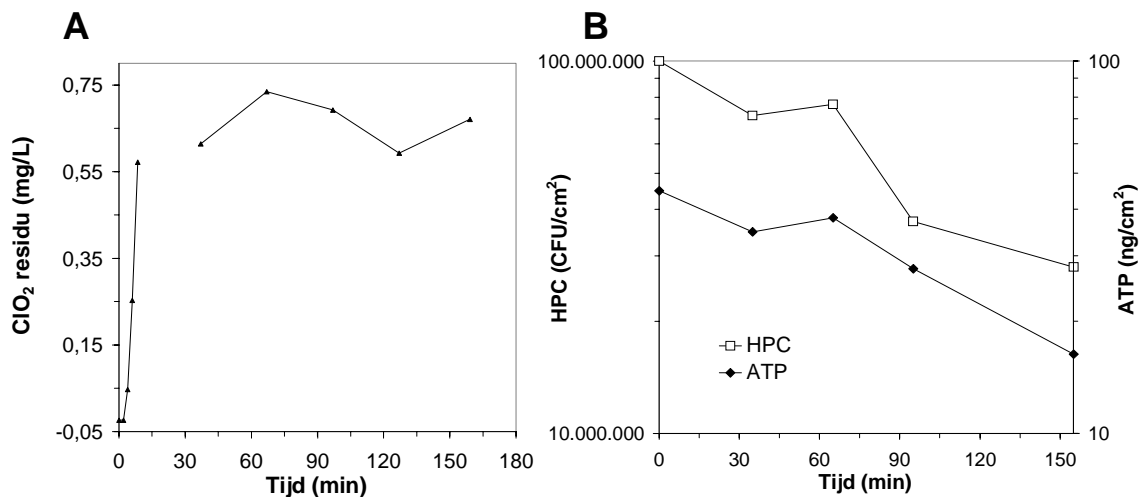


Fig. 1.1. Blootstelling van PVC-P-biofilm aan chloordioxide (ClO₂) onder (semi-)continue doorstroming in BMC*-2 (inlaat 250 mL/min, circulatie 160 L/h) bij 25°C. **A:** ClO₂ concentratieprofiel, met dosis (stock 195 mg/L) tussen 2 en 8 min elke 2 min stijgend met 1 mL/min tot 4 mL/min, gevolgd door een onderbreking vanaf 9 min, en een herstart na 35 min; **B:** HPC-populatie en ATP-niveau, ná herstart dosering.

Vervolgens is met *Legionella* 'verrijkte' biofilm, gevormd op cross-linked polyethyleen (PE-Xa en Xc), onderworpen aan behandeling met desinfectantia (Cl₂ en ClO₂) onder continue doorstroming. Op het hardere PE-X ontwikkelt zich minder biofilm dan op PVC-P. Maar ook in PE-biofilm kunnen HPC en *Legionella* hoge aantallen bereiken, waarbij een lagere crosslinkingsgraad (i.e. Xa < Xc) een hogere opbrengst geeft (e.g. Van der Kooij et al., 2000/2002). Kweek vond plaats onder statische condities in Erlenmeyers, om voldoende biofilmvoorraad te verkrijgen voor opeenvolgende experimenten met verschillende concentraties desinfectans, zonder daarvoor de beperkte capaciteit van twee BMC's te moeten inzetten. Bovendien vertoonde het gebruikte PE-materiaal in de BMC nauwelijks biofilmgroei (< 30 pg ATP/cm²), in tegenstelling tot de aanzienlijke vermeerdering (Xa > Xc) in batchkweek. In batch bereikte de biofilmbiomassa

na een maand een maximum, van 1300-1400 pg ATP/cm² op Xa en 300-400 pg/cm² op Xc (Fig. 1.2A&B). Daarna was de biofilm aan (fysiek) verval onderhevig; indien het water (in een parallelle Erlenmeyer) niet ververst werd was veeleer sprake van een plateau-fase (niet afgebeeld).

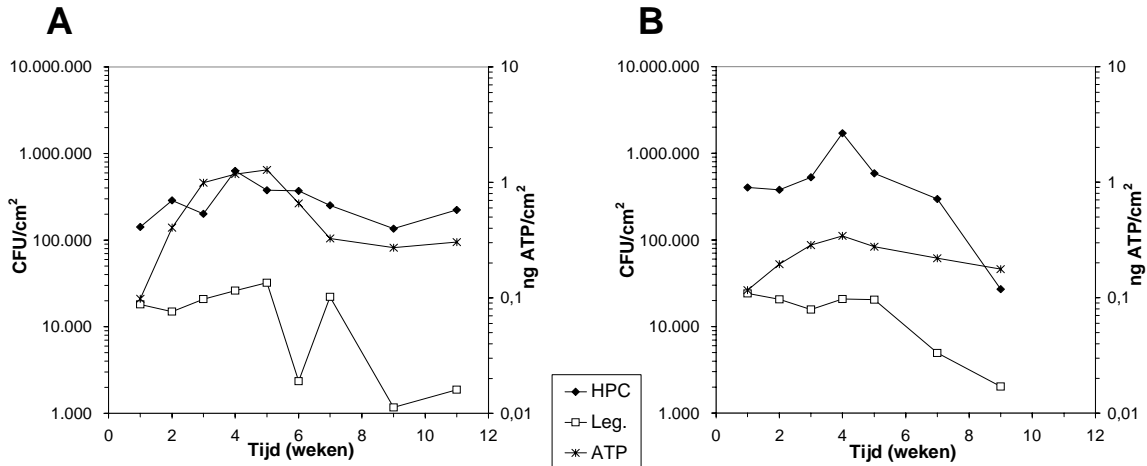


Fig. 1.2. Biofilmvorming op PE-Xa (A) en PE-Xc (B) in batch (Erlenmeyers) bij 37°C. Inoculatie op t=0, vervanging water plus nutriënten (P&N) na elk monstertijdstip.

De dag voor een desinfectie-experiment werden de biofilm-buisstukjes overgebracht naar een van de BMC's, met circulatiewater ingesteld op een temperatuur van respectievelijk 37°C (PE-Xa) en 25°C (PE-Xc). Tijdens de BMC-equilibratieperiode van de eerste PE-test (Fig. 1.3; een-maand-oude biofilm op PE-Xa), nam de gehechte biomassa nog met 5-600 pg ATP/cm² toe.

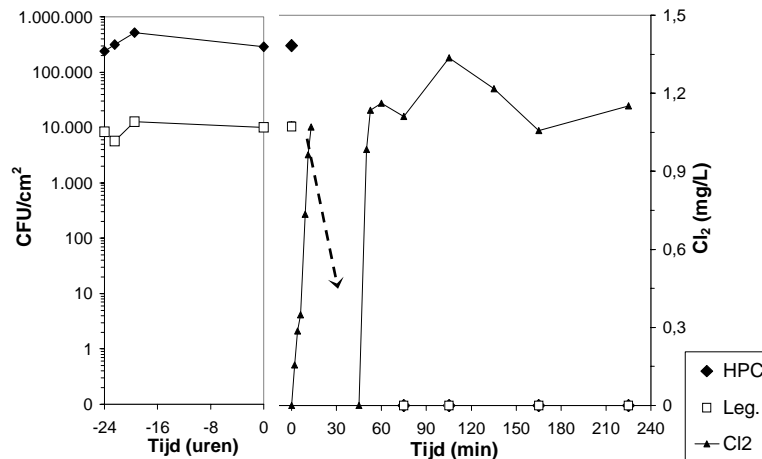


Fig. 1.3. Desinfectie van PE-Xa-biofilm met 1-1.5 mg/L chloor (Cl₂) onder dynamische condities bij 37°C. Links: de biofilmpopulatie (HPC en *Legionella*) in de BMC* (biofilm gekweekt in batch tot t=-24 uur) gedurende 24 uur voor doseerstart. Rechts: het effect van chloor op de biofilmpopulatie, met op de rechter y-as de residuele concentratie Cl₂. De dosering (stock 500 mg/L) werd op t=0 ingesteld op 0.5 mg/L, verhoogd naar 1 mg/L op t=8 min, onderbroken na 13 min, en herstart (1 mg/L) op t=45 min.

Net als in de PVC-test werd getracht ook aan deze biofilm een residuele concentratie van ongeveer 0.5 mg/L desinfectans, nu in de vorm van hypochloorzuur (HOCl), te doseren. Vanwege het pH-effect moest daarom een concentratie van 1-1.5 mg/L vrij chloor in het kolomwater (pH 7.9) meetbaar zijn. Opnieuw was het noodzakelijk de dosering te onderbreken om de residuele chloorconcentratie te verifiëren. In tegenstelling tot de PVC-P-test bleek deze eerste dosis en de dosis na hervatting tot de eerste monsternamen (totale doseertijd 40-45 min), de biofilm op PE-Xa al tot nul gereduceerd te hebben (Fig. 1.3), samengaan met een verval op (totaal) ATP-niveau van 1900 naar 2-3 pg/cm². In het daaropvolgende doseerexperiment met Cl₂ bleek gedurende dezelfde tijdspanne (40 min, eerste biofilmmonster na 20 min) een residuele chloorconcentratie van 0.3 mg/L al voldoende om de kweekbare *Legionella*-biofilmpopulatie op PE-Xa uit te schakelen (Fig. 1.4A; ATP van 1400 naar 5-10 pg/cm²). HPC-bacteriën (hoewel reeds gereduceerd met 99,9% na 40 min) waren 1.5 uur langer detecteerbaar, corresponderend met een verval van de overgebleven (actieve) biofilmmassa van 5-10 naar 1 pg ATP/cm². In de derde PE-Xa-test (Fig. 1.4B) is vervolgens ClO₂ gedoseerd met een residuele streefwaarde van 0.5 mg/L, waarbij de eerste biofilmbemonstering 10 min na doseerstart plaatsvond. Het ATP-niveau bij aanvang (400 pg/cm²) lag in deze 7-weken oude biofilm aanzienlijk lager dan in de twee voorgaande PE-Xa-testen (zie ook Fig. 1.2). Bij een residuele concentratie van gemiddeld 0.35 mg/L ClO₂ bleken na 30 min beide biofilm-geassocieerde-populaties te zijn geïnactiveerd (Fig. 1.4B).

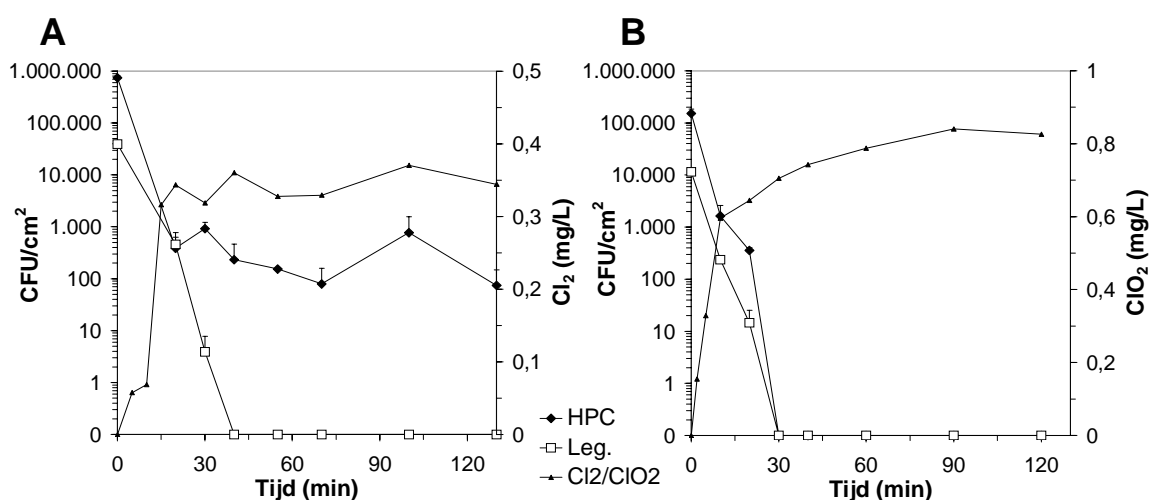


Fig. 1.4. Desinfectie van PE-Xa-biofilm met Cl₂ (A) en ClO₂ (B) onder dynamische condities bij 37°C (BMC-inlaat en circulatie resp. 250 mL/min en 160 L/h).

Aansluitend is (6-7 weken oude) biofilm gevormd op PE-Xc onderworpen aan een behandeling met Cl₂ en ClO₂. Nu werd een dusdanig lage concentratie gedoseerd dat biofilmverval gedurende twee uur via meer dan vier 'biofilmmonsters-met-opbrengst' gevolgd kon worden, om zo CxT-waarden nauwkeuriger te kunnen bepalen. In beide (eenmalig uitgevoerde) desinfectans-testen resulteerde dit in residuele concentraties (≤0.1 mg/L, niet afgebeeld) onder/rond de detectiegrens voor respectievelijk de ITS- en DPD-methode. Verdubbeling van de ClO₂-dosis (na 90 min) leverde wel een

significant meetbaar residu op (0.35 mg/L), door minder verbruik aan water (relatief) en resterende biofilm (absoluut). Het effect van Cl₂ vergeleken met het effect van ClO₂ op zowel de HPC- en *Legionella*-populatie (A en B) als de totale biomassa (ATP; Cen D) is afgebeeld in Fig. 1.5. Het log-inactivatie bereik voor ATP bedroeg zo'n 2 eenheden. Daarentegen bestreek de kweekmethode voor *Legionella* en HPC respectievelijk 4 en 6 log-eenheden, afhankelijk van de effectiviteit van de desinfectans-dosis en de populatie bij aanvang. Dit resulteerde in een (schijnbare) plateau-fase voor ATP (<10 pg/cm²), terwijl de bacteriële populatie nog aan significant verder verval onderhevig was. De *Legionella*-populatie bleek met het residuele ClO₂ even snel geïnactiveerd te worden als de HPC-populatie, waarbij een totale inactivatie binnen twee uur bereikt werd (doch n.b. laatste half uur met een dubbele dosis ClO₂). Met het Cl₂-residue vervielen beide populaties aanvankelijk sneller (tot 2 log-eenheden, oftewel 99%), maar werd een totale inactivatie binnen twee uur niet (overtuigend) gehaald.

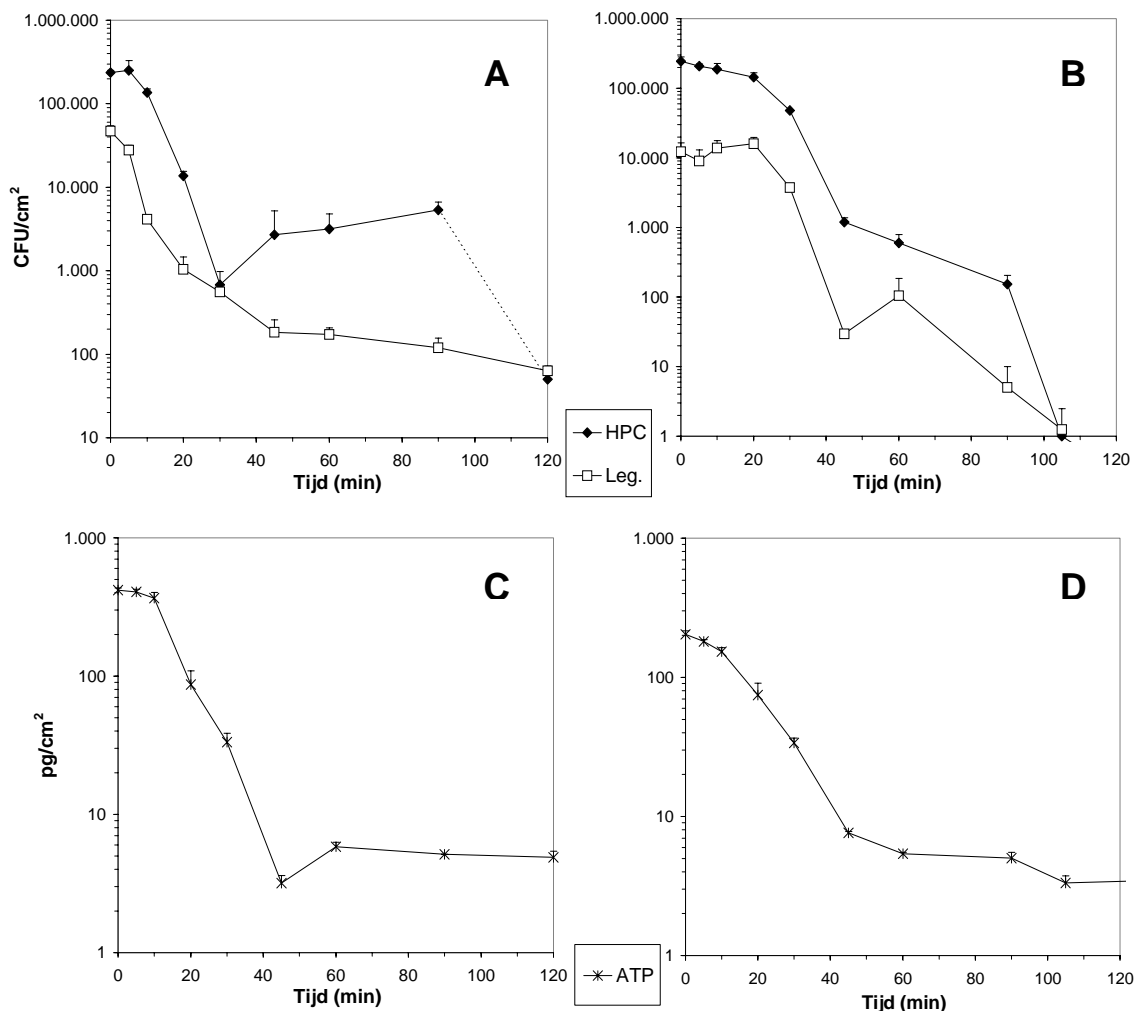


Fig. 1.5. Desinfectie van biofilm op PE-Xc onder dynamische condities bij 25°C (BMC-inlaat en circulatie resp. 15 l/h en 160 L/h). Inactivatie van de HPC- en *Legionella*-populatie (A en B) en verval van actieve biomassa (ATP; C en D) als gevolg van dosering met Cl₂ (links/A, C; 2 mL/min uit 30 mg/L vanaf t=0) en ClO₂ (rechts/B, D; 1 mL/min uit 135 mg/L vanaf t=0) met een residuele concentratie < 0.1 mg/L.

1.4 Discussie/conclusies

Het uiteindelijke doel waartoe o.a. deze studie moet leiden is tweeledig. Het is de bedoeling om een dynamisch biofilm-teststelsel te toetsen op bruikbaarheid (al dan niet te ontwikkelen) voor het bepalen van de effectiviteit van desinfectantia, om vervolgens tot een gestandaardiseerde effectiviteits-evaluatie (beoordeling en vergelijking) van die middelen te komen. Echter, de (rand-)voorwaarden waren nog niet solide genoeg; de hierboven beschreven experimentenserie moet daarom als oriënterend beschouwd worden. De twee beschikbare BMC-prototypes bleken onvoldoende robuust. Ze waren lekkage-gevoelig en zorgden voor kortsluiting. De meet- en regelapparatuur kwam niet overeen en was onpraktisch gesitueerd. De waterinlaatafstelling was niet betrouwbaar. De glazen kolommen verschilden in diameter. Ook de overige inhoud en de constructie van de twee circuits kwamen niet overeen. Al met al cruciale zaken als het gaat om reproduceerbaarheid en parallelle vergelijking van (uitkomsten van) continu-proeven. Tijdens de testperiode kwam een verbeterde BMC-opstelling beschikbaar waarin bovenstaande onvolkomenheden grotendeels verholpen waren. Desalniettemin waren de 'prototype-proeven' wel bruikbaar om het BMC-concept voor desinfectie-testen te evalueren. Hieruit kwamen de volgende punten naar voren:

- Dosering van een desinfectiemiddel aan de BMC dient nader gekarakteriseerd te worden. Het theoretisch concentratieverloop van een 'inert' middel in een 'ideaal' open systeem (chemostaat) biedt een houvast. Gemeten concentratiecurves van dat middel en vervolgens het agens (met en zonder biofilm) geven inzicht in het functioneren van de BMC als open systeem en het 'agens-verbruik' aan water en biofilm. Tegelijkertijd verhuult de gemeten residuele concentratie de daadwerkelijk (effectieve) dosis. De effectiviteit van desinfectantia zou ook bepaald en vergeleken kunnen worden door biofilmverval (log-inactivatie) te relateren aan de daadwerkelijk verbruikte hoeveelheid desinfectans aan het systeem.
- Voor elke biofilm-bemonstering uit de BMC moet de dosering en de waterdoorvoer onderbroken worden en het kolomwaterniveau dalen. Hoe frequenter een dergelijk 'hydrodynamische schok' op de aanwezige biofilm, hoe minder 'continu' het systeem. Bij een relatief snel optredend effect met frequente bemonstering is "hengel"-monsternamen niet optimaal.
- Het niet optreden van biofilmvorming op het in deze test gebruikte PE-X in de BMC (i.t.t. bijv. het PE-X in de Kiwa-warmtapwaterinstallatie; Van der Kooij et al., 2003) maar wel in de batchkweek, benadrukt het belang van het effect van continue doorstroming (laminair, turbulent en ertussenin) t.a.v. de beoordeling van de biofilmvormingspotentie van materialen in contact met (drink-)water. De *in batch* gevormde PE-biofilm hield in de BMC desondanks (zonder desinfectiemiddel) stand en nam zelfs toe in biomassa, naar het lijkt afhankelijk van z'n toestand in batch. Een periode van stilstand draagt dus bij aan de (initiatie van) biofilmvorming op (harde, relatief 'inerte') materialen.
- Uitgedrukt in CxT₉₉ verschillen ClO₂ en Cl₂ niet significant in effectiviteit tegen *Legionella* en HPC in de relatief dunne en niet-sterk gehechte biofilms op PE-X (CxT₉₉ 3-4 op Xa vs. 2 op Xc). Maar ClO₂ lijkt totale inactivatie bij

lagere concentraties te bewerkstelligen dan Cl_2 . Een vergelijking van CxT-waarden over twee log-eenheden is zoiets als het geven van een tussenklassement in een nog niet gestreden strijd.

- De geteste BMC-biofilm op PVC-P bleek meer dan 100x resistenter tegen ClO_2 (CxT₉₉ ~350 voor HPC) dan de batch/BMC-biofilm op PE-X en batch-biofilm op PVC-P (bijlage I): desinfectie-efficiëntie en effectiviteit van desinfectiemiddel is afhankelijk van biofilmdikte (concentratie biomassa), biofilmsubstraat (materiaaltype) en al dan niet dynamische condities (tijdens vorming en bestrijding).
- De mate van ATP-verval is een (snelle) indicatie voor degradatie van actieve biofilmmassa en dus voor de effectiviteit van een desinfectiemiddel. Inactivatie aan de hand van kolonie-vormende eenheden heeft echter een grotere bereik, d.w.z. het microbiële verval gaat nog door als het ATP-niveau (detectielimiet 1-3 pg/cm²) reeds een schijnbare plateaufase heeft bereikt.

2 Invloed van chloordioxide en chloor op de biofilm op PVC-P bij doorstroming in een verbeterde biofilmmonitor met recirculatie

2.1 Inleiding

Uit de voorafgaande studie is gebleken dat een op de Kiwa-biofilmmonitor gebaseerd recirculatie- en temperatuur-reguleerbaar systeem (de zgn. BMC) in potentie geschikt is voor dynamische biofilmdesinfectie-analyses. Echter, naast de mankementen van de (twee) prototype-opstellingen, is een enkelvoudige BMC niet ideaal voor een rigoreuze uitvoering van een kwantitatieve en parallelle vergelijking van desinfectiemiddelen op 'geconditioneerde' biofilms. Een verbeterde BMC was sinds enige tijd gereed en wel in vijfvoud in een parallel-geschakelde BM-opstelling. Hiermee kunnen met een grotere mate van reproduceerbaarheid binnen een korter tijdsbestek verschillende parameters in veelvoud al dan niet parallel getest worden.

In de hieronder beschreven serie experimenten is wederom de effectiviteit van chloordioxide en chloor getest, maar nu dus in de verbeterde BMC en tegen *Legionella*-biofilm gekweekt op één type materiaal. Gekozen is voor zacht PVC, een sterk groei-bevorderend plastic. Hiermee kan binnen korte tijd een *worst case* biofilmsituatie bewerkstelligd worden.

2.2 Experimentele procedure

Voor toelichting aangaande desinfectantia (ClO_2 van Halox), verwijdering biofilm (3x 2 min HES in 20 mL water), bepaling biomassa en verwerking data, wordt verwezen naar 1.2.

2.2.1 Testmateriaal

Slangstukjes zacht polyvinylchloride (PVC-P; 16x2.0 mm) à 1.5-1.75 cm lengte, grondig gewassen in kraanwater (20 min stromend, 1 uur stationair, 20 min stromend).

2.2.2 Teststelsel: de verbeterde BMC

De vijfvoudige recirculatie-biofilmmonitor bestaat uit vijf parallel-geschakelde BMC-units, elk als (afsluitbare) aftakking van een aanvoerleiding (RVS-316) aangesloten op het drinkwaternet. Na de aftakking en een inlaatvolumeregelaar (ABB; instelling 0-100%) doorloopt het water een circuit bestaande uit achtereenvolgens PVCu-leiding (kort, met doseerpunt), een circulatiesnelheidsmeter (Adinco; schaal in L/h), RVS-leiding, een

warmtewisselaar (Steuff), RVS-leiding (met aftappunt bovenaan), een glazen kolom (verticaal; i.d. 2,5 cm, lengte ~80 cm incl. koppelstukken) voor het biofilm-testmateriaal, een circuit-afvoerpunt (via drukmeter), PTFE-slang overgaand in RVS-leiding, en een centrifugaalpomp. De pomp en het hitte-element worden elektronisch aangedreven vanuit een controlekast met vijf regelunits (Yokogawa, Eurotherm). Schroefklemmen (onder en boven) houden de glazen koppelstukken en de kolom bijeen (lekvrij via Teflon-coated rubberen O-ringen). De totale circuitinhoud bedraagt ~600 mL, bestaande uit een kolomvolume van ~380 mL (incl. uiteinden) en een overig volume (~3,5 m lengte, ~0,9 cm i.d.) van ~220 mL. Voor en na gebruik van een BMC-unit werd deze grondig schoongemaakt door 'purging' (pomp op hoge snelheid) en een spoelbehandeling met achtereenvolgens zuur (0.1 M HCl), water, chloor (10-100 mg/L) en nogmaals water. Bovendien kregen de glazen onderdelen ontkoppeld een zuurbadbehandeling.

2.2.3 *Biofilmproductie: statisch en dynamisch*

Statisch: Biofilmkweek in Erlenmeyers (6x 3-L Em. met glazen stop) werd geïnduceerd door 40 stukjes PVC-P in 2 L leidingwater (langzaam-zand filtraat, pH 8.0) met toegevoegde N- en P-bron (7.3 mg/L KNO₃ en 1.85 mg/L KH₂PO₄) te inoculeren met 2 mL van een *L. pneumophila*-positieve mixcultuur (afkomstig van biofilm; ~10⁷ Leg./L stock -80°C). Kweek bij 37°C vond plaats in een broedstoof. Aanwas van biofilm werd gevolgd door aanvankelijk elke drie-vier dagen, daarna elke week en vervolgens elke drie weken minimaal één Erlenmeyer in enkelvoud te bemonsteren (biofilm- en waterfase), waarna biomassa-analyse (ATP en CFU) werd uitgevoerd. Aansluitend werd het water (plus P- & N-bron) ververst, waarbij het PVC-oppervlak:volume ratio zoals bij aanvang (0.32 cm⁻¹) gehandhaafd bleef, waarna de Erlenmeyers kort werden geschud.

Dynamisch: Biofilmvorming bij 37°C in de BMC is gevolgd vanuit twee uitgangssituaties: (1) statisch voorgekweekte biofilm op PVC-P-slangstukjes, afkomstig uit één Erlenmeyer, overgebracht naar een schone BMC-kolom; (2) schone PVC-P-slangstukjes in een schone BMC-kolom, aangeënt met 2 mL van bovenstaand *Leg.*⁺-inoculum. In het tweede geval (eerste: direct) werden waterinlaatvolume/verversingssnelheid (W) en circuit-circulatiesnelheid (C) in fases verhoogd (W: 125 mL plus boost na 15 en 24 uur, 250 mL plus boost na 4 dagen, naar 25 mL/min op dag 5; C: minimaal tot dag 5, daarna 50-100 L/h schaal-onnauwkeurig) naar respectievelijk 250 mL/min (15 L/h) en 180 L/h (~0,1 m/s in kolom) op dag 15. Biofilmmonsters (bovenste slangstukje(s)) werden periodiek genomen (volgorde: aandrijving uit, toevoer dicht, waterpeil omlaag, ontkoppelen, hengelen; herstart *vice versa*) en t.b.v. biomassa-bepaling overgebracht naar 50-mL Greinerbuizen met 20 mL steriel leidingwater op ijs.

2.2.4 *Doseerproeven*

Het betreffende middel (zout, desinfectans) werd aan een BMC-unit toegediend m.b.v. een peristaltische pomp (Masterflex, via Norprene-13 slang), aangesloten op het doseerpunt tussen de waterinlaat-volumeregelaar en de circulatie-flowmeter. Ter bepaling van de mate van biofilmverval als

gevolg van desinfectie werden per tijdstip twee biofilmslangstukjes gemonsterd en overgebracht naar 20 mL steriel kraanwater (in 50-mL Greinerbuizen op ijs) met 0.025% natriumthiosulfaat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) als Cl- quencher. Ook werden watermonsters genomen (tappunt onderaan kolom) voor concentratiebepaling van desinfectiemiddel (in buis zonder $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) en analyse van actieve biomassa (in buis met $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Bepaling van de geleidbaarheid (Sievert, S) van afgetapt water werd direct uitgevoerd met een portable meter (Thermo Electron electrode-device).

2.3 Resultaten

2.3.1 Toetsing van BMC-concept als 'open' dynamisch systeem

Het concentratieverloop vanaf nul van een niet-reactief middel in een ideaal open systeem, i.e. een chemostaat ($\text{flow}_{\text{in}} = \text{flow}_{\text{uit}}$, direct-volledige menging), wordt bepaald door de dosis van het middel en de verdunningssnelheid/verbliftijd van het water in de reactor. Het al dan niet voldoen hieraan is in een (schone en lege) BMC-unit getoetst (Fig. 2.1) door de toename in geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{min}$) van het circuitwater (verversing 250 mL/min) te meten volgend op dosering met een ('inerte') zoutoplossing (KCl). Het theoretische concentratieprofiel van zo'n dosering aan een chemostaat met een waterverversing van 250 mL/min en eenzelfde inhoud (600 mL) als verondersteld voor een BMC-unit is ook afgebeeld. Hieruit blijkt dat volgens het 'ideale model' het evenwicht (dosis per waterverversing) sneller bereikt wordt dan daadwerkelijk gemeten. Het optreden van onvolledige (vertraagde) menging was niet aannemelijk aangezien een verdubbeling van de rondpomsnelheid (van 160 naar 320 L/h) geen effect had (niet afgebeeld). De doseerdata bleken wel te correleren met een ideale dosering aan een chemostaat van 950 mL (fit in grijs tint in Fig. 2.1).

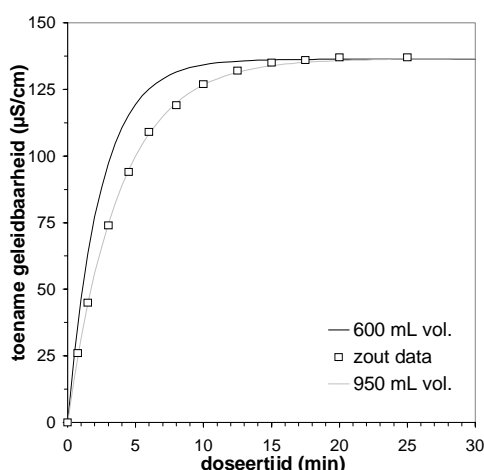


Fig. 2.1. Doseerprofielen (bij een waterverversing van 250 mL/min) van een inert middel aan een open dynamisch systeem (chemostaat) met een intern volume van respectievelijk 600 mL ($D\ 0,42\ \text{min}^{-1}$) en 950 mL ($D\ 0,26\ \text{min}^{-1}$), en van zout (KCl) aan een BMC-unit.

2.3.2 Dosering met ClO_2 en Cl_2 : verbruik in water

Aan de hand van de (niet-reactief) theoretische eindconcentratie en het daadwerkelijk (reactief) gemeten concentratieprofiel (mg/L, ppm) van een agens bij gegeven dosering X (mg/min) en waterverversing Y (L/min), kan het agensverbruik aan het water in een BMC-unit bepaald worden. Gemeten BMC-concentratieprofielen voor drie doseerhoeveelheden ClO_2 bij een waterverversing van 250 mL/min zijn afgebeeld in Fig. 2.2. Hieruit kon bij *steady state* een ClO_2 -verbruik aan het water van $\sim 0,7$ mg/L (theoretische minus gemeten eindwaarde) afgeleid worden. Door die 'vraag' duurde het langer voordat de desbetreffende eindconcentratie bereikt werd, waardoor de data niet te correleren waren met het concentratieverloop volgens een eenvoudig 'open dynamisch' model (met circuitvolume van 950 mL). De aanwezigheid van schone PVC-slangstukjes (kolom gevuld) leidde niet tot extra ClO_2 -vraag, wel tot een 'zichtbare' verkleining van het circuitwater-volume (i.e. eindwaarde werd sneller bereikt). Uit doseringen met chloor resulteerde een chloorvraag van 0.4-0.8 mg/L (datasets waren onderling minder consistent). I.t.t. ClO_2 bleek chloor wel significant 'verbruikt' te worden door PVC-P (Fig. 2.3).

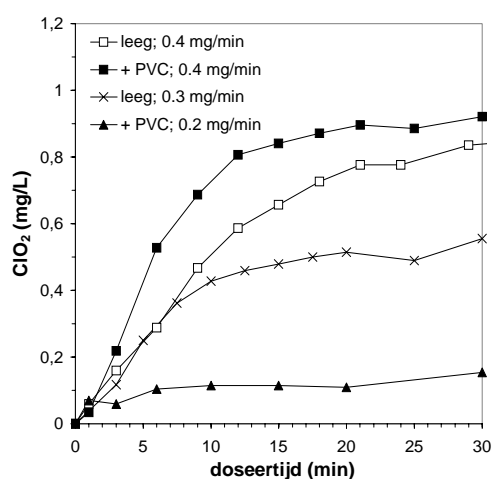


Fig. 2.2. Concentratieprofielen voor drie doses ClO_2 (stock 105-110 mg/L) in een BMC-unit (W 250 mL/min; C 180 L/h) zonder en/of met PVC-slangstukjes.

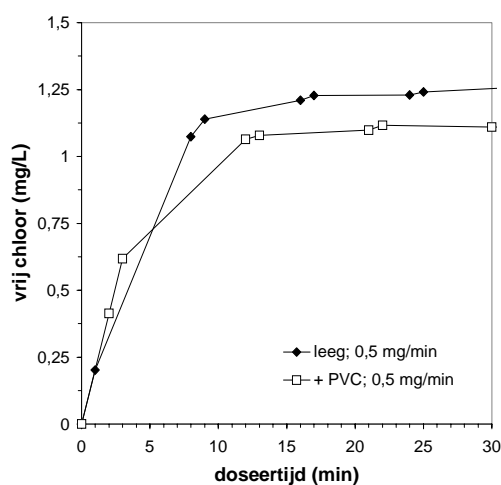


Fig. 2.3. Concentratieprofiel voor een dosering van 0,5 mg/min Cl_2 (stock 210 mg/L) aan een BMC-unit zonder en met PVC-slangstukjes.

2.3.3 *Legionella*-biofilm gekweekt onder statische en dynamische condities

De ontwikkeling van *Legionella*-biofilm op PVC-P onder (semi-)statische condities is gedurende drie maanden gevolgd in batchkweek (bij aanvang 6 Erlenmeyers). PVC-P bevordert de groei in sterke mate, zowel in het water als in de gehechte fase. Om zuurstofgebrek te voorkomen werd de waterfase (aanvankelijk) regelmatig vervangen door vers leidingwater (plus nutriënten, P&N), wat tevens zou moeten leiden tot een meer gevarieerde populatie (niet getest). De aanwas van biofilm massa (ATP, Fig. 2.4) verliep zoals verwacht snel, tot twee weken ongeveer 1:1 en daarna tot 3:1 in verhouding tot de biomassa in de waterfase (in ng ATP per cm² PVC-P, niet afgebeeld). Na 3-4 weken trad nivellering op (Fig. 2.4). *Legionella* accumulatie was gedurende de eerste twee weken niet detecteerbaar en stagneerde vervolgens bij $\sim 1 \times 10^4$ - 5×10^4 CFU/cm², fluctuerend omdat vanaf drie weken telkens een andere Erlenmeyer bemonsterd werd (Fig. 2.4). Uit parallelle PVC-biofilmkweek (kleinschalig gedurende een maand, analyse op dag 4, 15 en 29), zowel met als zonder nutriënten en aangeënt met een dubbele hoeveelheid *Legionella*-inoculum per volume-eenheid, bleek het niet verversen ten koste te gaan van de biologische activiteit ($\sim 75\%$ afname in ATP-getal tussen dag 4 en dag 29) in de biofilm, maar niet van de *Legionella*-populatie ($\sim 10^6$ /cm², op dag 15 en 29).

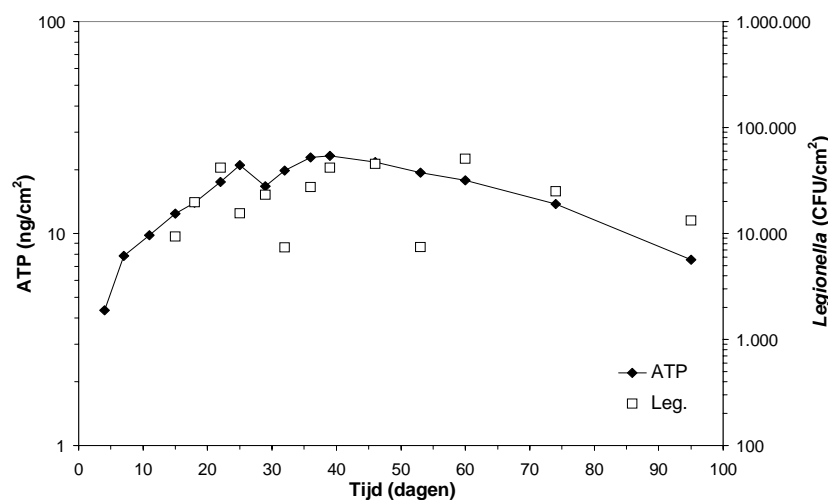


Fig. 2.4. Statische (batch) kweek van *Legionella*-biofilm op PVC-slangstukjes in Erlenmeyers bij 37°C. De planktonfase werd na elke monsternamen vervangen door vers leidingwater (plus nutriënten P&N).

De PVC-slangstukjes (met 5,9 ng ATP per cm² na rinse-wash, n=1) uit één van de zes Erlenmeyers werden op dag 7 (water verversed op dag 4) overgeheveld naar kolom 1 van de BMC. De BMC-unit werd aangesloten op het leidingwater net (in=uit 250 mL/min) met een rondpompsnelheid van 160 L/h (0.1 m/s in kolom). Het grootste gedeelte (90% na 2,5 uur) van de actieve 'batch-biofilm massa' spoelde weg gedurende de eerste uren na het aanzetten van de waterflow, maar overnacht bleek de biofilm-ontwikkeling reeds hersteld (Fig. 2.5); na 8 dagen lag het ATP-gehalte van de biofilm (35-40

ng/cm²) ruim 1,5x hoger dan het maximum in batch na 5-6 weken. Bovendien bleek voldoende (bij overheveling nog niet detecteerbare) batchbiofilm-geassocieerde *Legionella* achtergebleven. Hiermee kwam relatief snel (dag 2, overeenkomend met dag 9 in batch) een detecteerbare accumulatie tot stand, terwijl dit in batch pas op dag 15 het geval was. De *Legionella*-populatie bereikte een ruim drie log-eenheden hoger niveau (maximum/plateau 3×10^7 - 9×10^7 CFU_*Leg.*/cm²) dan in batch (Fig. 2.4 & 2.5) en leek bovendien stabielier dan de totale actieve biomassa (Fig. 2.5).

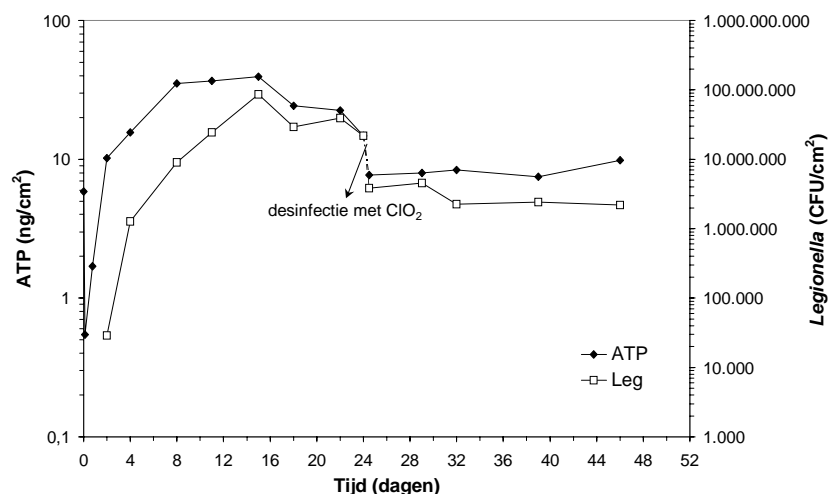


Fig. 2.5. Dynamische kweek van *Legionella*-biofilm op PVC-slangstukjes in BMC-1 (T 37°C, W 250 mL/min, C 160 L/h), na statische voorkweek vanaf dag -7.

Indien drie-weken-oude batchbiofilm (kweek 4 en 5 naar kolom 4 en 5; 12,4 ng ATP en 4×10^3 CFU_*Leg.* per cm² PVC-P na rinse-wash) werd onderworpen aan dynamische condities in de BMC, dan spoelde na het opstarten aanzienlijk minder biomassa weg (na 5-6 uur 50% van ATP-gehalte, *Legionella* insignificant), vergeleken met de BMC-start met jonge batch-biofilm. Uitgedrukt in ATP-getal was de dynamische biofilm-aanwas lager, maar de *Legionella* accumulatie verschilde niet significant (Fig. 2.6 vs. 2.5).

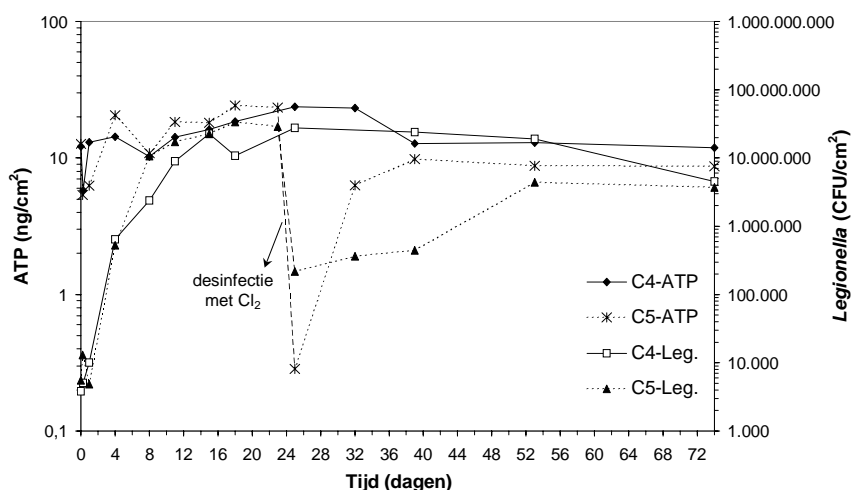


Fig. 2.6. Dynamische vervolgstreek van *Legionella*-biofilm op PVC-slangstukjes in BMC-4&5 (T 37°C, W 250 mL/min, C 180 L/h), na statische voorkweek vanaf dag - 21.

Legionella-biofilmvorming is tevens bijgehouden na het rechtstreeks aanenten van een met PVC-P gevulde BMC-kolom met *Legionella*+inoculumstock. Vanuit semi-batchtoestand werden de instellingen gefaseerd verhoogd naar de gewenste dynamische condities (zie § 2.2.3). Na 5 dagen semi-batchkweek (3x partiële waterverversing plus boost, vervolgens nauwelijks circulatie) was *Legionella* reeds biofilm-geassocieerd detecteerbaar (Fig. 2.7). Bij een waterverversing (W) van 25 mL/min en een rondpompsnelheid (C) van 50-100 L/h, nam die populatie gedurende een week exponentieel toe en stabiliseerde vervolgens rond de 2×10^7 CFU_{Leg.}/cm². Het ATP-gehalte hield gelijke tred. Een verhoging naar 250 mL/min (W) en 180 L/h (C) vanaf dag 15 had weinig effect.

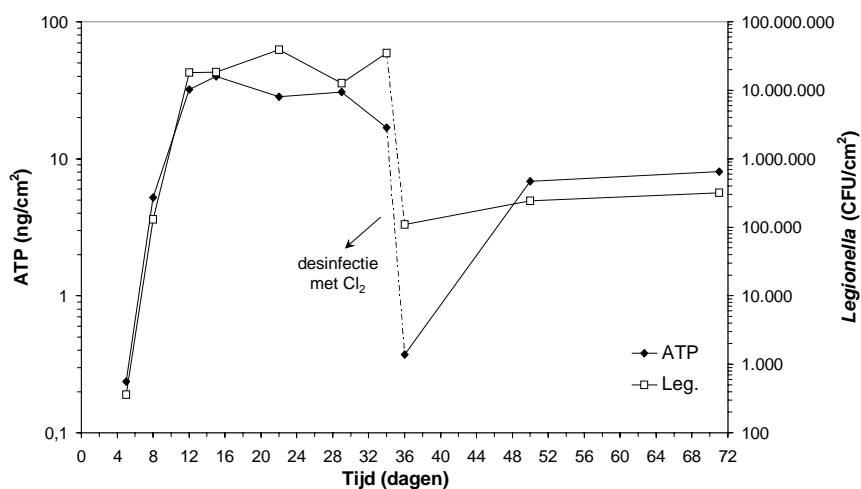


Fig. 2.7. Dynamische kweek (semi-batch tot dag 5, direct in BMC-unit) van *Legionella*-biofilm op PVC-slangstukjes in BMC-2/3 (T 37°C, W 0-250 mL/min, C 0-180 L/h).

2.3.4 Desinfectie met ClO_2

De *Legionella*-biofilm op PVC-P in kolom 1 van de BMC (Fig. 2.5) werd na ruim drie weken onderworpen aan een desinfectietest met chloordioxide. Deze werd uitgevoerd bij een watertemperatuur van 25°C, onder dezelfde hydrodynamische condities als tijdens de kweek. Om in de BMC-unit een ClO_2 -residu van 0.5 mg/mL te bewerkstelligen, diende gedoseerd te worden met 0,3 mg/min (voor een 'no demand' concentratie van 1,2 mg/mL). Die (halverwege de dag gestarte) dosering leek effectief, de biofilmstructuur werd binnen enkele uren ogenschijnlijk losser. Daarom werd na 5 uur gestopt, in plaats van overnacht door te gaan. Maar vervolgens bleek de actieve biofilmmassa (ATP) gedurende die 5 uur nauwelijks gehalveerd (0.3 log) te zijn (Fig. 2.8A). De *Legionella*- en HPC-populatie waren respectievelijk ~80% (0.7 log) en ~70% (0.5 log) in dichtheid afgenomen (Fig. 2.8B). Via extrapolatie (aanname: gelijkblijvende vervalsnelheid) konden CxT₉₉-waarden (2 log verval) worden afgeleid: 350-400 voor *Legionella* en 450-500 voor HPC. Na de dosering met ClO_2 herstelde de biofilm (ATP- en koloniegetal) zich niet meer (Fig. 2.5).

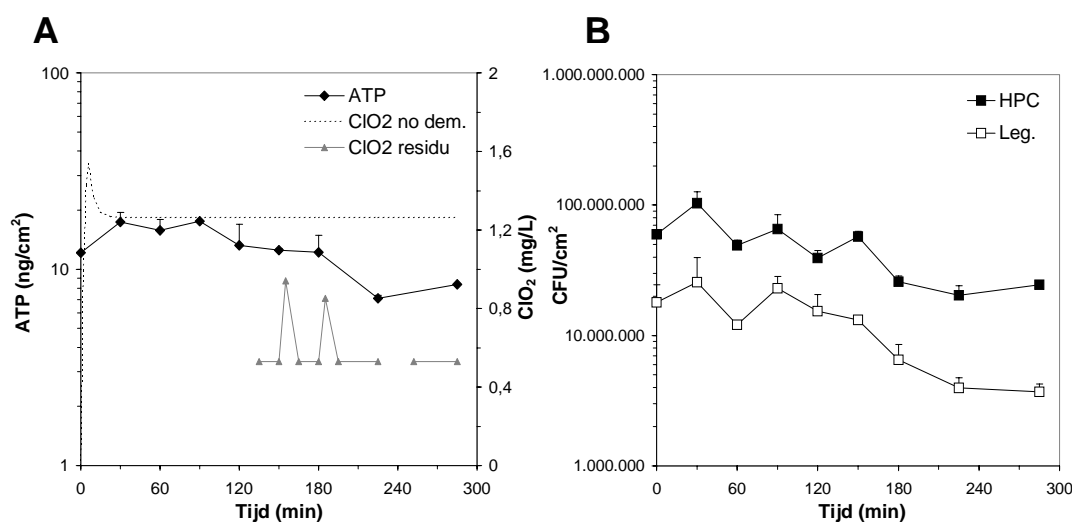


Fig. 2.8. Bestrijding van *Legionella*-biofilm op PVC-slangstukjes in BMC-1 (T 25°C, pH 7,9-8,1, W 250 mL/min, C 160 L/h) met chloordioxide (stock 110 mg/L, 0,3 mg/min, dubbele dosis tot 3 min). **A:** ATP (linker y-as) en concentratieverloop ClO_2 (rechter y-as), zonder verbruik (theoretisch) en gemeten (mislukt t/m 2 uur, 'spikes' door herstart dosering vóór flow); **B:** *Legionella* & HPC.

2.3.5 Desinfectie met Cl_2

Gedurende een etmaal werd een betrekkelijk hoge concentratie chloor (1.6 mg/L residu in circuit) gedoseerd aan BMC-kolom 5 met daarin gedurende drie weken op PVC-P gevormde *Legionella*-biofilm (voor groeicurve zie Fig. 2.6, voor en na dosering). Na 1,5 uur bleek het verval al significant ingetreden (Fig. 2.9). Na 17 uur (met een overnachtinterval van 15 uur) was het ATP-biofilmniveau met meer dan 99% gereduceerd. Na de daaropvolgende monsternamen (20 uur) werd de dosering niet voortgezet. Deze laatste

biofilmmonsters vertoonden echter weer verhoogde metabolische activiteit (Fig. 2.9A). Dit beeld correspondeerde met het koloniegetalprofiel (Fig. 2.9B). Een 'bij benadering' extrapolatie van de CFU-data op t=0, 0,5 en 1,5 uur resulteerde in een CxT₉₉-waarde van rond de 1000 voor zowel *Legionella* als HPC. Na de chloordosering herstelde de biofilm op de overgebleven slangstukjes zich tot 50% (relatief snel) van z'n ATP-niveau en tot ~1 log-eenheid onder z'n *Legionella*-populatie van voor de test (Fig. 2.6).

Om de klaarblijkelijke discontinuïteit, bij dezelfde blootstelling (CxT), in biofilmverval tussen opeenvolgende slangstukjes nader te onderzoeken, is vervolgens de biofilm in kolom 2, gedurende ruim een maand gevormd op PVC-P zonder batch-voorkweek (groeicurve Fig. 2.7), bestreden met chloor, ditmaal dubbel zo lang (48 uur) en met een gehalveerde dosis (0.75 mg/L residu). Voor deze desinfectietest werden de biofilmslangstukjes echter "in één stapel" (met ringhengel) overgeheveld naar een schone kolom (BMC-unit 3), gevolgd door een equilibratie (uitspoeling losgeraakte massa) van 45 min. Dosering aan deze biofilmkolom in een schoon circuit resulteerde in zo'n 33% minder chloorverbruik tot ruim een uur na doseerstart (verschil in gemeten vrij chloorprofiel tussen gebruikte-lege en gevulde- 'schone' unit, niet afgebeeld). Het biofilm massa-verval verliep exponentieel (Fig. 2.10A&B). Een blootstelling van 20 uur (met een overnachtperiode van 13 uur) leidde tot een afname van het ATP-gehalte met meer dan 99% (Fig. 2.10A). De populatie (CFU_Leg&HPC per cm²) nam in die periode met drie log-eenheden (99.9%) af; uit die data kon een CxT₉₉-waarde van 500 worden bepaald (Fig. 2.10B). Maar de biofilm op de daaropvolgende biofilmslangstukjes (monsternames na intervallen van 3 en 4 uur) bleek niet in dezelfde mate onderhevig geweest aan verval. Een tweede overnachtperiode leverde weer 'netto-verval' op, maar niet van de biofilm op de slangstukjes daaronder. Na de desinfectieperiode herstelde de totale actieve biofilm massa (ATP) sterker dan de *Legionella*-populatie (Fig. 2.7).

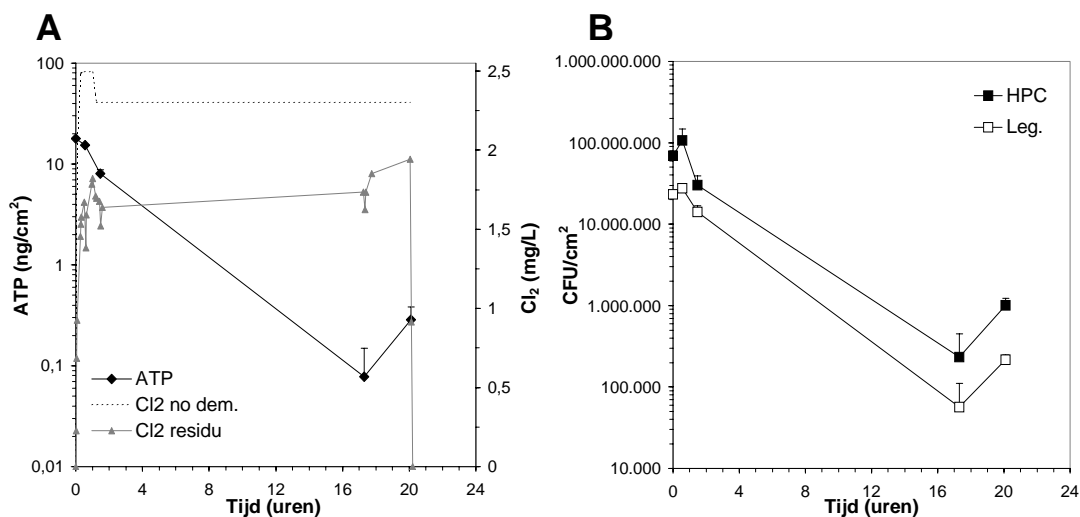


Fig. 2.9. Bestrijding van *Legionella*-biofilm op PVC-slangstukjes in BMC-5 (T 25°C, pH 7,9-8,1, W 250 mL/min, C 180 L/h) met chloor (stock 300 mg/L, 0,6 mg/min). **A:** ATP (linker y-as) en concentratieverloop Cl₂ (rechter y-as), zonder verbruik (theoretisch) en gemeten (residu); **B:** *Legionella* & HPC.

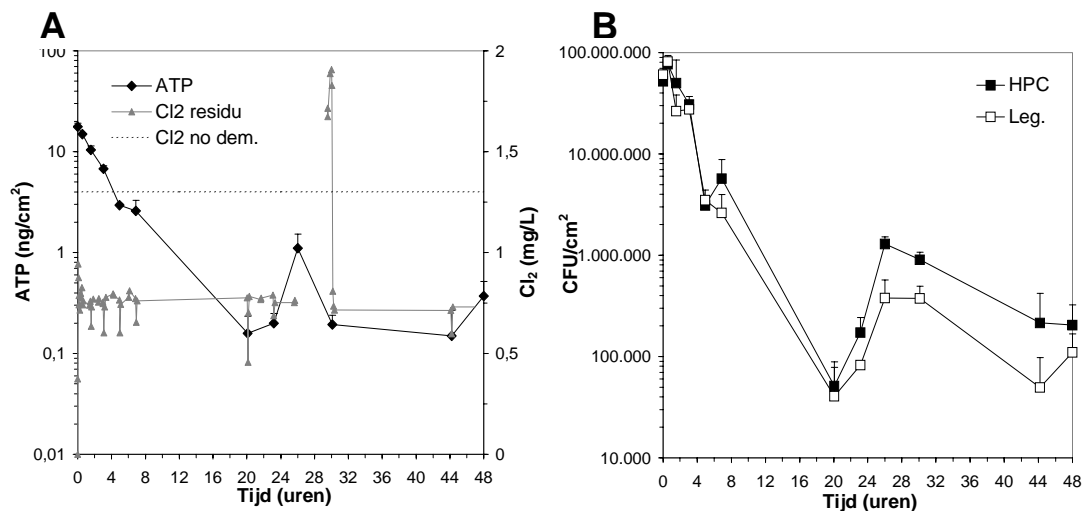


Fig. 2.10. Bestrijding van *Legionella*-biofilm op PVC-slangstukjes in BMC-3 (T 25°C, pH 7,9-8,1, W 250 mL/min, C 180 L/h) met chloor (stock 150 mg/L, 0,3 mg/min, dubbele dosis tot 3 min). **A:** ATP (linker y-as) en concentratieverloop Cl₂ (rechter y-as), zonder verbruik (theoretisch) en gemeten (residu); **B:** *Legionella* & HPC.

2.4 Discussie/conclusies

De BMC is geëvalueerd als opvolger van de twee enkelvoudige prototypes (1), op z'n functioneren als open dynamisch systeem (2), en als testsysteem voor de beoordeling van desinfectie-effectiviteit (3). Wat betreft (1) scoorde de BMC op alle punten (§ 1.4) beter: het is een solide opstelling voor de gecontroleerde doorstroming en circulatie van temperatuur-gecontroleerd water. Met de nadruk op continue flow, aangezien de warmtewisselaars bij geen/minieme flow (batch-conditie) onbestendig reageerden. Ook een minpunt was de gevoeligheid voor lekkage (m.n. onder de druk bij hoge flow): de O-ringen tussen de koppelstukken en de kolom dienen niet noodzakelijk van teflon te zijn als het gaat om biofilmproductie op groei-bevorderend materiaal waarbij de 'afgifte van en aangroei op' de O-ringen in het niet valt. Verder leiden afzetting en aangroei ('dichtslibben') elders in het circuit, m.n. bij sterk groei-bevorderend materiaal in de kolom, tot drukval en extra verbruik van toegediende 'reagentia'. Een oplossing hiervoor is het overhevelen van de biofilmslangstukjes van een 'productie-unit' naar een schone unit (zie tweede doseerproef met chloor).

Natuurlijk kunnen de afmetingen van een BMC-circuit nauwkeurig worden bepaald, of zijn ze te achterhalen via het bouwplan. Indien desalniettemin aan de hand van de concentratieprofielen van de doseringen met zout wordt geconcludeerd dat een BMC-unit functioneert als een ideaal open systeem (een chemostaat), dan is diens circuitvolume dus 1,5x groter dan aanvankelijk 'ingeschat'. Deze uitkomst (950 mL) verklaart de gemeten snelheid (trager dan verondersteld) van evenwichtinstelling maar beïnvloedt niet het uiteindelijke concentratieniveau. Testen bij lagere rondpompsnelheden zouden meer inzicht kunnen geven in mengings-karakteristiek (van ideaal naar vertraagd). Het hoge niet-bemonsterbaar circuitvolume van 60% bij aanvang (het water moet ergens heen om rond te komen, maar het zou wat

efficiënter kunnen) is bij correct onderhoud niet bezwaarlijk (want omgeven door RVS- en PTFE-leidingmateriaal).

Het voordeel van biofilmkweek onder open dynamische condities heeft zich in deze experimentenserie overtuigend bewezen. De verrijking met *Legionella* was in BMC-biofilm drie log-eenheden hoger dan in batch-biofilm. Het relatief snel en regelmatig verversen van de batch-waterfase had geen effect. In feite is het sterk (ook in de waterfase) groei-bevorderende PVC-P geen geschikt biofilmmateriaal voor batchkweek. Er is immers nooit sprake van een overgrote populatiemeerderheid in de gehechte fase, als zijnde een typisch biofilm-water onderscheid. Onder continue doorstroming bij voldoende verdunning (verblijftijd water < groeisnelheid) is dat wel het geval. Een week, drie weken of helemaal geen batch-voorkweek in Erlenmeyers, steeds vertoonde PVC-P in de BMC dezelfde *Legionella*-capaciteit: 10^7 - 10^8 CFU/cm². Zulke hoge dichtheden zijn nog niet eerder gerapporteerd in de literatuur. Verschillen in verdunnings- en circulatiesnelheid (flow-instellingen), van respectievelijk een factor 10 en een factor 2-3 (250 ml/min & 180 L/h in Fig. 2.5 en 2.6 versus 25 mL/min & 50-100 L/h in Fig. 2.7), hadden naar verhouding weinig impact op de groeisnelheid van *Legionella* in de exponentiële fase (~2x hoger bij de lage flow). Eventuele destabilisatie gevolgd door uitspoeling, na verhoging van de flow naar 250 ml/min & 180 L/h (meer shearing) in unit 2 tijdens de plateaufase (dag 15), was een week later niet waarneembaar (Fig. 2.7).

De doseerproef met ClO₂, voor de bepaling van diens desinfectie-effectiviteit tegen *Legionella*-biofilm op PVC-P, werd te vroeg gestopt. Via extrapolatie kon een inschatting gemaakt worden van de CxT-breedteband voor 2 log-eenheden inactivatie: van 350 (ondergrens *Legionella*) tot 500 (bovengrens HPC). Deze grootte van (in-)effectiviteit voor ClO₂ is (insignificant?) hoger dan de waarde (350, alleen voor HPC, tevens bij benadering) bepaald uit de BMC-test met PVC-P-biofilm in hoofdstuk 1.

Uit de twee doseerproeven met chloor (Fig. 2.9 & 2.10) kwam naar voren dat de 'top-down' bemonstering niet optimaal is. De desinfectie verliep niet gelijkmatig. Dat bleek vooral na een of meer korte intervallen volgend op een lang interval; na een kort interval was de biofilmmassa hoger (minder vervallen) dan na het voorafgaande lange of korte interval. Dit impliceert een algeheel mindere toegankelijkheid van 'dieper' liggende slangstukjes, ondanks dezelfde CxT. Overigens bevatte op elk monstertijdstip (monstername in tweevoud), het tweede/onderste slangstukje consequent meer biofilm dan het eerste/bovenste. Het tweede stukje maakt via beide snijvlakken (11% van z'n oppervlak) gedeeltelijk contact met belendende stukjes. Bij 1% contact-oppervlak zijn dat bij aanvang 2×10^7 CFU_Leg&HPC 'moeilijker toegankelijke' bacteriën per stukje. Dit valt (in volgende proeven) enigszins te verhelpen met 'RVS-spacers' tussen de slangstukjes, wat wellicht ook de homogeniteit (t.a.v. de diepere monsters) ten goede komt. Desalniettemin ondervindt de gehele snijvlakpopulatie andere stromings-effecten dan de 'verticale, met de stroming mee'-populatie op de binnen- en buitenkant van de slangstukjes. In een lege kolom (i.d. 2,5 cm) is bij een debiet van 180 L/h de stroomsnelheid (v) 0.1 m/s, gevuld is die snelheid in het gevulde gedeelte (i.d. 0.4 cm kleiner) 0.14 m/s. Gemeten op een 'dwarsdoornede-punt door kolom en slangstukje' zijn minimaal twee

diameters (dan slangstukje gecentreerd), die van het slangstukje zelf (i.d. 1,2 cm) en de afstand tussen glas en slangstukje (0,45 cm), bepalend voor de sterkte van het type stroming, resulterend in Reynolds getallen ($v \cdot d / \nu$) van ~2.000 (binnendoor) en 700 (buitenom) bij 25°C. Het Re getal in het lege gedeelte van de kolom bedraagt 2.900, ternauwerdood in het overgangsgebied tussen laminaire ($Re < 2.300$) en turbulente ($Re > 10.000$) stroming. Voor 'strikt' turbulente stroming zou het water bij deze kolomdiameter met >600 L/h (>0,35 m/s) rondgepompt moeten worden. In ieder geval kan wel een stuk verder in het overgangsgebied 'gedraaid' worden (volgende experimenten bij 360 L/h, i.e. v_{leeg} 0,2 m/s, Re_{leeg} 5.800).

Aangaande de effectiviteit van chloor, resulteerde uit de doseringen met 1,6 ppm en 0,75 ppm residu een $C \times T_{99}$ -waarde (bij benadering, trend tot overnachtmonster) van respectievelijk 1000 en 500, voor beide populaties. Dit aanzienlijke verschil, zwaar in tegenspraak met $C_1 \times T_2 = C_2 \times T_1$ volgens Chick-Watson, lijkt te wijten aan de onnauwkeurige extrapolatie van de data (te weinig informatie tussen 1,5 uur en middernacht) uit de doseerproef met 1,6 ppm chloor.

3 Vergelijking van de invloed van chloor, monochlooramine en chloordioxide op een biofilmin met *Legionella* in het verbeterde dynamische testsysteem

3.1 Inleiding

Voordat wordt overgegaan tot (een advies omtrent) de inzet van een desinfectiemiddel om *Legionella* in een drinkwatersysteem te bestrijden, is het wenselijk een gedegen vergelijking van drinkwater-relevante agentia (de oxidatieve middelen chloor, chloordioxide, monochlooramine, ozon en waterstofperoxide) aangaande hun effectiviteit tegen biofilm-geassocieerde *Legionella* uit te voeren. Kort gezegd is pas van een solide (kwantitatieve) vergelijking sprake als de effectiviteit van elk agens in hetzelfde biofilm-testsysteem en onder dezelfde condities (waterkwaliteit, materiaaltipe, groeifase, temperatuur, flow) is getoetst. Teneinde dit doel te verwezenlijken, is gekozen voor de vijfvoudige (parallel-geschakelde) recirculatie-biofilmmonitor (BMC), om dynamische *Legionella*-biofilm te kweken en om deze relatieve 'worst case' biofilm te behandelen met drie van de bovengenoemde middelen (Cl_2 , ClO_2 en NH_2Cl). Verkregen inzichten kunnen gebruikt worden bij een zich voordoend *Legionella*-probleem of bij het opstellen van protocollen voor periodieke dosering van een desinfectans (waardoor de vorming van 'oude' biofilms geen kans krijgt) aan drinkwaterinstallaties van (openbare) gebouwen (zorginstellingen) of zelfs woningen, indien de aanwezigheid van *Legionella* een mogelijk (terugkerend) risico vormt. Zo'n aanpak maakt geen deel uit van huidig beheersbeleid.

3.2 Experimentele procedure

Voor nadere toelichting aangaande testmateriaal (PVC-P), testsysteem (BMC), desinfectantia, dosering (gedurende 1^{ste} minuut 2x hoger als aangegeven), verwijdering biofilm (ultrasound), bepaling biomassa en verwerking data, wordt verwezen naar 1.2 en 2.2. ClO_2 was ditmaal afkomstig van TwinOxide (als twee-componenten poederkit voor 250-mL porties van 3000 ppm, protocol leverancier). Speciaal op maat van een BMC-kolom (i.d. 2,5 cm) zijn 'RVS-spacers' gemaakt: kruisjes van twee RVS-strookjes (lengte, breedte en dikte resp. 24, 3 en 1 mm).

3.2.1 Protocol voor biofilmkweek in de BMC

De BMC is overeenkomstig onderstaand schema benut voor de gestandaardiseerde kweek van *Legionella*-biofilm op PVC-P. Hiervoor is per kolom het volgende protocol gebruikt:

- Vul de grondig schoongemaakte BMC-kolom met schone PVC-P-slangstukjes afgewisseld met RVS-spacers.
- Doseer (kort) met chloor (10-100 mg/L) en laat uitspoelen. Stel temperatuur in op 37°C, waterinlaat op ~50%, circulatie op >10 (i.e. in bedrijf, als 37°C maar stabiel gehaald wordt).
- Neem watermonster (voor ATP en CFU-bepaling vóór ent).
- Laat kolom halfleeg lopen en inoculeer bovenin met 2 mL *Leg.*⁺-stock (LMB).
- Zet inlaat open (langzaam). STOP als kolom/circuit gevuld is.
- Circuleer kort (pomp aan, level >10) om uniforme menging te verkrijgen.
- Neem watermonster D0 (voor ATP en CFU-bepaling na ent).
- Minimaliseer circulatie (pomplevel 5-10). Let op temperatuur.
- Volgende ochtend (dag 1): neem watermonster D1 (ATP en CFU)
- Ververs deel circuitwater (i.e. inlaat 175 mL open, tap bij afvoerpunt af). Circuleer kort (pomplevel >10), vervolgens terug naar 5-10 (temperatuur!).
- Dag 2: neem watermonster D2 (ATP en CFU).
- Ververs deel circuitwater (i.e. inlaat 175 mL open, tap bij afvoerpunt af). Circuleer kort (pomplevel >10), vervolgens terug naar 5-10 (temperatuur!).
- Dag 3: neem watermonster D3 (ATP en CFU).
- Ververs deel circuitwater (i.e. inlaat 175 mL open, tap bij afvoerpunt af). Circuleer kort (pomplevel >10), vervolgens terug naar 5-10 (temperatuur!).
- Dag 4: bemonster (D4) water en PVC-P (1x).
- Stel inlaat in op 25 mL/min en circulatie (pomp) op level 10.
- Verwijder & suspendeer biofilm van PVC-P met hoge-energie sonicatie (HES): 2 min bij 45% (output 30-40W) op ijs, vervang water, herhaal behandeling 2 keer, pool suspensie. Meet ATP (10⁰ en 10⁻¹) in biofilmsuspensie en waterfase, plaat verdunningen uit in duplo op R2A en BCYE^{+ab}.
- Dag 7: bemonster (D7) water en PVC-P (1x) & analyseer (ATP en CFU).
- Stel inlaat in op 75 mL/min en circulatie op level 12.
- Dag 11: bemonster (D11) water en PVC-P (1x) & analyseer (ATP en CFU).
- Stel inlaat in op 125 mL/min en circulatie op level 14.
- Dag 14: bemonster (D14) water en PVC-P (1x) & analyseer (ATP en CFU).
- Stel inlaat in op 250 mL/min en circulatie op level 18 (=180 L/h).
- Dag 18: bemonster (D18) water en PVC-P (1x) & analyseer (ATP en CFU).
- Laat inlaat op 250 mL/min en stel circulatie op level 28 (360 L/h).
- Dag 21: bemonster (D21) water en PVC-P (1x) & analyseer (ATP en CFU).
- Laat inlaat op 250 mL/min en circulatie op level 28 (360 L/h).
- Dag 22/23: doseer met desinfectiemiddel (bij 25°C).

Schema: benutting van BMC voor kweek en desinfectie.

BMC	Aanenten	desinfectie	middel
1	week X	week X+3	NH ₂ Cl
2	"	"	"
3	week X+1	week X+4	ClO ₂
4	"	"	"
5	leeg van week X tot Z (test-unit)		
1	week Y	week Y+3	
2	"	"	
3			

4	week Z	week Z+3	Cl ₂
5	"	"	Cl ₂

3.2.2 Monochlooramine

Per 100 mL fosfaatbuffer (0,55 g/L K₂HPO₄, pH 8,9-9,2 met loog) werd 0,11 g NH₄Cl opgelost. Al roerende werd hieraan langzaam druppelend 900 µl chloorstock (60 g/L NaOCl, 5% Cl₂) toegevoegd en het roeren werd vervolgens nog 30 min gecontinueerd. Dit resulteerde in een NH₂Cl-oplossing van 450-500 mg/L. Voor concentratiebepalingen werd de spectrofotometrische DPD-chloormethode gebruikt, met kaliumjodide (KI) voor de omzetting van gebonden chloor (NH₂Cl) naar vrij chloor (NEN 6480, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, protocol WB Europort).

3.3 Resultaten

3.3.1 Gestandaardiseerde kweek in de BMC

Drie groeiproeven, elk in tweevoud en bij een vast hydrodynamisch 'verloop' (Fig. 3.1), zijn uitgevoerd. Telkens werden dus twee BMC-units tegelijkertijd opgestart, te weten BMC-1&2, BMC-3&4a en BMC-4b&5 (BMC-4 is twee keer gebruikt in deze experimentenserie). Aanwas in de vorm van ATP, *Legionella* en HPC werd zowel in de waterfase (plankton, vanaf dag 0) als op het PVC-P (biofilm, vanaf dag 4) bijgehouden. 'Gemiddelde' (S.D. n=6) groeicurves (voor waterfase en biofilm) zijn afgebeeld in Fig. 3.2A&B (ATP) en Fig. 3.2C&D (*Legionella* en HPC). De HPC-populatie nam vooral tijdens de (semi-)batchfase sterk toe; de *Legionella*-populatie daarentegen vooral onder dynamische condities. In de biofilm was de HPC-populatie bij hogere flow minder stabiel dan de *Legionella*-populatie. Na vier dagen semi-batchkweek was 30-40% van de totale actieve biomassa (ATP per cm² PVC-P) nog planktonisch, dalend naar ~1% na een week, en naar <0.1% na 2-3 weken. Uitgedrukt in koloniegetal per cm² PVC-P lag die verhouding na vier dagen nog andersom (~2 : 1). In de tweede week bleek de *Legionella*-populatie al >99,9% biofilm-geassocieerd, terwijl de HPC-populatie vanaf dat moment bij ~99% bleef steken.

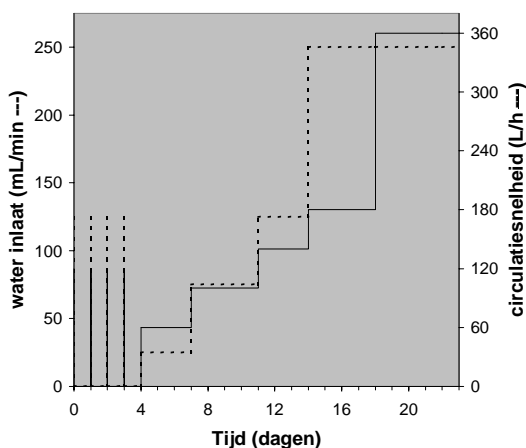


Fig. 3.1. Hydrodynamische instellingen per BMC-unit gedurende een biofilmkweekperiode. Linker y-as: verversingssnelheid (mL/min) van het water in de unit; rechter y-as: stroomnelheid (debiet, L/h) van het water door het circuit.

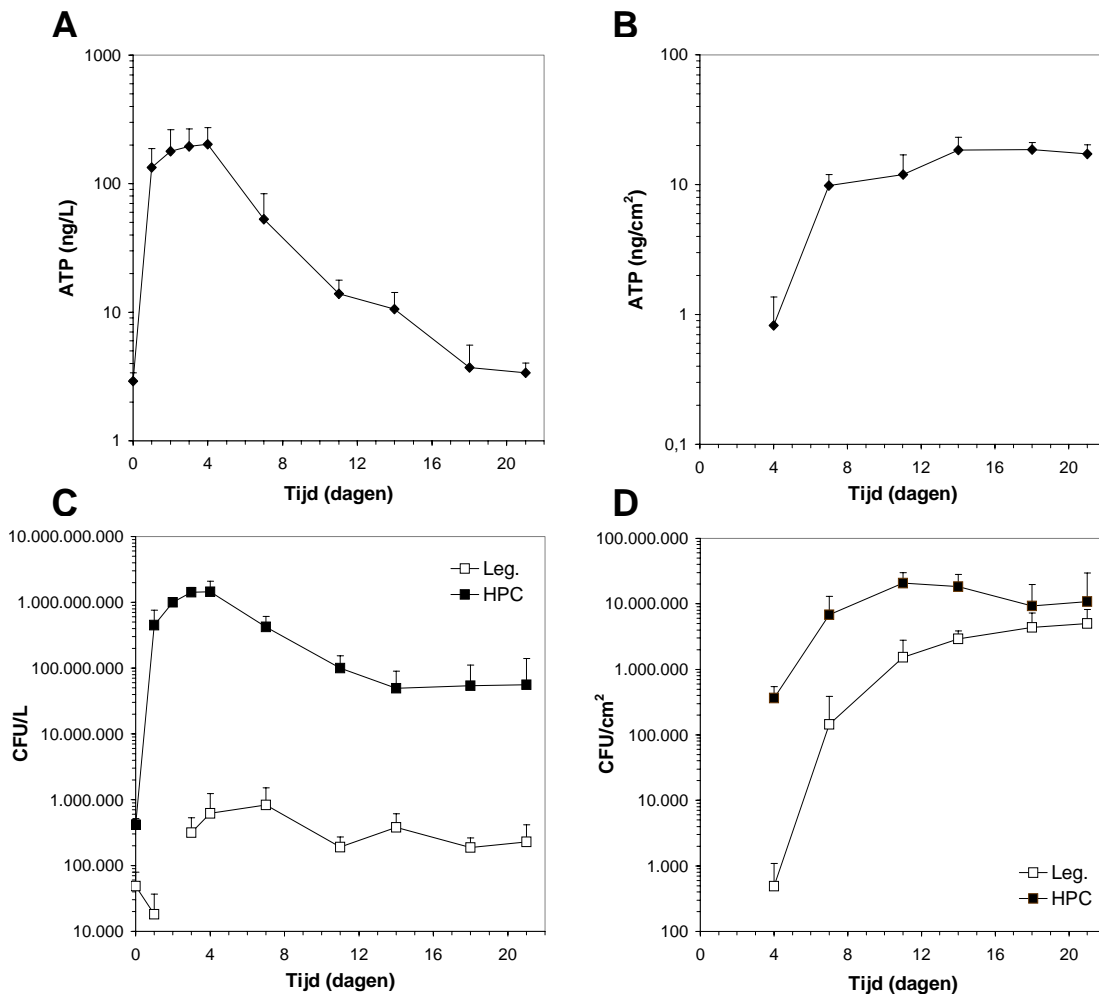


Fig. 3.2. Biomassa accumulatie in de BMC (gemiddelde plus standaarddeviatie $n=6$, i.e. drie groeiproeven à twee units), onder de hydrodynamische condities zoals geschematiseerd in Fig. 3.1 (bij 37°C en pH 7,9-8,1), in de waterfase (A: ATP, C: *Legionella* en HPC) en als biofilm op PVC-P (B: ATP, D: *Legionella* en HPC).

3.3.2 Desinfectie met NH_2Cl

De na drie weken op PVC-P ontwikkelde biofilm in BMC-1 (dag 22) en in BMC-2 (dag 23) werd blootgesteld aan respectievelijk 1,8 ppm en 0,35 ppm monochlooramine (Fig. 3.3A). Deze gemiddelde residu-concentraties (C) kwamen overeen met de gewogen richtingscoëfficiënten, bepaald uit het verband tussen gemeten CxT en T na lineaire regressie. De NH_2Cl -vraag van (verbruik aan) water plus biofilm was nihil (niet afgebeeld). De relatief hoge dosering bleek afgaande op de ATP-data gedurende de eerste uren dermate effectief (Fig. 3.3B), dat na 6 uur besloten werd de dosering te stoppen. Maar die afbraak zette gedurende de tweede helft van de doseerperiode (monsteranalyse volgende dag) niet door; het ATP-gehalte bleek zelfs minder (licht stijgende trend) onderhevig te zijn geweest aan verval. De volgende doseerproeven dienden dus minimaal een overnachtperiode te beslaan. Na een schijnbare *lag*-fase van een uur bleek ook de lage NH_2Cl -concentratie effectieve afdoding te bewerkstelligen, maar nu lag het omslagpunt bij een

hoger ATP-gehalte (Fig. 3.3B). De HPC- en *Legionella*-vervalcurves vertoonden eveneens die afvlakking, duidend op een minder gevoelige subpopulatie (Fig. 3.3C&D). Desalniettemin bewerkstelligde de hoge NH_2Cl dosering een populatieafname van 4-5 log-eenheden binnen vijf uur. In de 'resistente fractie' (vanaf 4 uur) was de ATP/CFU ratio tijdens de hoge dosering opmerkelijk verhoogd. Uit de vervalcurves over beide doseerperiodes resulteerde een $\text{CxT}_{99\%}$ -waarde van 70 voor *Legionella* en van 90 voor HPC. Ook is gedurende de eerste doseeruren de biomassa in de waterfase bij gehouden (Fig. 3.4A&B). Het ATP-niveau vertoonde een kortstondige verhoging (nadrukkelijker en sneller bij hoge dosering), teniet gedaan door uitspoeling en verval. I.t.t. HPC-bacteriën was *Legionella* snel niet meer planktonisch detecteerbaar (doch niet conform CxT).

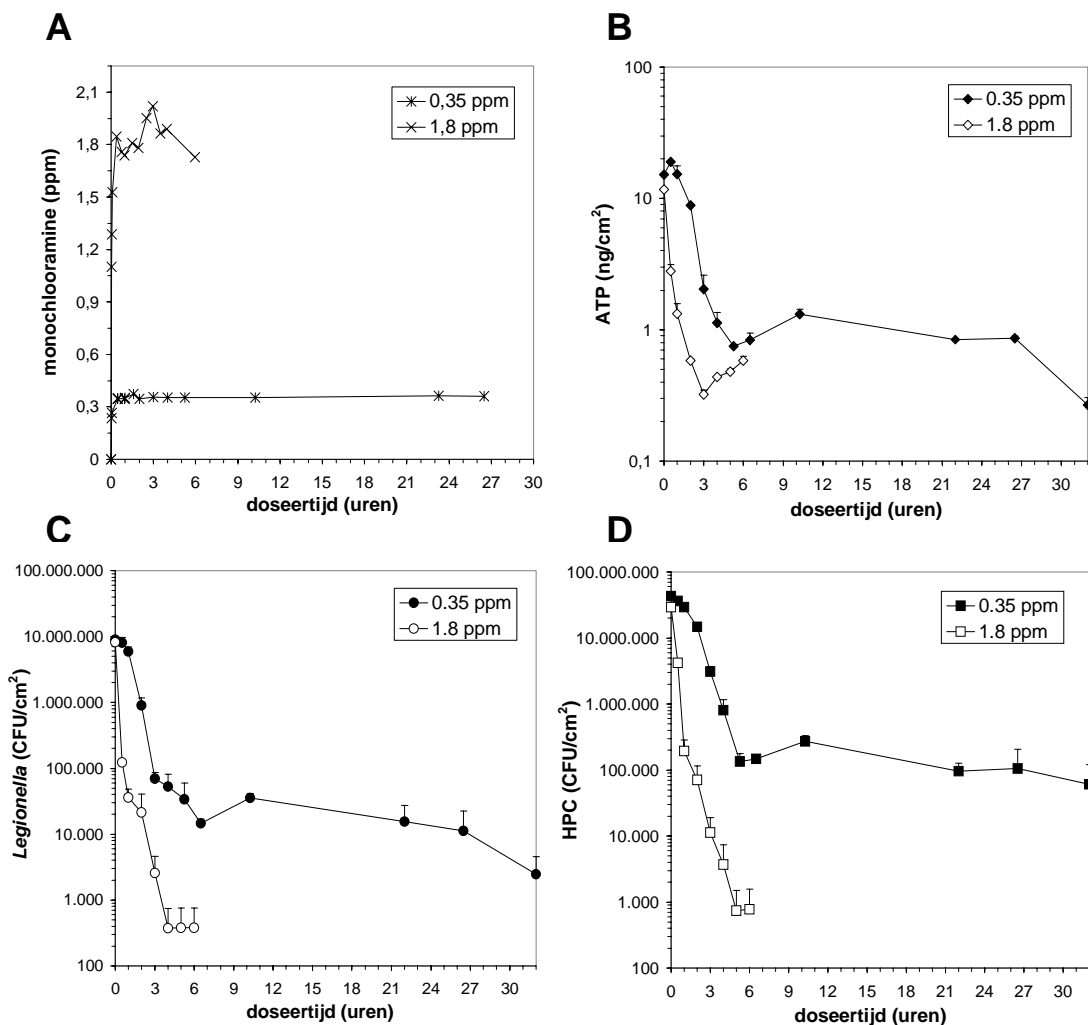


Fig. 3.3. Verval van biofilm op PVC-P in BMC-1&2 (waterverversing 250 mL/min, flow 360 L/h, bij 25°C en pH 7,9-8,1) gedurende behandeling met monochlooramine. **A:** NH_2Cl residu (lage en hoge dosering respectievelijk 0,1 en 0,44 mg/min), **B:** ATP, **C:** *Legionella*, **D:** HPC.

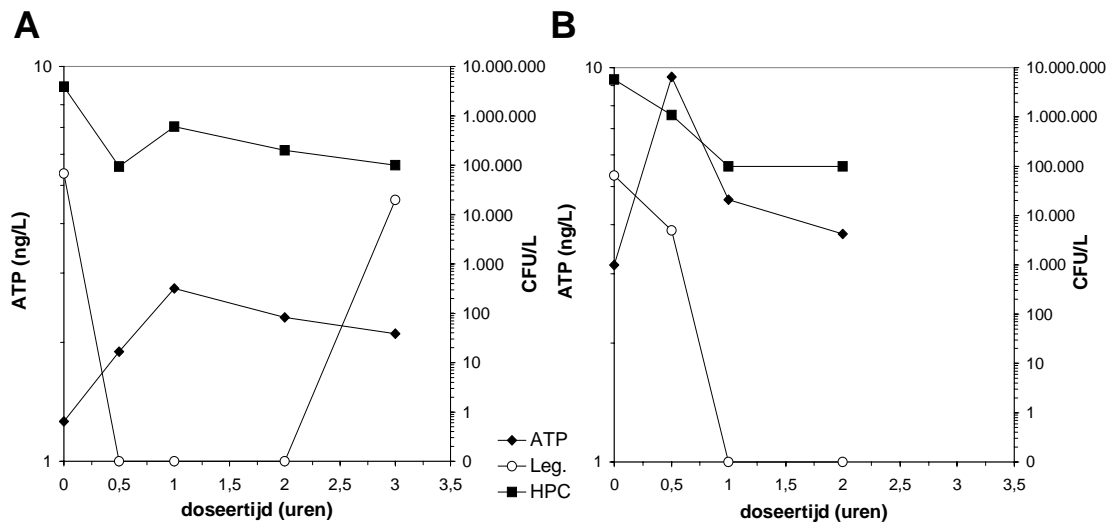


Fig. 3.4. Verval van biomassa in circuitwater van BMC-1&2 (waterverversing 250 mL/min, flow 360 L/h, bij 25°C en pH 7,9-8,1) gedurende behandeling met monochlooramine. **A:** lage dosering (0,1 mg/min), 0,35 ppm residu; **B:** hoge dosering (0,44 mg/min), 1,8 ppm residu. Linker y-as: ATP (ng/L), rechter y-as: *Legionella* & HPC (CFU/L).

3.3.3 Desinfectie met ClO_2

Vervolgens werden de biofilmslangstukjes in BMC-3 (dag 22) en BMC-4a (dag 23) onderworpen aan respectievelijk (relatief) mild en streng ClO_2 -regime (Fig. 3.5A). De 'gewogen' residu-waarden (0,2 en 1,1 ppm) resulteerden weer uit het gemeten $C_{\text{res}} \times T$ verband over de gehele doseerperiodes. Op ATP-niveau was de *lag*-fase bij hoge dosering korter dan bij lage dosering (Fig. 3.5B). Met 1,1 ppm residu was 99% (2 log-eenheden) van de actieve biomassa (i.e. ATP) na 14 uur geëlimineerd; met 0,2 ppm duurde dat $\sim 2,5x$ langer. Op populatieniveau kwam dit overeen met eveneens een 2-log verval van zowel HPC als *Legionella*; meer afdoding werd gedurende beide doseerperiodes niet gehaald (Fig. 3.5C&D). Uitgedrukt in $C_{\text{xT}}_{99\%}$ resulteerde uit beide doseringen een waarde van 400 voor *Legionella*. De effectiviteit tegen HPC was niet eenduidig, i.e. 300 bij lage en 500 bij hoge dosis. Het ATP-niveau in het circuitwater was o.i.v. de hoge (i.t.t. de lage) dosis significant verhoogd (Fig. 3.6A&B). Planktonisch *Legionella* bleek snel geëlimineerd door beide doses ClO_2 (conform C_{xT}). HPC-waterdata waren tegenstrijdig.

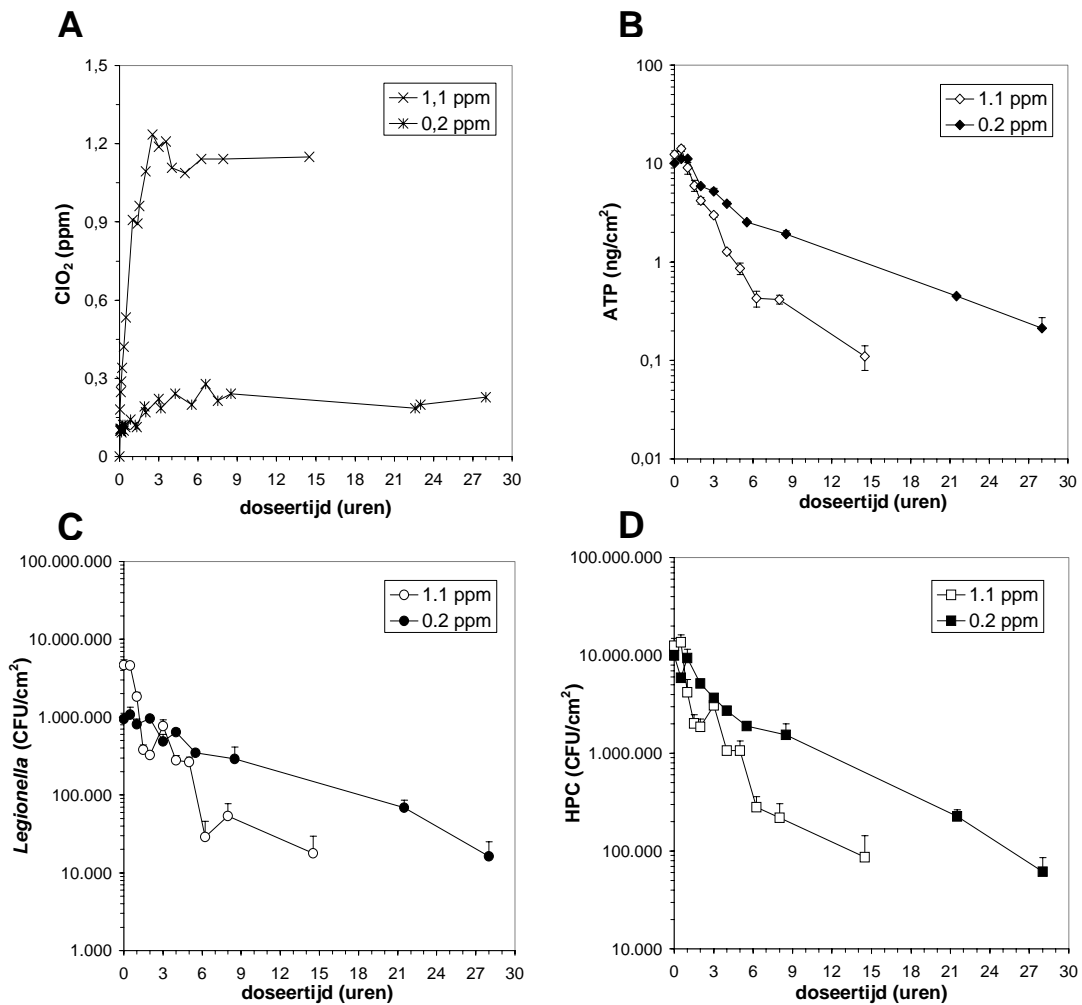


Fig. 3.5. Verval van biofilm op PVC-P in BMC-3&4 (waterverversing 250 mL/min, flow 360 L/h, bij 25°C en pH 7,9-8,1) gedurende behandeling met chloordioxide. **A:** ClO₂ residu (lage en hoge dosering respectievelijk 0,2 en 0,42 mg/min), **B:** ATP, **C:** *Legionella*, **D:** HPC.

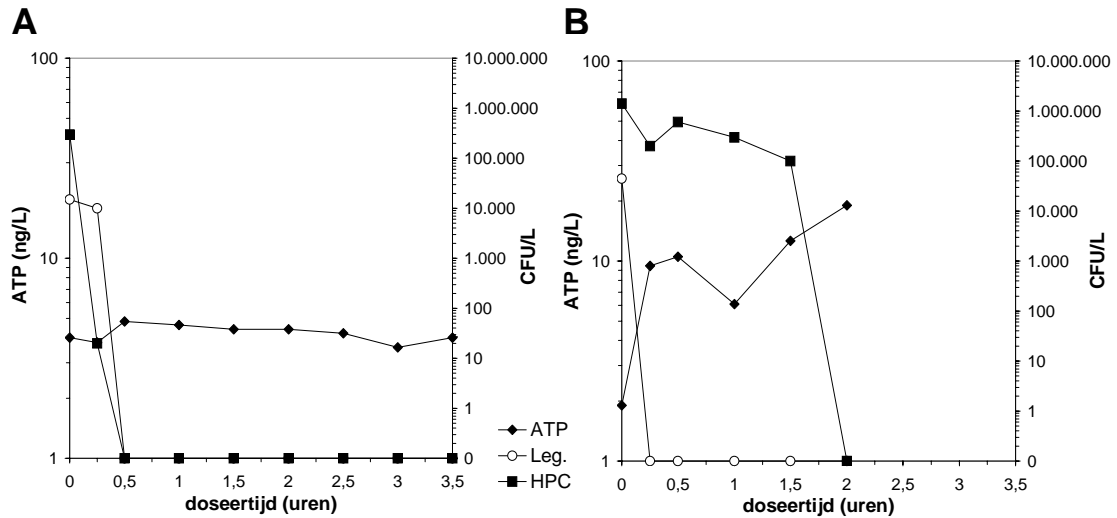


Fig. 3.6. Verval van biomassa in circuitwater van BMC-3&4 (waterversing 250 mL/min, flow 360 L/h, bij 25°C en pH 7,9-8,1) gedurende behandeling met chloordioxide. **A:** lage dosering (0,2 mg/min), 0,2 ppm residu; **B:** hoge dosering (0,43 mg/min), 1,1 ppm residu. Linker y-as: ATP (ng/L), rechter y-as: *Legionella* & HPC (CFU/L).

3.3.4 Desinfectie met Cl_2

De eveneens drie-weken-oude biofilms in BMC-4a (dag 22) en BMC-5 (dag 23) werden blootgesteld aan continue doses (vrij) chloor. De gewogen residuwaarde over de gehele doseerperiode was in BMC-4a (lage dosering) 0,3 ppm en in BMC-5 (hoge dosering) 2 ppm (Fig. 3.7A). De biofilmmassa onderging in beide gevallen een (relatief) effectieve vervalfase "overdag", gevolgd door een ineffektieve periode "overnacht" (Fig. 3.7B-D). Met 2 ppm chloor minimaliseerde overdag de metabolische activiteit (ATP) met 99%, corresponderend met een populatieafname van (ruim) 99,9%. Met 0,3 ppm chloorresidu werd overdag een ATP-reductie van ruim 90% gehaald, wat overeen kwam met een populatieafname van (krap) 99%. Uitgedrukt in $CxT_{99\%}$ resulteerde uit de lage en hoge dosering een waarde van respectievelijk 150 en 200-250 voor zowel *Legionella* als HPC (i.e. niet conform CxT). De hoge dosis chloor veroorzaakte een significant hogere, snellere en scherpere ATP-release in het circuitwater dan de lage dosis (Fig. 3.8A&B). Planktonisch *Legionella* leek snel verdwenen ($CxT \sim 10$). De HPC-waterpopulatie was recalcitranter (data bovendien niet conform CxT).

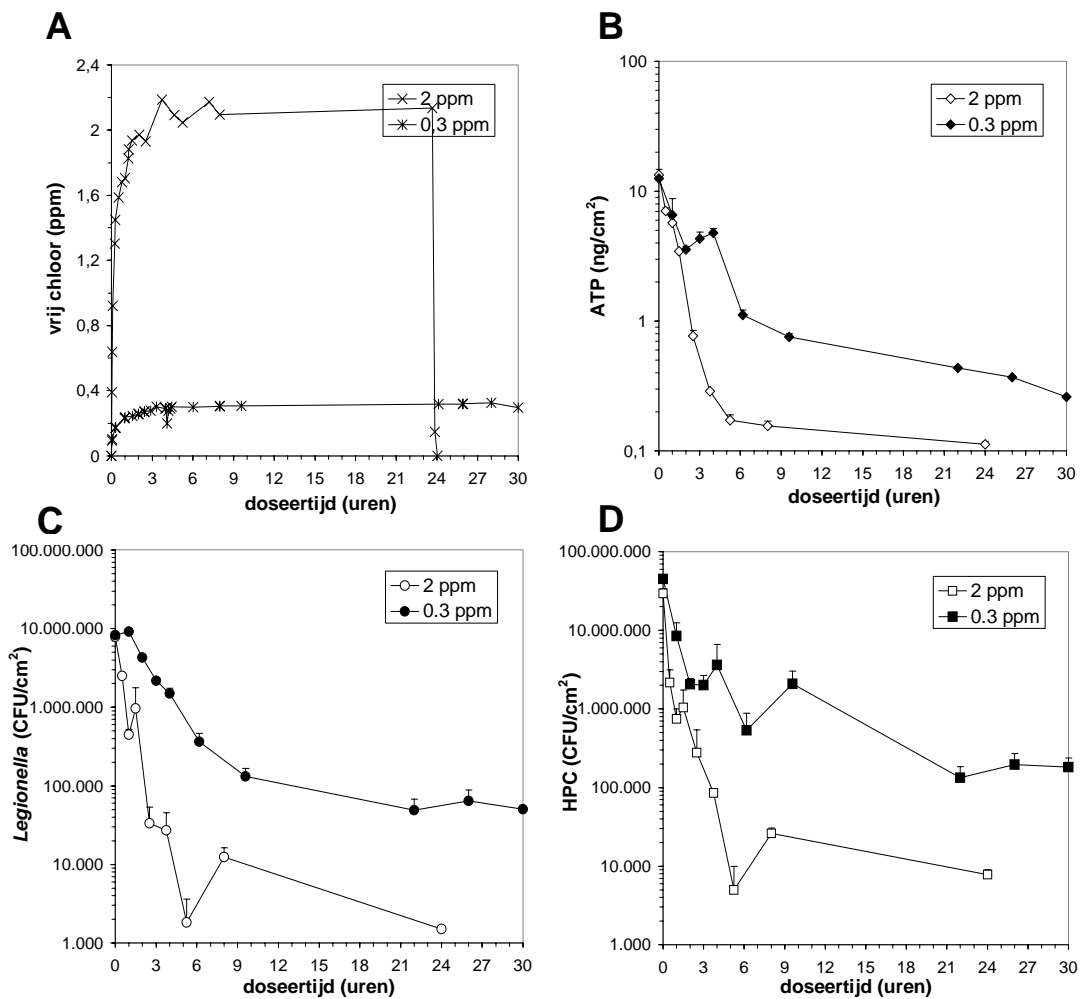


Fig. 3.7. Verval van biofilm op PVC-P in BMC-4a&5 (waterverversing 250 mL/min, flow 360 L/h, bij 25°C en pH 7,9-8,1) gedurende behandeling met chloor. **A:** Cl₂ residu (lage en hoge dosering respectievelijk 0,15 en 0,6 mg/min), **B:** ATP, **C:** Legionella, **D:** HPC.

3.3.5 Verval in ATP vs. verval in CFU

In Fig. 3.9 zijn per desinfectiemiddel (hoog en laag residu) voor elk biofilmmonster de waarden van de ATP- en CFU-bepaling (HPC+Leg.) tegen elkaar uitgezet. Dat voor hoog NH₂Cl de lineaire regressie zo slecht uitpakt is te wijten aan de onbetrouwbaarheid van de CFU-bepalingen vanaf 4 uur doseren.

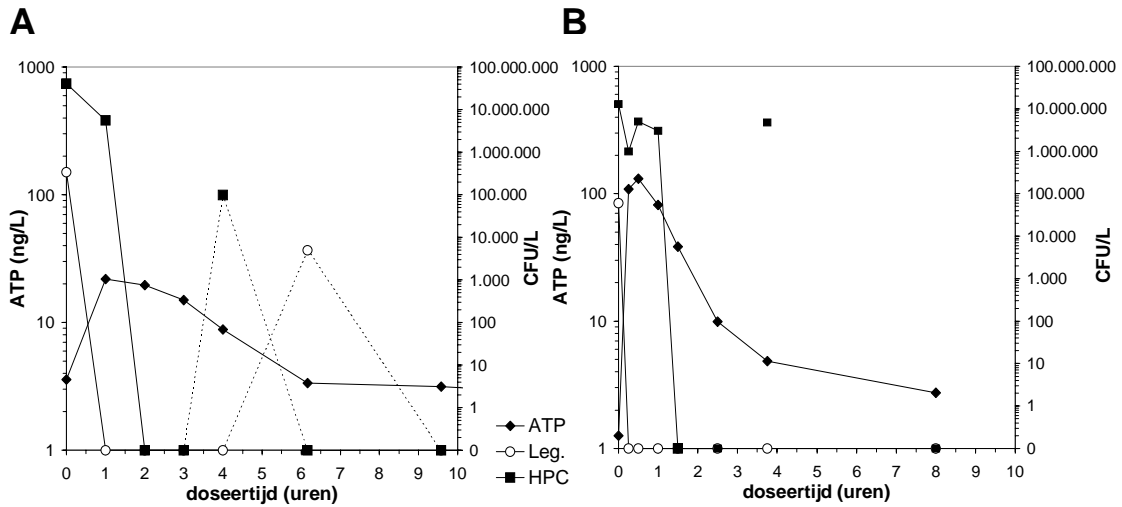


Fig. 3.8. Verval van biomassa in circuitwater van BMC-4a&5 (waterverversing 250 mL/min, flow 360 L/h, bij 25°C en pH 7,9-8,1) gedurende behandeling met chloordioxide. **A:** lage dosering (0,15 mg/min), 0,3 ppm residu; **B:** hoge dosering (0,6 mg/min), 2 ppm residu. Linker y-as: ATP (ng/L), rechter y-as: *Legionella* & HPC (CFU/L).

3.4 Discussie/conclusies

Het hoofddoel van deze laatste experimentenserie was het gestandaardiseerd bepalen van de effectiviteit van drie voor-drinkwater-internationaal-gangbare (oxidatieve) desinfectiemiddelen tegen *Legionella*-biofilms onder dynamische condities. Hiervoor diende de gekozen testopstelling (de BMC) voldoende robuust te zijn wat betreft biofilmkweek en daaropvolgende toetsing van desinfectantia. De kweek van *Legionella*-biofilm per BMC-unit volgens een gestandaardiseerd protocol bleek significant reproduceerbaar (Fig. 3.2). Ondanks het gefaseerd verhogen van de flow werd wel een minder hoog (factor 10) *Legionella*-niveau gehaald dan in hoofdstuk 2. Onder de dynamische instellingen vanaf dag 4 (verdunnings-snelheid > groeisnelheid) bleef het koloniegetal in de waterfase ruim boven die van het 'verse' inlaatwater, duidend op loslaten/slijtage (shearing) van (het los-vaste deel van) de PVC-biofilm. Het kweekproces (Fig. 3.1) kan nog geoptimaliseerd worden, eventueel in de vorm van een verkorting van de batchfase, een extra snelheidstrede (van 270 L/h) tussen 180 en 360 L/h (0,2 m/s) en een langere 'stabilisering' onder de eindinstelling. Bovendien is het interessant om het effect van andere instellingscombinaties (bijv. geringe verversing, hoog debiet) en nog hogere circuitsnelheid (naar strikt turbulente stroming) te onderzoeken.

Zes doseerproeven - voor elk desinfectans een relatief laag en hoog residu - zijn uitgevoerd. Hieruit resulteerde voor de inactivering van de biofilm-populatie op PVC-P de volgende effectiviteitreeks, met tussen haakjes de CxT

waarden voor de eerste twee log-eenheden populatieverval (onder- en bovengrens):

NH_2Cl (70-90) > Cl_2 (150-250) > ClO_2 (300-500)

De effectiviteit van ClO_2 kwam overeen met de waarden gevonden in H1 en 2. Chloor was aanzienlijk effectiever (spacer-effect?!) dan in H 2. *Legionella* leek significant (lichtelijk) gevoeliger voor NH_2Cl dan HPC, voor ClO_2 en Cl_2 was dit niet te beoordelen gezien de grote spreiding. HPC-bacteriën in de waterfase waren overtuigend resistenter dan *Legionella*, hetgeen gold voor alledrie de middelen (effectiviteitreeks ~ $\text{ClO}_2 > \text{Cl}_2 > \text{NH}_2\text{Cl}$, i.e. tegengesteld aan die voor de biofilm). Bij aanvang van de experimenten was reeds een (kwalitatieve) evaluatie met dezelfde middelen in een modelinstallatie met *Legionella*-biofilm bekend (Gao et al., 2000): bij de geteste (hoge) doses bleken ze in dezelfde mate effectief. Dat kwantitatief geanalyseerd (deze studie) NH_2Cl het beter doet dan Cl_2 komt overeen met resultaten van Donlan et al. (2000) met dynamisch-gevormde *Legionella*-biofilm behandeld *in batch*. In recent gepubliceerd onderzoek (Gagnon et al., nov. 2004; *alleen abstract gezien, DV*) met HPC-biofilms in een dynamisch modelsysteem (cilinderreactors à la RotoTorque), blootgesteld aan eveneens een lage en een hoge dosis per middel, scoorde ClO_2 het beste (chloordioxide > chloor > chlooramines)! ClO_2 was ook eerste in rang t.a.v. *Legionella*-biofilms volgens Thomas et al. (2004).

Blootstelling aan chloordioxide leverde in ieder geval het beste "visuele resultaat"; de PVC-biofilmslangstukjes werden aanzienlijk schoner dan via behandeling met chloor en monochlooramine. Dit is te wijten aan het feit dat ClO_2 (i.t.t. Cl_2 en NH_2Cl) ijzer en mangaan (etc.) wegvangt, waardoor de biofilm z'n bruine uiterlijk kwijtraakt. Mogelijk is residueel ClO_2 effectiever wat betreft totale populatie-eliminatie en massaverwijdering (incl. EPS) op langere termijn, door diens 'dispersieve uitwerking' en omdat de tijdens NH_2Cl - en Cl_2 -dosering waargenomen 'resistente' subpopulatie niet leek op te treden.

In de literatuur zijn geen andere studies te achterhalen waarin de effectiviteit van desinfectiemiddelen vergeleken wordt aan de hand van vervalmetingen van ATP- én koloniegetal. Laopaiboon et al. (2002) maten wel naast elkaar ATP en koloniegetal in biofilm blootgesteld aan een quaternair ammonium biocide (DDAC) maar vonden geen lineair verband tussen microbiële activiteit in de vorm van ATP (afname vanaf 40 mg/L DDAC) en koloniegetal (stabiel tot 120 mg/L). De biofilmpopulatie werd dus eerst metabolisch minder actief en pas na een drempelwaarde gevoelig voor verval (DV). In deze studie is wel een significant lineaire correlatie gevonden, doch per desinfectiemiddel met een andere coëfficiënt (Fig. 3.9). In ander woorden, NH_2Cl was wat betreft afdoding per tijdseenheid effectiever dan Cl_2 en ClO_2 , maar de nog resterende populatie behield onder NH_2Cl -regime een hogere ATP-inhoud (bleef actiever). Opvallend was verder de ATP-piek in het circuitwater van de desinfectie-evaluatie met chloor (bij hoog > bij laag residu), welke respectievelijk in mindere mate detecteerbaar en onduidelijk was uit de data met NH_2Cl en (hoog) ClO_2 . Deze ATP-verhoging leek niet te corresponderen met het verloop van het koloniegetal in de waterfase. Mogelijk is het derhalve vrij (door lysis van biofilmbacteriën o.i.v. chloor)

ATP, wat normaliter een hoge turn-over heeft maar in het bijzijn van chloor relatief stabiel is (bijlage II). Aanvankelijk is die release groter dan de uitspoeling (Fig. 3.8).

De residu-concentraties die voor de hierboven geteste middelen volgens wettelijke voorschriften in Nederland in het distributienet/drinkwater zijn toegestaan, zijn ontoereikend om een *Legionella*-biofilmcalamiteit (*worst case*) aan te pakken. Dat is niet verrassend. Toch is het zinvol deze desinfectie-evaluatie ook eens uit te voeren met *Legionella*-biofilm gevormd op (voor drinkwater) goedgekeurd materiaal (i.e. uPVC), om te beoordelen hoe de effectiviteitswaarden zich verhouden. Desondanks lijken problemen zich alleen voor te doen na de watermeter, dus in installaties die goed af te bakenen en tijdelijk buiten gebruik kunnen zijn. De (periodieke) inzet van een effectieve dosis van een desinfectiemiddel als monochlooramine, is dan een optie.

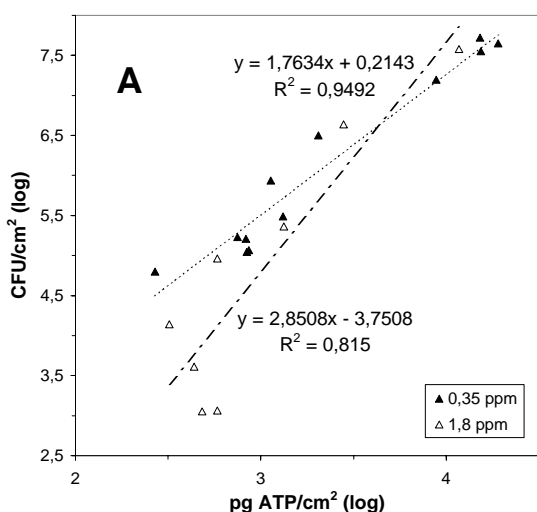
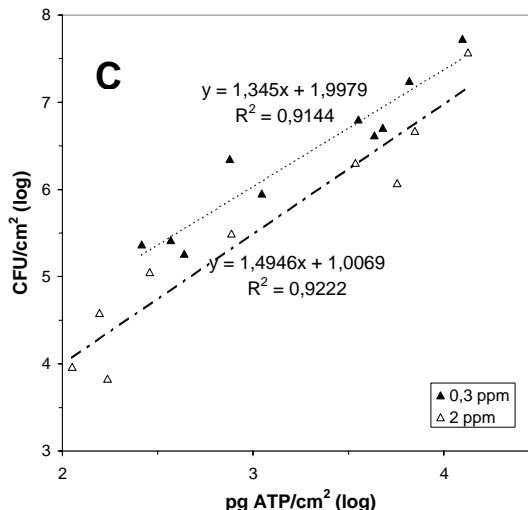
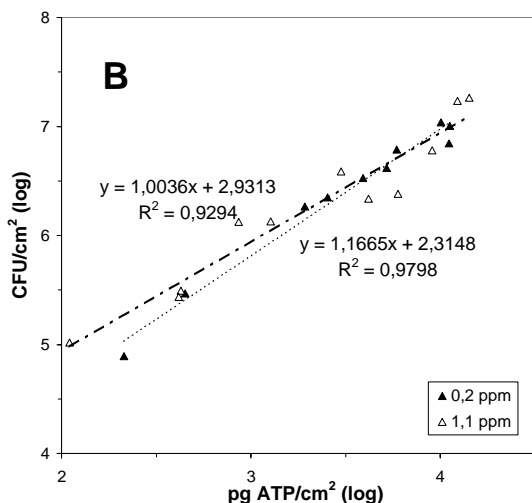


Fig. 3.9. Relatie tussen ATP en CFU (*Leg.* +HPC) in biofilm op PVC-P onder continue dosering met desinfectans. **A:** NH_2Cl , **B:** ClO_2 , **C:** Cl_2 . De onderbroken lijnen representeren de weergegeven lineaire correlaties.



Referenties

Aftring RP, Taylor BF. Assessment of microbial fouling in an ocean thermal energy conversion compartment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979 38: 734-739.

Characklis WG, Trulear MG, Bryers JD, Zveler N. Dynamics of biofilm processes: methods. *Water Res.* 1982 16(7): 1207-1216.

Denyer SP. ATP bioluminescence and biocide assessment: effect of bacteriostatic levels of biocide, p. 189-195. *In* ATP luminescence: rapid methods in microbiology. Blackwell Scientific Publications, London, 1989.

Donlan R, Murga R, Brown E, Carpenter J, Besser R, Fields B. Monochloramine disinfection of biofilm-associated *Legionella pneumophila* in a potable water model system. 5th Int. Conf. on *Legionella*, Ulm 2000 & Ch. in "Legionella", ASM Press, 2002.

Gao Y, McCall EC, Stout JE, Vidic RD, Yu VL. Monochloramine and chlorine dioxide as alternative disinfection methods for *Legionella* control: results of pilot-studies in a model plumbing system. AWWA Annual Meeting. Denver, CO, 2000.

Gagnon GA, O'Leary KC, Volk JC, Chauret C, Stover L, Andrews RC. Comparative analysis of chlorine dioxide, free chlorine and chloramines on bacterial water quality in model distribution systems. *J. Environ. Eng.* 2004 130(11): 1269-1279.

Hoigné J, Bader H. Bestimmung van Ozon und Chlordioxid in Wasser mit der Indigo-methode. *Vom Wasser* 1980 59: 253-267.

Holm-Hansen O, Booth CR. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.* 1966 11: 510-519.

Karl DM. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 1980 44(4): 739-796.

Laopaiboon L, Hall SJ, Smith RN. The effect of a quaternary ammonium biocide on the performance and characteristics of laboratory-scale rotating biological contactors. *J Appl Microbiol.* 2002 93(6): 1051-8

Levin GV, Clendenning JR, Chappelle EW, Heim AH, Rocek E. A rapid method for detection of microorganisms by ATP assay. *BioScience* 1964 14: 37-38

Ludwicka A, Switalski LM, Lundin A, Pulverer G, Wadstrom T. Bioluminescent assay for measurement of bacterial attachment to polyethylene. *J. Microbiol. Meth.* 1985 4: 169-177.

Picciolo GL, Thomas RR, Deming JW, Chappelle EW. Environmental applications of the firefly luciferase ATP assay: flow techniques for monitoring of waste water effluent and of drinking water supplies, p 547-567. In Second BiAnnual ATP Methodology Symposium SAI Technology Co., San Diego, Ca. 1977.

Ridgway HF, Kelly A, Justice C, Olson BH. Microbial fouling of reverse-osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological and ultrastructural analyses. Appl. Environ. Microbiol. 1983 45(3): 1066-1084.

Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Levi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. J Appl Microbiol. 2004 97(5): 950-63.

Van der Kooij D, Veenendaal HR. Assessment of the biofilm formation characteristics of drinking water. Toronto Ontario 1992, Proc. Am. Wat. Wks. Assoc. Wat. Qual. Technol. Conf. 1993, 1099-1110.

Van der Kooij D, Veenendaal HR, Slaats NPG, Vonk D. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* on synthetic pipe materials. 5th Int. Conf. on *Legionella*, Ulm 2000 & Ch. 31 in "*Legionella*", ASM Press, 2002.

Van der Kooij D, Veenendaal HR. Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance. Water Science & Technology: Water Supply 2001;1(3): 39-45.

Van der Kooij D, Albrechtsen HJ, Corfitzen CB, Ashwort J, Parry I, Enkiri F, Hamsch B, Hametner C, Kloiber R, Veenendaal HR, Verhamme DT, Hoekstra EJ. Assessment of the microbial growth support potential of construction products in contact with drinking water (CPDW). EU-Rapport project nr. ? , 2003.

Van der Kooij D, Veenendaal H, Scheffer W. Biofilmvorming en groei van *Legionella* op leidingmaterialen in een experimentele warmtapwater-installatie. H₂O 2003 11: 19-21.

Van Kranen HJ, Van den Burg AC. Het effect van chloordioxide op de microbiologische kwaliteit van drinkwater. RIVM rapport nr. 840135001, 1988.

Verhamme DT. Desinfectie van biofilms in drinkwater - Bestrijding van biofilm-geassocieerde *Legionella* Kiwa intern, 2004.

I (bijlage) ClO₂ susceptibility of biofilm-associated *Legionella* in a batch assay

Brief report April 2003 (© Kiwa N.V.)
part of EU-CRAFT Legionellosis

Client
European Union

Title
ClO₂ susceptibility of biofilm-associated *Legionella* in a batch assay

Project number
304.705.016

Project manager
W. Senden

Quality assurance
D. van der Kooij

Author
D.T. Verhamme

Introduction

The objective of this study was to assess the effectiveness of chlorine dioxide against *Legionella* in a laboratory-scale (batch) biofilm-disinfection procedure. Chlorine dioxide (ClO₂) has a number of advantages over free chlorine, the historically 'primary' oxidising disinfectant in water. One crucial benefit is that ClO₂ behaves largely pH independent, in contrast to chlorine, which is only 20% effective at drinking water pH (pH 8-8.5). Moreover, because of its neutral molecular state and non-chlorinating activity, ClO₂ may be more efficient in biofilm control (i.e. removal and prevention) due to an enhanced penetrating capacity.

Material & Methods

Materials

Pipe material: plasticised soft PVC (PVC-p) tube (inner Ø 12 mm, outer Ø 16 mm);
Chlorine (dioxide)-demand-free glasswork, if necessary;
(Laboratory) tap water: slow sand filtrate without chlorine residual.

'Preparation' and analysis of disinfectants

A ClO_{2(aq)} solution was prepared daily by mixing oxidant (Active Ox) and activator (Active 8) solutions in MilliQ water, as supplied and prescribed by Guldager. The resulting stock (~300 mg/L) was kept in a brown bottle. A Cl₂ stock solution was prepared from 5% sodium hypochlorite (Acros). ClO₂ concentrations higher than 1 mg/L (i.e. diluted stock solutions, until 60 mg/L) were determined by direct spectrophotometric measurement at 360 nm. The DPD spectrophotometric method (-/+ glycine) was initially used to measure Cl₂ and ClO₂ (residuals) in disinfectant

assays, but the analysis of ClO₂ residual based on its quantitative decolourisation (measurable at 600 nm) of indigotrisulphonate (0) became the preferred method. Calibration curves were based on measurements in MilliQ water, using a standard ClO₂ solution.

Biofilm induction and development in stationary batch

Pieces (of uniform size, either ~13 or ~17 cm² each) of PVC-p tube, washed under streaming tap water for one hour, were incubated at 37°C in 2-L Erlenmeyer flasks containing 1.5-L tap water (pH 8.3) in a ratio of 50 mL per piece (i.e. 30 pieces at start), supplied with 7.3 mg/L KNO₃ and 1.85 mg/L KH₂PO₄. A *L. pneumophila*-positive mixed culture (obtained from a plumbing system and maintained in tap water with pieces of natural rubber, stock -80 °C) was used as inoculum. Shaking of flasks (by hand) and monitoring of biofilm and planktonic biomass (see downward) occurred on a regular basis.

Biofilm treatment with disinfectant

Biofilm pieces for one disinfectant assay were collectively rinsed (by shaking twice) in sterile tap water (pH 8.3) in a ratio of 20 mL per piece, to remove/dilute planktonic cells and culture water. They were subsequently transferred to an Erlenmeyer flask wrapped in aluminium cellophane, which contained 20 mL tap water (source: sterile) per piece. The flask was placed on a stirring plate (300 rpm) at room temperature. After time zero sampling, ClO₂ (control w/h) was added (t=0). Samples for biomass analysis, being one piece (transferred to 20 mL sterile tap water) and 10 mL water phase, as well as for instantaneous ClO₂ determination (10 mL water phase) were taken simultaneously after suitable contact times during 30 min. ClO₂ in each 'biomass sample' was neutralised with sodium thiosulphate (0.03%), beforehand present in the collection tubes on ice.

Biofilm removal with ultrasound

Biomass was detached from the PVC-p pieces by high-energy sonication, using a Branson W-250 sonifier with a microtip device. Ultrasonics (setting: 30 W for 1 min) were applied to each single piece in a 50-mL plastic tube (Greiner) with 20-mL tap water (source: sterile) on ice. This treatment was repeated (in replaced tap water), to achieve total biofilm removal.

Biomass parameters

Total amounts of (active) biomass were determined by measurement of ATP concentrations in duplicate, using a standardised enzymatic assay following the procedure as described by the supplier (Lumac). Numbers of heterotrophic bacteria (HPC values) were determined using R₂A medium (50-μL aliquots of appropriate dilution, spread in duplicate) incubated at 25°C for 10 days. *Legionella* numbers (100-μL aliquots, spread in duplicate) were plate-counted on buffered charcoal-yeast extract (BCYE) agar medium (with appropriate antibiotics) after 7 days at 37°C.

Data analysis

The measured (biomass-indicative) ATP concentrations were used to make appropriate dilutions for HPC and *Legionella* plate counts. The counted bacterial colonies were corrected for the (exactly measured) surface area of sample piece on which their existence was established, expressed as colony forming units per square centimeter (CFU/cm²). Total bacterial (HPC/*Legionella*) biofilm release per piece (N) consisted of the outcome of two successive sonication treatments. The survival data, resulting from treatment with ClO₂, were calculated as log₁₀(N_T/N₀), where N_T represents N of a piece after a certain contact time and N₀ the initial N (of a different piece) before addition of ClO₂. ClO₂ efficacy was expressed as C×T values, with C the

corrected (through linear regression/integration analysis of decay curves between 1 and 7.5 min) ClO₂ concentration (mg/L) and T the contact time (min).

Results

Soft PVC (PVC-p) was used as biofilm-promoting material since it yields relatively high biofilm and suspension biomass per surface area, reaching maximum levels after 2-3 weeks (2). The described experiment was performed with a 3-weeks-old biofilm batch-culture, revealing a culturable population (CFU/cm²) of $\sim 3 \times 10^6$ and $\sim 2 \times 10^7$ for HPC-bacteria and $\sim 1 \times 10^5$ and $\sim 4 \times 10^5$ for *Legionella* in respectively the biofilm and the planktonic phase. Fig. 1 shows the bacterial survival on these biofilm pieces in time when treated with ClO₂. Treatment with 0.5 mg/L did not have any effect, but for all higher concentrations tested about 0.5 log reduction had occurred after 1 minute contact time. Further killing of biofilm bacteria appeared to be (highly) efficient for added ClO₂ concentrations higher than 1 mg/L. Accordingly, bacterial reduction (in log units) after a certain contact time (min) could be determined and expressed as C×T numbers. However, the added ClO₂ concentration was far from stable, as depicted in Fig. 2. The concentration-dependent ClO₂ decay was rapid during the first minute, mainly due to reaction with the tap water, followed by a slower turn-over, mainly due to reaction with bacterial and other biofilm components. Via integration of this second phase, 'true' C×T values were obtained. Table 1 shows C×T values for 99% inactivation (i.e. 2 log units reduction).

Table 1. C×T₉₉ values, derived from disinfectant assay as explained in Fig. 1, Fig. 2 and text.

ClO ₂ added (mg/L)	HPC	<i>Legionella</i>
0	n.a.*	n.a.
0.5	n.a.	n.a.
1	n.a.	n.a.
1.5	6.5	3.4
2	5.2	3.1
2.5	6.7	3.6
3	4.1	3.1
Average	5.6±1.2	3.3±0.25

*not assessable

Discussion/Conclusion

Our disinfection approach, in which biofilm removal in tap water is monitored on different pieces of the same material originating from one source, is a convenient batch method to assess disinfectant efficacy. Biofilm growth and exposure *per piece* to ClO₂ were homogeneous regarding the restrictions of a batch assay, biofilm removal by double sonication treatment appeared to be efficient, and plate counts were consistent. These (a.o. 'steady' conditions) are prerequisites in order to compare bacterial inactivation on different pieces with one another. Moreover, we incorporated a reliable method to measure ClO₂ residual, based on decolourisation of indigotrisulphonate (being more rapid and having less interference than the DPD method). Clearly, addition of ClO₂ lower than 1.5 mg/L did not result in any effective residual after 1 minute contact time. The 0.5 log unit killing of bacteria during this first minute, for 1 mg/L and higher ClO₂ added, probably represented the loosely-associated 'outer' population of biofilm cells.

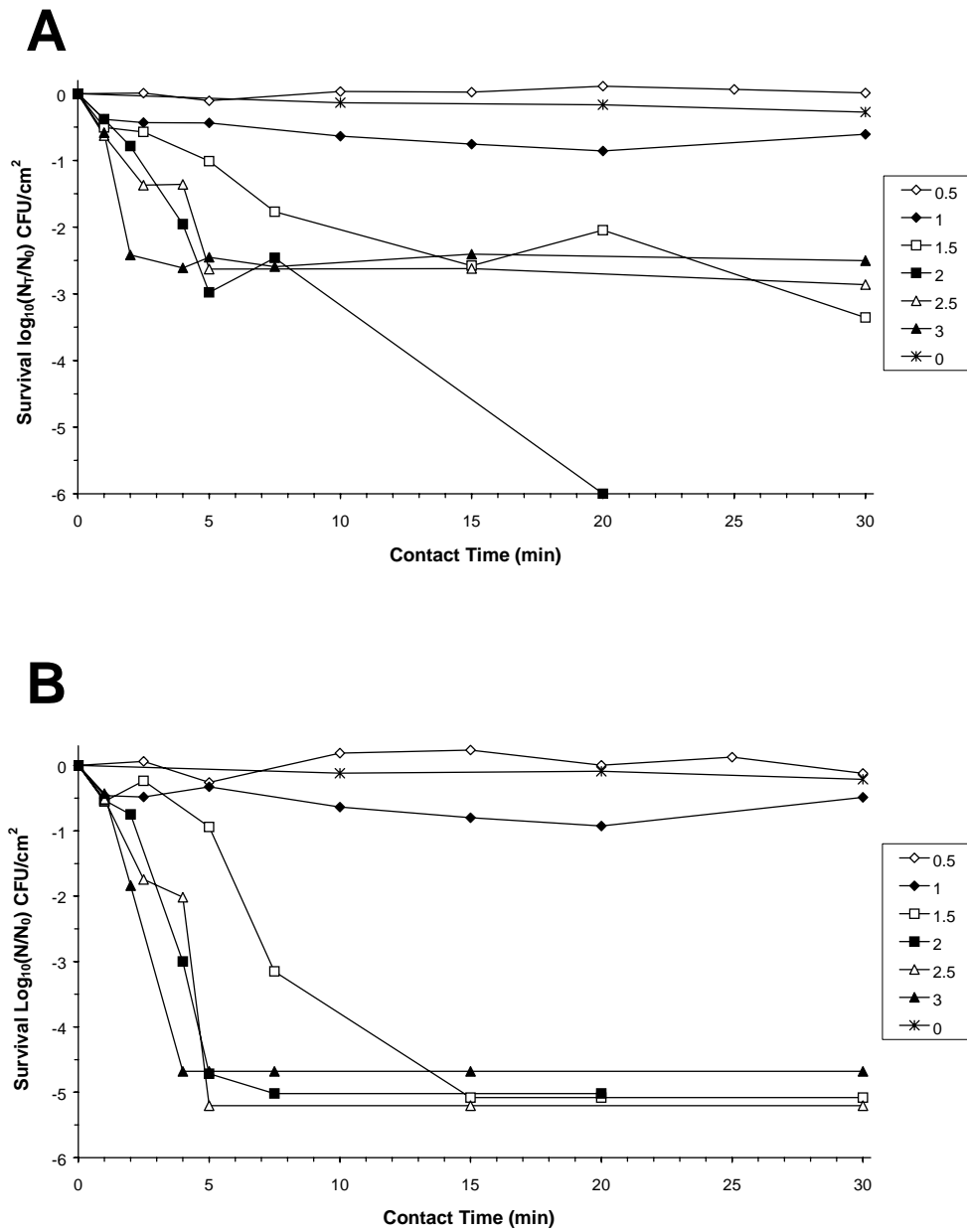


Figure 1. Survival of biofilm-associated bacteria following treatment with ClO_2 in a batch assay. **(A)** HPC; **(B)** Legionella. The inset clarifies the symbols used regarding the amount of ClO_2 added at time zero (mg/L).

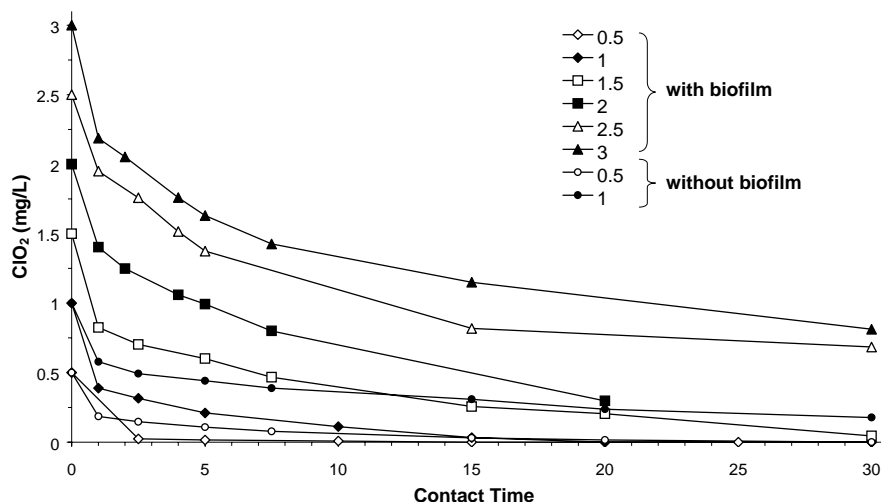


Figure 2. ClO_2 decay in the water phase (source: sterile tap water pH 8.3) during the biofilm disinfection experiment shown in Fig. 1. The inset clarifies the symbols used regarding the amount of ClO_2 added at time zero (mg/L). To compare, ClO_2 turn-over (for 0.5 and 1 mg/L) is also shown in tap water without biofilm pieces.

We demonstrated that ClO_2 is significantly more effective against *Legionella* ($C \times T_{99} \cong 3.3$) than against HPC bacteria ($C \times T_{99} \cong 5.6$) in biofilm. Literature $C \times T_{99}$ values determined in suspension appeared to be 10 times lower without an apparently significant difference between these two groups (3, 4, 5). In theory, based on a uniform exposure of planktonic bacteria to a constant concentration of disinfectant in time, $C \times T$ values of one species should be equal for increasing disinfectant concentrations under (further) identical conditions. Although we corrected for disinfectant decay, mixing within a biofilm environment can never be homogeneous. Nevertheless, we obtained a reproducible $C \times T$ value for *Legionella*. The variance in $C \times T$ values for heterotrophic bacteria may be explained by the diversity within this group, of which participants live either surface-exposed or deeper in the biofilm or more strongly attached to the material. Moreover, they existed in a higher number ($\sim 30x$) in the biofilm than *Legionella*. It is currently unclear whether total elimination of biofilm-associated HPC bacteria (in contrast to *Legionella*) could be achieved by adding 2-3 mg/L ClO_2 (see Fig. 1; data not shown).

Next, the $C \times T$ values obtained with this batch method will be evaluated in a continuous system.

References

1. Hoigné, J. and Bader, H. (1980) Bestimmung van Ozon und Chlordioxid in Wasser mit der Indigo-methode. *Vom Wasser* **59**, 253-267.
2. Van der Kooij, D. and Veenendaal, H.R. (2001) Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance. *Wat. Sci. Tech.: Water Supply* **1**(3), 39-45.
3. Van Kranen, H.J. and Van den Burg, A.C. (1988) Het effect van chloordioxide op de microbiologische kwaliteit van drinkwater. RIVM report nr. 840135001.
4. LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D and Lee, R.G. (1988) Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(10), 2492-2499.
5. Walker, J.T. and Morales, M. (1997) Evaluation of chlorine dioxide (ClO_2) for the control of biofilms. *Wat. Sci. Tech.* **35**(11-12), 319-323.

II (bijlage) “Celvrij” ATP in de waterfase tijdens blootstelling van biofilm aan chloor

Legionella-biofilm gevormd op PVP-P in batch (Erlenmeyer) werd gedurende 30 min behandeld met chloor of chloordioxide. De aangegeven concentraties werden toegevoegd op t=0 aan een Greinerbuis met 20 mL steriel leidingwater waarin één gewassen biofilmslangstukje. Op aangegeven tijdstippen werd een watermonster genomen, wat werd gequenched met thiosulfaat. Na 30 min werd het slangstukje overgebracht naar een buis met 20 mL steriel leidingwater (+thio), waarna een HES-behandeling volgde om de resterende biofilm te verwijderen. **(A)** vrij ATP (bepaald zonder NRB in de assay) in de waterfase, na 2,5 min hoog Cl₂ en ClO₂ was het water ‘bacterievrij’ (niet afgebeeld); **(B)** totaal ATP na 30 min: biofilm-geassocieerd plus vrij ATP in de waterfase.

