

BTO 2020.009 | Januari 2020

BTO rapport

Natuurlijke virussen om de verwijdering
van virussen door zuiveringsprocessen te
bepalen

Natuurlijke virussen om de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen te bepalen

BTO 2020.009 | Januari 2020

Opdrachtnummer

402045/037

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Bedrijfsonderzoek

Auteur(s)

Luc Hornstra

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

12 maanden na publicatie is het openbaar.

Keywords

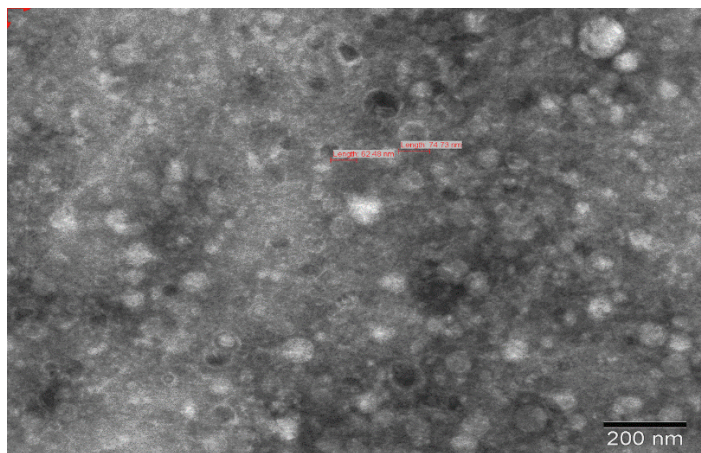
Natuurlijke virussen, waterbehandeling, PCR, drinkwater, membraan, filtratie

BTO Managementsamenvatting

Natuurlijke virussen inzetten bij de bewaking van zuiveringsprocessen

Auteur(s) Luc Hornstra

Ziekteverwekkende virussen zijn een belangrijke microbiologische bedreiging bij de productie van drinkwater. Vaststellen hoe goed de zuivering(sstappen) dergelijke virussen verwijderen is daarom cruciaal. Op dit moment is het niet mogelijk om routinematig de verwijdering van ziekteverwekkende virussen in een full scale drinkwaterzuivering vast te stellen, omdat de ziekteverwekkende virussen in te lage concentraties voorkomen in het ruwe water. Natuurlijke virussen komen echter in zeer hoge concentraties voor in oppervlaktewater. Met deze natuurlijke virussen bleek het mogelijk om de virusverwijdering te bepalen van de totale zuiveringstrein op twee locaties die drinkwater maken uit oppervlaktewater, en twee die oeverfiltraat verwerken. Met de natuurlijke virussen is ook de virusverwijdering van de verschillende processtappen in kaart gebracht. Deze studie laat zien dat met natuurlijke virussen een full scale zuivering snel en routinematig kan worden doorgemeten op de verwijdering van virussen door fysische processen. Daarmee wordt de microbiologische veiligheid van drinkwater veel beter aantoonbaar.



Een elektronenmicroscop-foto van een watermonster na concentreren, met daarin een grote variëteit aan natuurlijke virussen

Belang: doorbraak van pathogene virussen beperken

Virussen zijn in lage aantallen infectieus, en aanwezigheid van ziekteverwekkende virussen in drinkwater is een gezondheidsrisico voor de consument. Daarom is het belangrijk dat waterbehandelingsprocessen ziekteverwekkende virussen afdoende verwijderen. Het is echter niet mogelijk om in een productielocatie metingen te doen aan de verwijdering van daadwerkelijke ziekteverwekkende virussen, omdat die in te lage

concentraties voorkomen in het ruwe water. Daarom is er behoefte aan een goede methode om de verwijdering van ziekteverwekkende virussen betrouwbaar in te schatten. Ruw water bevat ruime hoeveelheden natuurlijke virussen. Mogelijk kunnen sommige van deze natuurlijke virussen dienen als procesmarker voor de verwijdering van ziekteverwekkende virussen.

Aanpak: natuurlijke virussen als procesmarker

Bij vier drinkwaterproductielocaties zijn een aantal natuurlijke virussen gemeten in het ruwe ingaande water, na elke zuiveringsstap en in het uitgaande water. Hierbij is de Q-PCR methode gebruikt die op basis van het DNA van de gekozen natuurlijke virussen de aantallen van deze virussen in het water kan vaststellen.

Resultaten: natuurlijke virussen kwantificeren de virusverwijdering door processtappen

Drie van de geteste natuurlijke virussen bleken in zeer hoge concentratie voor te komen in al het ruwe water, en hun concentratie nam af na de verschillende processtappen.

Bij de productielocaties die oppervlaktewater gebruiken voor de productie van drinkwater namen de gemeten virussen in aantallen af door coagulatie sedimentatie, door Langzame Zand Filtratie (LZF) en drielaagsfiltratie, en door Ultrafiltratie (UF). De UF liet de meest consistente verwijdering zien, tussen de 3 en 4 logeenheden.

Bij de productielocaties die oeverfilteraat gebruiken zijn de aantallen natuurlijke virussen na bodempassage gedaald tot onder de detectiegrens, wat betekent dat deze stap de virussen zeer effectief verwijderd.

Deze natuurlijke virussen geven hiermee een precies beeld van de verwijdering van deze virussen door de afzonderlijke zuiveringsprocessen. Natuurlijke virussen maken het voor het eerst mogelijk om snel en routinematig de verwijdering van virussen door de afzonderlijke fysische zuiveringsprocessen vast te stellen. Hiermee kan de verwijderingscapaciteit van ziekteverwekkende virussen door

zuiveringsprocessen in de toekomst veel beter worden gewaarborgd.

Toepassing: betere kwaliteitsbewaking en minder kans op infectie door ziekteverwekkende virussen

Door te meten hoeveel natuurlijke virussen in verschillende stadia van de behandeling aanwezig zijn, kan op drinkwaterproductielocaties routinematig de fysische virusverwijdering per processtap worden bepaald. Daarmee kan de verwijderingscapaciteit van een proces veel beter worden gemonitord en kunnen afwijkingen worden gevonden, die eerder niet werden opgemerkt. Ook kan, door geregeld natuurlijke virussen te meten, de virusverwijdering worden geoptimaliseerd of aangepast aan specifieke omstandigheden. Daarnaast kan met deze methode ook de integriteit van ultrafiltratie, omgekeerde osmose en oeverfiltratieprocessen nauwkeurig en routinematig worden bepaald en waar nodig bijgestuurd.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Natuurlijke virussen om de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen te bepalen* (BTO 2020.009). Een toepassing van natuurlijke virussen is ook beschreven in: *Monitoring the integrity of reverse osmosis membranes using novel indigenous freshwater viruses and bacteriophages*. (Hornstra et al, Environ. Sci.: Water Res. Technol. 2019)

Jaar van publicatie
2020

Meer informatie
Dr Luc Hornstra
T 030-6069628
E luc.hornstra@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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



Januari 2020 ©

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevens bestand, 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.

Inhoud

Contents

<i>BTO Managementsamenvatting</i>	1
-----------------------------------	----------

Inhoud2

1	Introductie	4
1.1	Virusverwijdering tijdens drinkwaterbehandelingsprocessen	4
1.1.1	Huidige metingen voor oppervlaktewaterzuiveringen	4
1.2	Virusindicatoren, de huidige stand van zaken	4
1.2.1	Colifagen	5
1.2.2	Pepper Mild Mottle Virus	6
1.2.3	CrAssphage	8
1.2.4	Natuurlijke virussen	8
2	Material en methoden	10
2.1	Locaties	10
2.2	Opwerking en Q-PCR	14
3	Resultaten	14
3.1	Het voorkomen van natuurlijke virussen in oppervlaktewater	14
3.2	Het voorkomen van natuurlijke virussen na zuiveringsprocessen	16
3.2.1	Drinkwaterproductielocatie De Punt (WbG)	16
3.2.2	Drinkwaterproductielocatie de Gavers, (de Watergroep)	17
3.2.3	Drinkwaterproductielocatie Heel (WML)	20
3.2.4	Drinkwaterproductielocatie de Steeg (Oasen)	21
4	Discussie	23
4.1	Het meten van zuiveringsprocessen met natuurlijke virussen	23
4.2	Viruseigenschappen en de relatie met humane ziekteverwekkende virussen	24
4.3	Gebruik van virusmarkers bij oxidatieve processen	25
5	Conclusies en aanbevelingen	26
5.1	Conclusies	26
5.2	Aanbevelingen	26
6	Literatuur	28

1 Introductie

1.1 Virusverwijdering tijdens drinkwaterbehandelingsprocessen

Bronnen voor drinkwater kunnen micro-organismen bevatten die een bedreiging kunnen vormen voor de volksgezondheid. Micro-organismen behorende tot de protozoa, bacteriën, virussen of schimmels kunnen aanwezig zijn in dit water, en zullen om het water geschikt te maken voor drinkwater, eerst moeten worden verwijderd of geïnactiveerd. De hoeveelheid ziekteverwekkende micro-organismen in het ruwe water hangt af van uit welk water het drinkwater wordt geproduceerd, en over het algemeen bevat oppervlaktewater meer ziekteverwekkende micro-organismen dan grondwater. Van veel ziekteverwekkers is grofweg bekend in welk concentratiegebied deze kunnen voorkomen in het oppervlaktewater (Referentie document AMVD, KWR). Ook is van de processen in de zuivering bekend hoeveel ze van de verschillende typen micro-organismen verwijderen of inactiveren. Door de DEC (decimale eliminatie capaciteit) van de processen bij elkaar op te tellen kan de verwijdering van de zuivering worden bepaald. In combinatie met de kennis over de hoeveelheid micro-organismen in de grondstof, kan dan worden berekend of het geproduceerde drinkwater voldoet aan de wettelijk grenswaarde voor het infectierisico van 1 infectie per 10000 personen per jaar.

1.1.1 Huidige metingen voor oppervlaktewaterzuiveringen

De kwaliteit van het drinkwater wordt gewaarborgd door de AMVD (Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater). Metingen worden uitgevoerd in het ruwe water, en na zuiveringsprocessen. Omdat de ziekteverwekkers in het ruwe water meestal niet in een voldoende hoge concentratie aanwezig zijn, kunnen deze na zuiveringsprocessen niet gemakkelijk worden gemeten en worden hiervoor indicatororganismen gebruikt. Dit zijn micro-organismen die in relatief hoge concentratie aanwezig zijn, en gemakkelijker kunnen worden bepaald dan de pathogene micro-organismen. Indicatororganismen zijn SSRC (Sporen van Sulfiet Reducerende Clostridia) voor protozoa, *E. coli* en enterococci voor bacteriën, en colifagen voor virussen. In het richtsnoer AMVD worden ziekteverwekkende virussen niet frequent gemeten (Werkgroep Infectierisico, 2019). Drinkwaterbedrijven moeten voor de AMVD eens in de 4 jaar een analyse uitvoeren op enterovirussen om een beeld te krijgen van de concentratie in het ruwe water. Als indicator voor de verwijdering van virussen worden colifagen gebruikt, en de verwijdering wordt bepaald door voor en na drinkwaterzuiveringsprocessen de aantallen te meten. Omdat colifagen ook niet in heel hoge aantallen voorkomen in het ruwe water, zijn de aantallen na een waterbehandelingsstap, (ondanks concentreringsstappen zoals hemoflow) vaak erg laag of onder de detectiegrens. Dit heeft tot gevolg dat er geen correcte logverwijdering kan worden vastgesteld. De maximale logverwijdering wordt gelimiteerd doordat de colifagen na de waterbehandelingsstap onder de detectiegrens komen, waardoor de echte logverwijdering groter kan zijn dan kan worden bepaald met de colifagen. Om deze redenen zijn de mogelijkheden om de virusverwijdering in een full scale zuivering te bepalen erg beperkt. In deze rapportage beschrijven we het gebruik van natuurlijk in het oppervlaktewater aanwezige virussen, die, omdat ze in een enorm hoge concentratie voorkomen in het oppervlaktewater, kunnen worden gebruikt om de virusverwijdering te bepalen van waterbehandelingsstappen in een full scale drinkwaterproductielocatie met een groot logbereik en zonder grootschalige concentreringsstappen.

1.2 Virusindicatoren, de huidige stand van zaken

Traditioneel worden colifagen gebruikt om virusverwijdering door zuiveringsprocessen te monitoren. Hoewel deze beperkingen hebben, die vooral te maken hebben met het aantal colifagen in oppervlaktewater, en de daaruit volgende beperking om een groot logbereik te meten, is het de meest gebruikte (en in de literatuur beschreven)

virusindicator. Echter, de laatste jaren worden ook alternatieve mogelijkheden in de literatuur beschreven. De colifagen en nieuwe alternatieven zullen hieronder kort worden besproken.

1.2.1 Colifagen

Het direct meten van ziekteverwekkende virussen in water dat wordt gebruikt voor de productie van drinkwater is routinematig niet mogelijk. Daarom worden alternatieve benaderingen toegepast. Het meest bekend, en het meest gebruikt tot nu toe zijn colifagen, dat zijn bacteriofagen die *E. coli* kunnen infecteren, en daarmee ook een fecale herkomst kunnen hebben. Colifagen zijn meestal aanwezig in oppervlaktewater en zijn onschadelijk voor mensen. Colifagen worden gebruikt als indicator voor de verwijdering van virussen door waterbehandelingsprocessen. Detectie van deze bacteriofagen wordt gedaan door ze te tellen op een dubbel layer agarplaat, waar de bacteriofagen zichtbaar zijn middels pve (plaquevormende eenheden) op de plaat. Deze methode bepaald de virussen die infectieus zijn, en omdat het een routine analyse is in veel waterlaboratoria, is de analyse goedkoop uit te voeren. Omdat er een kweekstap moet worden uitgevoerd, is de analysetijd meer dan een dag.

De grootste beperking van het gebruik van colifagen is dat ze niet in heel hoge aantallen voorkomen in het ruwe water. Dat limiteert de mogelijkheid om een full scale zuivering door te meten op de verwijdering van virussen door de verschillende zuiveringsstappen. Tabel 1.1 geeft een beeld van de concentraties in verschillende typen oppervlaktewater.

Table 1. Number of bacteriophages (PFU / 100mL) in surface water. * Average per site.

Samples	Methods	Number of Samples	Geographical Location	Somatic Coliphages (% +)	F-Specific (% +)	RNA F-Specific (% +)	Reference
River water	ISO	392	Spain, France, Colombia, Argentina	6.2×10^3 (?)		5×10^2 (?)	[94]
Freshwater reservoir	USEPA	65	Singapore	2.2×10^2 (98)	1.1×10^2 (98)		[23]
Sea water	ISO	806 for somatic and 427 for RNA F-specific phages	Spain	32.8 (72.6)		8 (25.5)	[122]
Fresh and sea water	ISO	139	9 European countries, 13 sampling sites	1.7×10^2 (92)		12 (50)	[71]
Fresh and sea water	USEPA	12	California	$2.0-3.3 \times 10^2$ (100)	$<0.02-30$ (25)		[123]
River water	USEPA	120	California	$6.0-10^3$ (?)	$5.0-1.1 \times 10^2$ (?)		[124]
River water	ISO	96	France	1.7×10^3 (100)	2.0×10^2 (92)		[125]
Sea water	ISO	20	Spain	$<10-1.2 \times 10^4$ (95)		0-84 (15)	[104]
River water	ISO	75 (10 sites)	The Netherlands	$*8.8-4.3 \times 10^2$ (100)	$0.04-93.6$ (?)		[78]
Sea water	USEPA	436	California	$3.1-4.9$ (median)	0.3 (median)		[126]

Table 2. Bacteriophages in groundwater (% of positive samples).

Sampling site	Method	Number of Samples	Geographical Location	Somatic Coliphages	F-Specific Phages	RNA F-Specific Phages	Reference
Wells of varied characteristics	USEPA	160	Canada	8.7	1.8		[127]
Variety of wells and springs	ISO	197	Argentina, Colombia, France, Spain	41.7		28.8	[128]
Variety of wells	USEPA	39	Korea	12.5	7.5		[129]
Wells and springs	ISO	125	Spain	53.6		36.0	[130]
Variety of wells	F+ ISO, somatic coliphages C3000	444	USA	10.8	9.5		[131]

Tabel 1.1. Aantallen colifagen in verschillende typen water (uit: Joffre et al, 2016).

Over het algemeen is het aantal somatische colifagen hoger dan het aantal f-specifieke colifagen. Bijna altijd blijft het aantal somatische colifagen echter onder 1×10^4 pve/l. Dat betekent dat voor het aantonen van colifagen na waterbehandelingsprocedures grote volumes moeten worden onderzocht, en dus water moet worden geconcentreerd. Deze stappen kosten veel tijd en geld, en daarom worden colifaagbepalingen in combinatie met een concentratiestap niet routinematig toegepast.

1.2.2 Pepper Mild Mottle Virus

In de zoektocht naar een betere virusindicator wordt sinds 2011 ook onderzoek gedaan naar het Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV). Dit is een plantpathogeen virus van peper/paprika gewassen, maar dit virus blijkt ook in zeer hoge concentraties voor te komen in menselijke feces, en relatief weinig in feces van dierlijke herkomst. Daarmee is het tevens een merker voor fecale besmetting, en vanwege de hoge concentratie in oppervlaktewater kan het wellicht ook een goede procesindicator zijn. Het virus zelf is ongeveer 312 nm groot, (de meeste virussen zijn tussen de 20 en 300nm, dus het PMMoV is een erg groot virus) staafvormig en heeft een enkelstrengs RNA genoom van 6,4 kB. Detectie van dit virus in watermonsters gaat middels een moleculair biologische test. Omdat het genoom een RNA molecuul is, moet voor detectie eerst cDNA worden gemaakt met het enzym reverse transcriptase, waarna het virus kan worden aangetoond door middel van qPCR.

PMMoV wordt frequent gevonden in verschillende waterbronnen in relatief hoge concentraties tot ruwweg 10^6 genkopieën (gc)/l, en laat weinig seizoensvariatie zien (Figuur 1.1) (Haramoto et al, 2013). Verder laten studies zien dat het virus relatief stabiel is, en dus lang in het water aanwezig/detecteerbaar blijft. In een aantal studies is het PMMoV al ingezet als procesindicator om virusverwijdering door waterbehandelingsprocessen van verschillende drinkwaterproductielocaties te meten. Tevens is dit virus al toegepast om membraanprocessen te evalueren. Het gebruik van PMMoV is recent gereviewed (Kitajima et al, 2018). In tabel 1.2 zijn de PMMoV-concentraties weergegeven in een aantal verschillende typen water in gc/l.

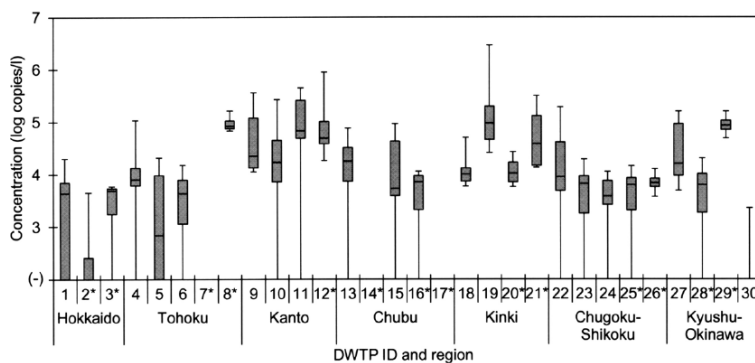


FIG 1 Concentration of PMMoV in source water samples at 30 DWTPs in Japan. Lines within the boxes represent median values; the upper and lower lines of the boxes represent 25th and 75th percentiles, respectively, and the upper and lower bars outside the boxes represent the maximum and minimum values, respectively. Source water samples were collected 4 and 8 times from each DWTP, indicated with and without an asterisk, respectively.

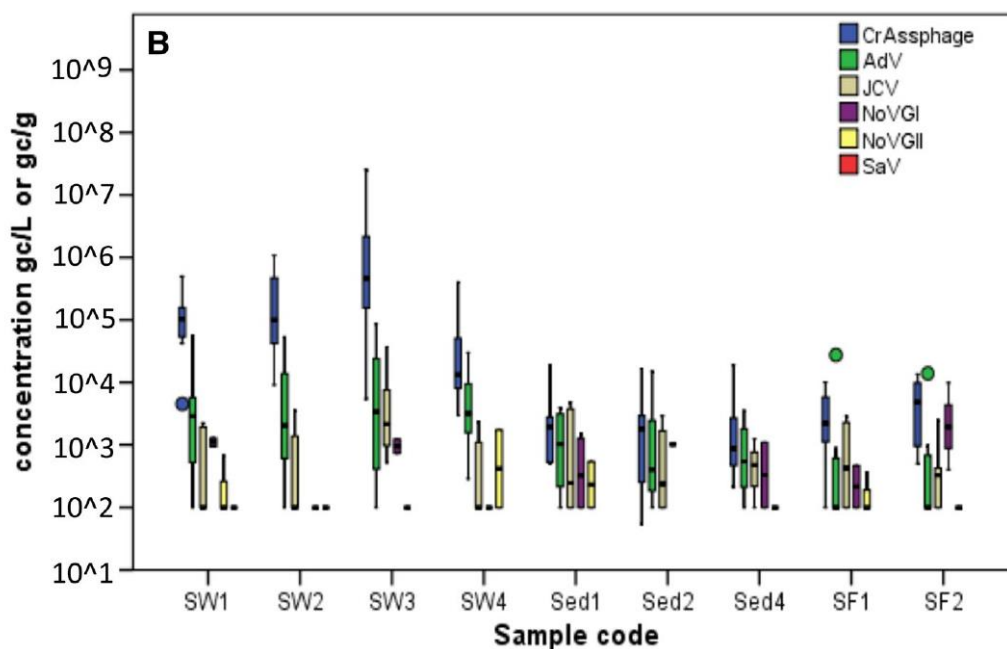
Figuur 1.1. De concentratie PMMoV in ruw water dat wordt gebruikt voor de productie van drinkwater in Japan (Haramoto, 2013)

Table 2. Detection of PMMoV in water				
Sample	Samples positive	Concentration (genome copies/L) for positive samples	Country	
Reference				
Wastewater and reclamation systems				
Raw wastewater	12/12	1.5×10^8 – 2.16×10^{10}	US	24
	24/24	3.62×10^5 – 1.36×10^7	US	31
	12/12	1.9×10^8 – 9.6×10^8	Germany	28
	2/2	5.5×10^6 – 7.2×10^6	Vietnam	32
	24/24	4.3×10^5 – 1.32×10^9	US	33
	8/8	Approx. 10^5 – 10^8	Costa Rica	34
		mean 5.72×10^7	Australia	35
	8/14	NA	South Korea	37
	4/4	Approx. 10^8	Bolivia	39
	12/12	1.10×10^7 – 7.00×10^9	US	24
Treated wastewater	24/24	1.18×10^5 – 5.62×10^6	US	31
	4/5	5.84×10^5 – 8.99×10^6	US	38
	2/2	6.5×10^5 – 8.5×10^5	Vietnam	32
	23/24	1.26×10^4 – 9.46×10^7	US	33
		Mean 4.11×10^6	Australia	35
	15/16	BQL– $10^{6.95}$	US	45
	7/7	$10^{7.3}$	Japan	55
	4/4	Approx. $10^{8.5}$	Bolivia	39
	30/30	1.73×10^4 – 8.54×10^6	US	40
Freshwater environments				
River or reservoir water	108/108	3.0×10^3 – 1.1×10^6	Germany	28
	3/3	3.0×10^4 – 1.8×10^6	Vietnam	32
	47/48	BQL– $10^{5.59}$	US	45
	118/171	mean 7.63×10^3	Singapore	56
Pond water	10/11	BQL– 1.2×10^5	Vietnam	32
Irrigation water	3/3	BQL– 1.0×10^4	Vietnam	32
	37/41	Max 5.01×10^8	Nepal	42
Groundwater	3/8	BQL–9	Vietnam	32
	17/20	Mean 2.03×10^3	Mexico	41
	12/18	Max 1.44×10^6	US	38
Marine environment				
Seawater	4/6	Mean 2.85×10^6	US	24
	4/12	3.6×10^4 – 8.6×10^4	Australia	35
	18/30	Max 8.73×10^5	US	2
Drinking water systems				
Source water (river)	140/184	2.03×10^3 – 2.77×10^4	Japan	26
	13/13	$10^{5.35 \pm 0.48}$	Japan	25
	11/11	$10^{5.33 \pm 0.34}$	Japan	25
	2/2	1.9×10^5 – 2.7×10^6	Vietnam	46
(pond)	0/1	BQL	Vietnam	46
(groundwater)	11/11	$10^{2.88 \pm 0.35}$	Thailand	43
(canal)	(100%)			
Treated water (Post-CS)	9/11 (82%)	$10^{2.39 \pm 0.55}$	Thailand	43
	13/13	$10^{2.97 \pm 0.65}$	Japan	25
	10/11	$10^{2.71 \pm 0.63}$	Japan	25
	10/10	$10^{1.06 \pm 0.53}$	Thailand	43
(Post-CS-RSF)	(100%)			
	11/11	$10^{2.32 \pm 0.84}$	Japan	25
(Post-CS-ozone)	5/13	$10^{0.91 \pm 0.84}$	Japan	25
(Post-CS-ozone-BAC)	7/13	$10^{0.99 \pm 0.75}$	Japan	25
(Post-CS-ozone-BAC-RSF)	4/13	$10^{1.23 \pm 0.42}$	Japan	25
Tap water	0/6	BQL	Vietnam	32
	2/4	BQL– 9.1×10^5	Vietnam	46
NA not available (PMMoV-RNA was examined by regular RT-PCR), BQL below quantification or detection limit, CS coagulation-sedimentation, RSF rapid sand filtration, BAC biological activated carbon				

Tabel 1.2. De aantallen PMMoV in verschillende typen water (Kitajima et al, 2018).

1.2.3 CrAssphage

CrAssphages zijn ontdekt in 2014 middels een metagenomics studie, en deze bacteriofaag blijkt de meest voorkomende bacteriofaag te zijn in het darmkanaal van de mens. Na deze publicatie is gebruik van deze bacteriofaag voorgesteld als source tracker voor fecale verontreiniging (Stachler and Bibby, 2014). In een aantal opvolgende studies is bepaald of crassphages voorkomen in oppervlaktewater, en of ze kunnen worden gebruikt als een indicator voor fecale verontreiniging, o.a. in een recente studie van Farkas et al, 2018. In deze studie is het voorkomen van crassphages in rivierwater op twee plaatsen in de UK geëvalueerd, waarbij tevens humane ziekteverwekkende virussen zijn bepaald.



Figuur 1.2. De aantallen virussen in oppervlaktewater (SW1 t/m SW4), in sediment (Sed) en in mosselen (SF).

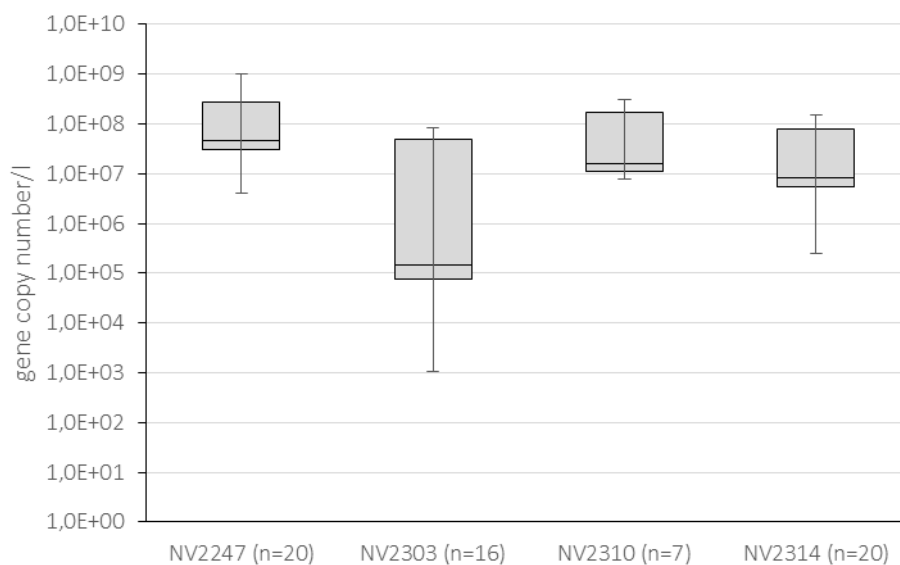
De studies tot nu toe laten zien dat crassphages aanwezig zijn in de onderzochte oppervlaktewateren. De gemiddelde concentratie ligt rond de $1 \times 10^{5-6}$ gc/l (Figuur 1.2).

1.2.4 Natuurlijke virussen

Het gebruik van van nature in het water aanwezige virussen is het resultaat van een verkennend onderzoek bij KWR waar in 2013 mee is begonnen. Dit idee komt voort uit het feit dat tot op dat moment bijna altijd bacteriofagen werden gebruikt voor de evaluatie van drinkwaterprocessen. Deze komen, zoals eerder is aangegeven, in niet al te hoge concentraties voor, wat betekent dat oppervlaktewatermonsters en vooral watermonsters na de zuiveringsstappen moeten worden geconcentreerd. Dit is duur en bewerkelijk, en daarom worden deze analyses niet routinematig gedaan in een full scale zuivering. Het routinematig vaststellen van virusverwijdering in een full scale zuivering is dus met de huidige technieken niet mogelijk.

Het verkennende onderzoek beoogde te zoeken naar in oppervlaktewater aanwezige virussen die daar in zeer hoge concentraties aanwezig zijn. Deze virussen kunnen dan worden gebruikt als procesindicatoren om de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen te meten. Omdat de virussen in hoge concentraties voorkomen, zijn ze ook nog in hoge aantallen aanwezig na zuiveringsstappen, en is dus het nemen van grootvolumemonsters en het concentreren van grote volumes niet meer nodig. Hierdoor wordt het bepalen van virusaantallen voor en na zuiveringsstappen enorm versimpeld, en daardoor is het routinematig doormeten van full scale processen mogelijk. Verder is het vaststellen van een grote logverwijdering mogelijk, omdat de virussen ook na zuiveringstappen nog aanwezig zijn, en niet meer onder de detectielimiet.

Met Next Generation Sequencing zijn virussen geïdentificeerd die inderdaad in zeer hoge concentraties voorkomen (BTO 2016.041). Van deze virussen zijn Q-PCR markers gemaakt, om de virussen snel en gemakkelijk in watermonsters te kunnen kwantificeren (BTO 2018.036). Tevens is toen gekeken of deze virussen voorkomen in het in- en uitgaande water van een aantal drinkwaterproductielocaties in Nederland. Dit resulteerde in een eerste inzicht in het voorkomen van deze virussen in verschillende typen oppervlaktewater (Figuur 1.3). Recent is het toepassen van deze natuurlijke virusmarkers geëvalueerd om de membraanintegriteit van RO-membranen te bepalen. (Hornstra et al, 2019). Deze testen lieten zien dat de natuurlijke virussen integriteitsverlies van RO-membranen kunnen vastleggen, met een veel grotere gevoeligheid dan de huidige daarvoor gebruikte conductiviteitsmetingen. De gevoeligheid van de natuurlijke virusbepalingen was gelijk aan de gevoeligheid van meten met MS2, die echter dan speciaal voor integriteitstesten aan het water moet worden toegevoegd. Middels natuurlijke virussen kan zonder spiken van een tracer (zoals MS2) integriteitsverlies worden bepaald. Het doel van dit BTO-project is het onderzoeken van de waarde en toepasbaarheid van natuurlijke virusmarkers op een aantal drinkwaterproductielocaties om de virusverwijdering van verschillende zuiveringstreinen van fysische waterbehandelingsprocessen en oeverfiltratie vast te stellen. Voorwaarde daarvoor was dat deze virussen op alle locaties in hoge concentraties in ruw water aanwezig zijn.



Figuur 1.3. De concentratie van 4 natuurlijke virussen na (n) bemonsteringen van oppervlaktewater, waarbij de middelste waarde het 50 percentiel weergeeft, en de bovenste en de onderste waarde van de box (het grijze gedeelte) het 25 en 75 percentiel. De oppervlaktewatermonsters waren afkomstig van verschillende typen oppervlaktewater in Nederland, Duitsland en België (n is het aantal tot nu toe onderzochte monsters).

2 Materiaal en methoden

2.1 Locaties

Voor dit onderzoek zijn twee drinkwaterproductielocaties geselecteerd die oppervlaktewater gebruiken; De Punt, Waterbedrijf Groningen (WbG) en De Gavers, De Watergroep (WG), en twee die oeverfiltraat gebruiken; Heel, Watermaatschappij Limburg (WML) en De Steeg, Oasen.

Productielocatie de Punt, Waterbedrijf Groningen.

Hieronder het processchema van de Punt en de monsterpunten:

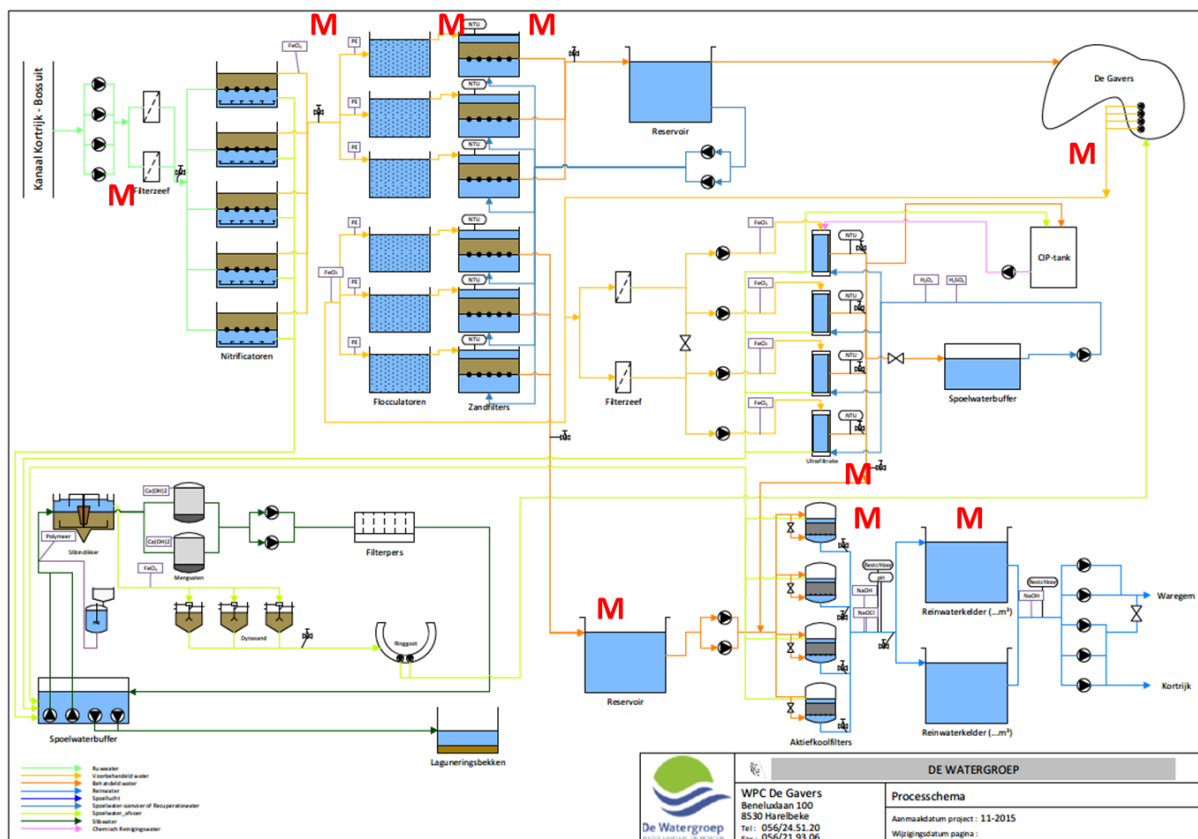


Bemonsteringslocaties zijn:

1. Rivierwater Drentse Aa
2. Effluent mengbekken
3. Coagulatie - Aanvoer (na menger)
4. Voeding actiefkoolfilters
5. Aanvoer UV-desinfectie (AKF 1-6)
6. Aanvoer langzame zand filters (LZF)
7. Aanvoer cascade (verzameld filtraat)
8. Rein water

Productielocatie De Gavers, De Watergroep, België

Hieronder het processchema van de Gavers. Na het bassin de Gavers wordt de waterstroom gesplitst, en gaat ongeveer een kwart door de UF, en het resterende deel gaat naar de drielaagsfilters.



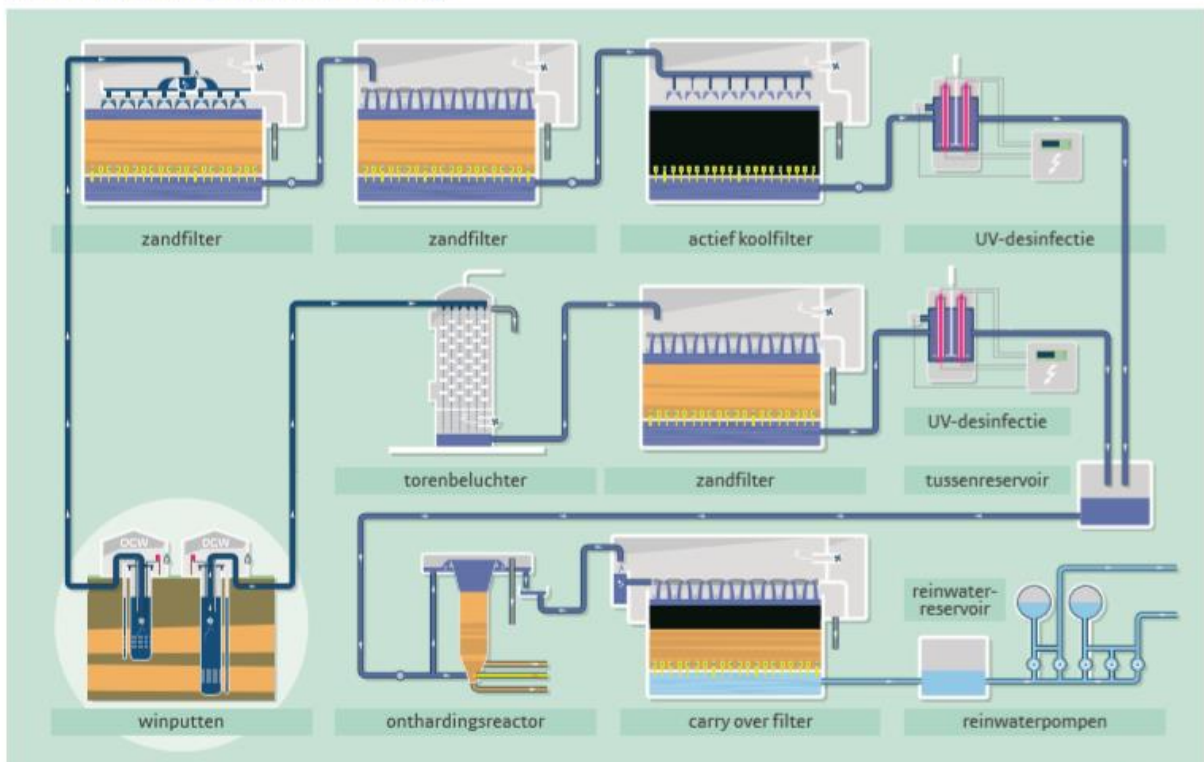
Figuur 2.1. Het processchema van drinkwaterproductielocatie De Gavers.

1. Kanaal Kortrijk Bossuit
2. Na Nitrificatoren
3. Na defosfatatie filters
4. Na vlokkenfilter
5. Na de Gavers bassin
6. Na UF
7. Na AKF
8. Na Reinwaterkelder

De Steeg Oasen

Bij de Steeg is het ondiepe grondwater (OGW) bemonsterd. Dit komt oorspronkelijk uit de Lek, en heeft een bodempassage ondergaan.

Proces zuiveringsstation De Steeg



oasen
drinkwater

Figuur 2.2. Het processchema van drinkwaterproductielocatie De Steeg.

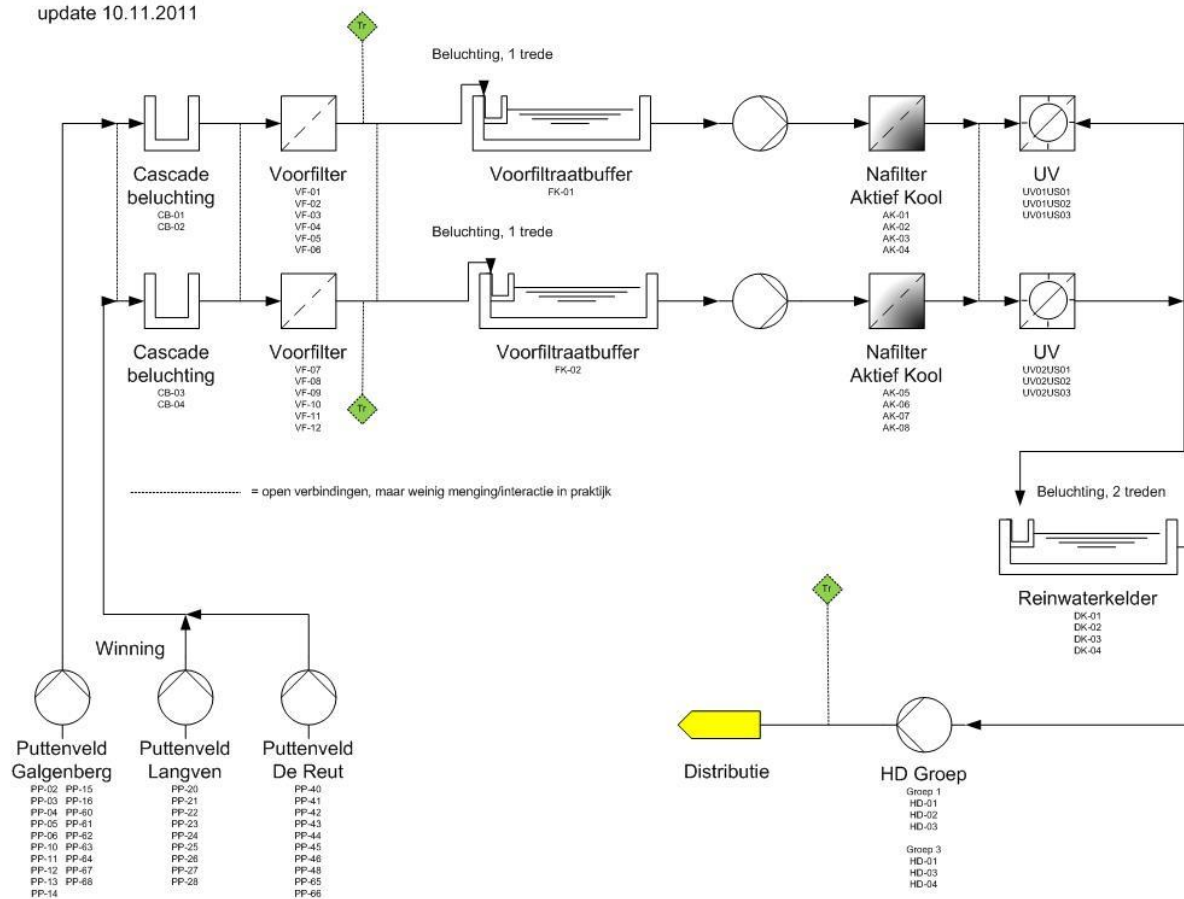
1. Verzameld Ruw Water OGW De Steeg
2. Verzameld Voorfiltraat OGW
3. Verzameld Nafiltraat OGW
4. Verzameld effluent Koolfilters OGW
5. UV Desinfectie OGW 1 AF
6. Mengkelder DGW/OGW
7. Effluent onthardingsreactoren
8. Effluent Carry over filtratie A
9. Uitgaand reinwater ZS De Steeg A

Heel, WML

Bij Heel wordt water gezuiverd afkomstig uit het Lateraalkanaal, waarna het wordt opgeslagen in een spaarbekken. Vandaar volgt een bodempassage, waarna het water verder wordt gezuiverd door snelfiltratie, actiefkoolfiltratie en UV.

WP Heel

update 10.11.2011



Figuur 2.3. Het processchema van drinkwaterproductielocatie Heel.

1. 0045RUO0100 - Lateraalkanaal
2. 0045BS10501 - Spaarbekken
3. 0045RUG0401 - Gez. ruw 4
4. 0045RUG0301 - Gez. ruw 3
5. 0045VFG0100 - Na snelfiltratie
6. 0045CEU0100 - Na UV
7. 0045KGF0100 - Na AKF
8. 0045RWL0100 - Rein

2.2 Opwerking en Q-PCR

De opwerking van virussen en DNA isolatie is uitgevoerd zoals beschreven in BTO 2018.036. De monstervolumes bedroegen 1 liter. Voor de kwantificering van de natuurlijke virussen in watermonsters is gebruik gemaakt van Q-PCR. Tijdens het eerdere onderzoek werden de virussen gekwantificeerd door middel van de SYBR green methode, maar is er een TaqMan PCR methode ontwikkeld, welke gebruik maakt van probes die op een unieke positie op het DNA binden, waardoor er minder kans is op vals positieve monsters. Voor de analyse/kwantificering van natuurlijke virussen in de watermonsters is gebruik gemaakt van de primers en probes in tabel 3.1.

Virus-con	Sequentie primer F	Sequentie primer R	Primer R complement	Probe #1
2306	TGGTCAAGATTGTGACCCCG	TCTAGTTGCTGCCGTTGGAG	CTCCAACGGCAGCAACTAGA	CCG GAA GCC ATA TTG CCT TTC GCC A
2310	GCATCTTCGTCAATGCGTCC	GAGGTCGTGGTGTGGCTATC	GATAGCCACACCACGACCTC	CAC GTT CTC TGA GTT GCG GTA GAA GA
2307	TGGACTCCAACGCTCACATC	CGTTATTTACAGCTCCTGCG	CGCAGGACGCTGAAATAACG	GCC ATT AGG AAC AAT CAG GCA TTC GT
2314	ACCAGGGGCGGTGTATATTG	GACGCCGTTGAAATGTCAGG	CCTGACATTTCAACGGCGTC	CGC AAT AGT CCA TGC TGA CCC ACC T
2038	GCCGGTAACCCTACCCCTAT	ACT GGT GGG AAA GAA AAC TCG T	A CGA GTT TTC TTT CCC ACC AGT	TAC AAA CCC TAA TTG AAG TTG AAG TTC AAC
2247	AAGCCTGAACGTGTTCCGAT	CTGCCCGCAGGATTGTTAGA	TCTAACAATCCTGCGGGCAG	ACG CTC AAC GGA CTA TGA TTG ACA CGA C

Het PCR protocol is:

25 ul supermix
 7 ul water
 5 ul BSA
 1 ul Forw primer
 1 ul Rev primer
 1 ul Probe

3 min 95°
 10 sec 95°
 45 sec 60° 40 cycli

3 Resultaten

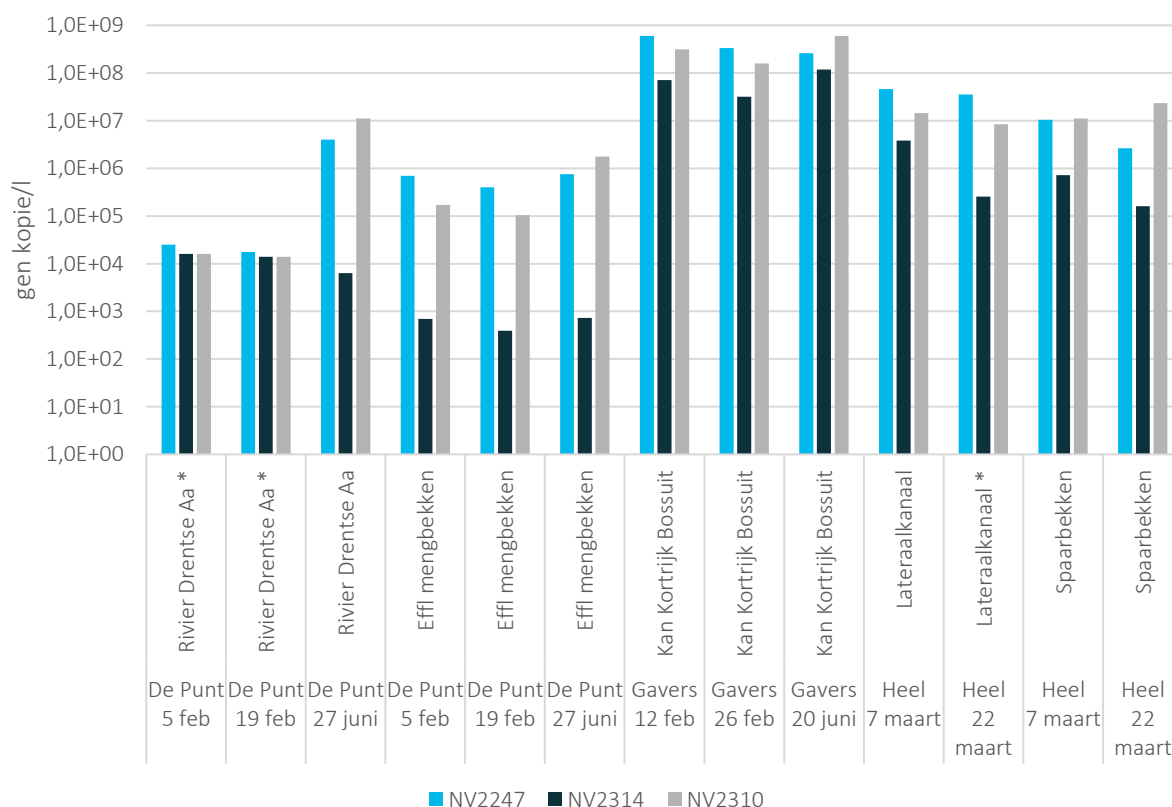
3.1 Het voorkomen van natuurlijke virussen in oppervlaktewater

Voorwaarde voor het bepalen van een hoge logverwijdering van natuurlijke virussen door de zuivering is dat natuurlijke virussen consistent en in hoge concentraties in het ruw oppervlaktewater voorkomen. Op dit moment is er nog geen informatie over het algemeen voorkomen van deze virussen in diverse soorten oppervlaktewater, en eventuele variatie, bijv. door seizoenen. Het ruwe water van drie locaties is in dit project daarom onderzocht op de aanwezigheid van 6 natuurlijke virussen. Virussen NV2247, NV2310 en NV2314 hebben bij een aantal eerdere experimenten laten zien dat ze in hoge concentraties voorkomen in oppervlaktewater. Virussen NV2038, NV2306 en NV2307 zijn tot nu toe slechts beperkt getest op de aanwezigheid in oppervlaktewater.

De virussen NV2247, NV2310 en NV2314 werden in deze studie op alle locaties op alle of een aantal meetmomenten in hoge aantallen aangetroffen, waarmee dit goede merkers zijn om een zuivering door te meten op virusverwijdering. Figuur 3.1 laat zien dat de aantallen virussen van NV2247, NV2314 en NV2310 hoog waren in

het kanaal Kortrijk Bossuit (De Gavert). NV2247 en NV2310 waren aanwezig in $> 1 \times 10^8$ gc/l, en NV2314 $> 1 \times 10^7$ gc/l. Ook in Lateraalkanaal (Heel) kwamen deze drie virussen in hoge concentraties voor, maar wel iets lager dan in het kanaal Kortrijk Bossuit. Hier waren de concentraties van NV2247 en NV2310 ongeveer 1×10^7 gc/l, en NV2314 $> 1 \times 10^6$ gc/l. In de Drentse Aa waren de virussen in lagere concentraties aanwezig, maar bij de monsters genomen in februari bleek dat het rendement van de DNA-isolatie en/of PCR-reactie erg laag was. Een laag rendement betekent dat een aan het monster toegevoegde interne standaard in een te lage concentratie in de PCR wordt teruggevonden. Dit betekent dat of de DNA-isolatie, of de PCR minder efficiënt is geweest. De oorzaak van een laag rendement kan zijn dat bepaalde stoffen in het water de DNA-extractie storen of de PCR-reactie remmen. De monsters met een laag rendement (gemarkeerd met een * in figuur 3.1) geven daarom waarschijnlijk geen goede indicatie van de werkelijke concentratie. Bij het monster van 27 juni was het rendement wel goed, en dit monster liet hogere concentraties zien van NV2247 en NV2310, maar een lage concentratie van NV2314. Omdat NV2314 wel in hoge concentratie aanwezig is in de andere monsters, is dit waarschijnlijk een karakteristiek van de Drentse Aa, en dit duidt op spatiale verschillen in virusconcentraties van dit virus.

De andere drie geteste virussen, NV2038, NV2306 en NV2307, bleken niet aanwezig te zijn in het geteste oppervlaktewater van de drie onderzochte locaties. Virus NV2306 en NV2307 zijn eerder wel in hoge concentraties in het Lekkanaal waargenomen, maar dit virus is mogelijk locatiespecifiek, en is in de tot nu toe geteste Maasmonsters in Limburg afwezig (BTO 2018.036). Het is wel in het ruwe water van drinkwaterproductielocatie Braakman gevonden, waar het ruwe water afkomstig is uit de afgedamde Maas. Ook virus NV2038 is in hoge concentraties gevonden in het Lekkanaal, maar nog niet eerder getest op andere locaties of in zuiveringen. Helaas bleken deze virussen niet voor te komen in het ruwe water van de geteste locaties.



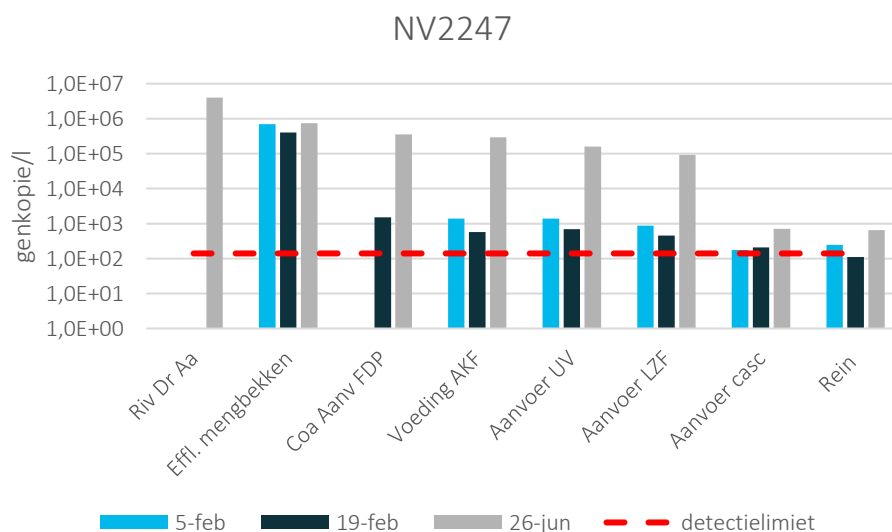
Figuur 3.1: De concentratie van de virussen NV2247, NV2314 en NV2310 in het oppervlaktewater en spaarbekken bij productielocatie De Punt, de Gavers en Heel gedurende 3 tijdstippen in 2019. Bij de monsters gemarkeerd met een asterisk was het rendement van de isolatie en PCR laag.

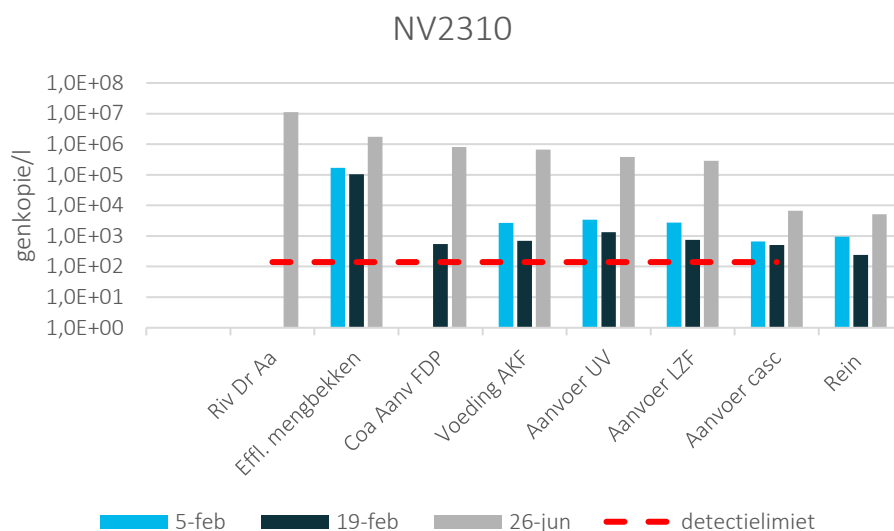
In eerder onderzoek zijn NV2247, VN2303, NV2310 en NV2314 een aantal keer gemeten op verschillende locaties in de Rijn, het IJsselmeer, en de Maas (niet gepubliceerd). Figuur 1.3 geeft middels boxplots de concentratie weer in alle tot nu toe onderzochte oppervlaktewatermonsters. Deze figuur laat zien dat de virussen NV2247, NV2310 en NV2314 in veel oppervlaktewaterlocaties in hoge concentratie worden waargenomen. De gemeten concentraties in het water van het Kanaal Kortrijk Bossuit en het Lateraalkanaal komen met de bovenstaande waarnemingen overeen. In de Drentse Aa valt alleen NV2310 binnen de eerder waargenomen concentraties, maar zijn virus NV2247 en NV2314 minder aanwezig dan in andere oppervlaktewateren. Desondanks is NV2247 nog steeds in een voldoende hoge concentratie aanwezig om als merker te kunnen dienen voor het doormeten van processen. Voor NV2314 is dit voor de Drentse Aa niet het geval. Van deze merker is de concentratie te laag om deze drinkwaterproductielocatie door te meten. Geconcludeerd kan worden dat van de tot nu toe geteste virussen de virussen NV2247, NV2310 en NV2314 het meeste voorkomen op de verschillende locaties, maar dat NV2314 niet overall lijkt voor te komen. Virus NV2247 en NV2310 blijken ook voor te komen in rivierlocaties in Nepal, wat een indicatie is dat deze virussen erg universeel aanwezig zijn in water (Haramoto, personal communication). Meer meetgegevens in oppervlaktewater zijn nodig om een beter beeld te krijgen van het voorkomen van deze virussen, en de concentraties.

3.2 Het voorkomen van natuurlijke virussen na zuiveringsprocessen

3.2.1 Drinkwaterproductielocatie De Punt (WbG)

Van drinkwaterproductielocatie de Punt zijn de aantallen natuurlijke virussen bepaald in het ingaande water en in het water na de verschillende zuiveringsprocessen. De metingen zijn uitgevoerd met 6 verschillende virussen. Om virusverwijdering door zuiveringsprocessen te kunnen bepalen, is het belangrijk dat de virussen in een hoge concentratie aanwezig zijn in het ruwe water. De virussen NV2038, NV2306, NV2307 bleken niet voor te komen in het ruwe water van de Drentse Aa. Het virus NV2314 bleek alleen in de zomer voor te komen in dit water, in een relatief lage concentratie van $6,4 \times 10^3$ gc/l. Virussen NV2247 en NV2310 komen wel in een hogere concentratie voor. Daarom is voor het bepalen van de verwijdering van virussen door de zuiveringsprocessen van productielocatie de Punt gebruik gemaakt van NV2247 en NV2310 (Figuur 3.2). De monsters van het water van de Drentse Aa genomen in februari lieten een laag rendement zien, waardoor deze geen goed beeld geven van de concentraties in het ruwe water. Van het monster het water van de Drentse AA van juni was het rendement wel goed, en naar verwachting geeft dit monster wel een goed beeld van de aanwezigheid van virussen. In figuur 3.2 is daarom alleen het water van de Drentse Aa bemonsterd in juni weergegeven.





Figuur 3.2. Het aantal gen kopieën van virus NV2247 en NV2310 in het ruwe water en na zuiveringsprocessen van de Punt.

Virus NV2247 en NV2310 laten voor de virusverwijdering door de diverse drinkwaterprocessen een gelijk beeld zien, maar er zijn wel verschillen in virusverwijdering bij de verschillende processen in februari en in juni. Zo nemen in februari de virussen NV2247 en NV2310 na de coagulatie/sedimentatie af met 2,5, resp. 2,4 log, terwijl dit proces bij de monsternamen in juni voor beide virussen een afname van maar 0,3 log laat zien. Het monster na LZF laat juist in de zomerperiode een verwijdering zien van virus NV2247 en NV2310 van resp. 2,1 en 1,6 log, terwijl dit gemiddeld in februari resp. 0,5 en 0,4 log is. Dit zou kunnen duiden op een seizoensafhankelijke mate van efficiëntie voor de verwijdering van virussen voor het coagulatie/sedimentatie proces en de LZF. Omdat het aantal metingen beperkt is, kan dit niet met veel meetgegevens worden ondersteund. Bij LZF kan mogelijk ook variatie in virusverwijdering worden veroorzaakt door bijvoorbeeld veroudering van filters en watertemperatuur. Ook bij coagulatie/sedimentatie kunnen waterkarakteristieken of procescondities verschillen geven in efficiëntie van virusverwijdering. Meer metingen met een hogere frequentie kunnen dit goed in beeld brengen.

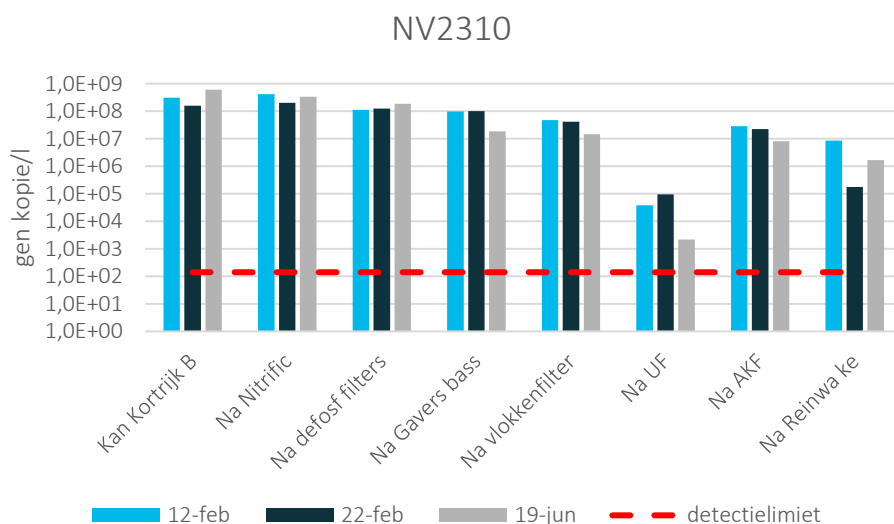
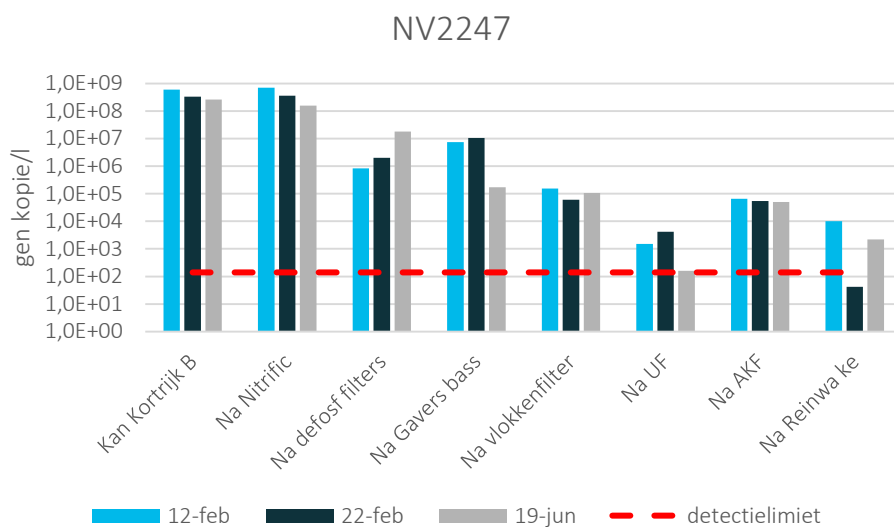
Uit de resultaten blijkt het effect van UV op deze virussen gering. Dat komt omdat de methode is gebaseerd op het meten van het DNA van de virussen. Het meet dus de aan- of aanwezigheid van virusdeeltjes. UV beschadigt het virus, waardoor het niet meer infectieus is, maar het is door deze methode nog steeds detecteerbaar met DNA-technieken. Bij een steeds hogere dosis zal ook uiteindelijk het DNA wel beschadigen, waardoor na een hoge UV-dosis ook met deze methode een vermindering van virusdeeltjes zal worden gemeten. De in deze zuivering gebruikte UV-dosis laat een kleine reductie zien van virusdeeltjes. De mate van infectie zal naar verwachting wel flink zijn gereduceerd.

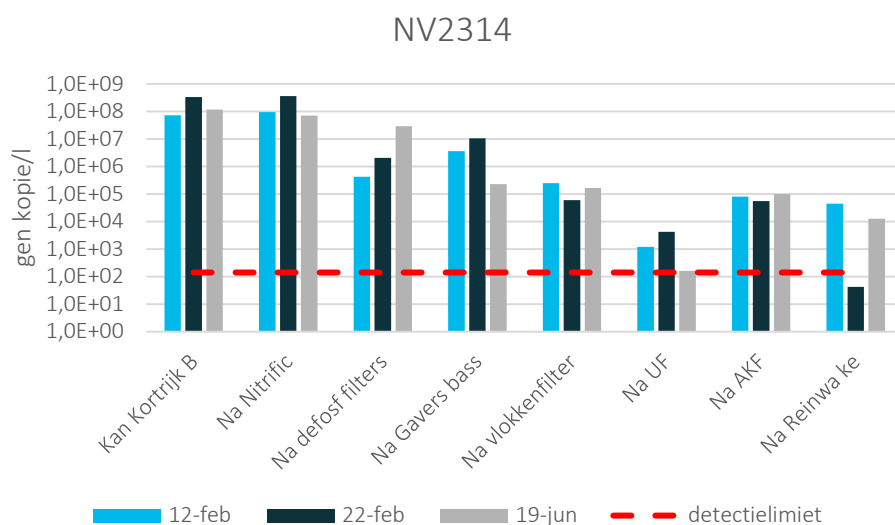
3.2.2 Drinkwaterproductielocatie de Gavers, (de Watergroep)

Bij drinkwaterproductielocatie de Gavers wordt water ingenomen uit het kanaal Kortrijk Bossuit en bestaat de zuivering uit een voorbehandeling en een nabehandeling. De voorbehandelingsfase bestaat uit een biologische ammoniumoxidatie en een defosfatatie (drielaagsfilters defosfateringsfilters). Daarna gaat het water naar de

recreatieplas de Gavers. Vanaf de Gavers wordt de waterstroom gesplitst (nabehandelingsfase). Ongeveer driekwart van het water afkomstig uit de Gavervijver gaat naar 3 drielaagsfilters (vlokkenfilters genoemd), naar een middendrukkelder, naar de AKF en dan naar de reinwaterkelders. Ongeveer een kwart van het water afkomstig uit de Gavervijver gaat rechtstreeks naar de UF, dan naar AKF (het water uit de vlokkenfilters en UF komen voor de AKF samen) en dan gaat het water naar de reinwaterkelder. In de reinwaterkelder wordt chloor gedoseerd.

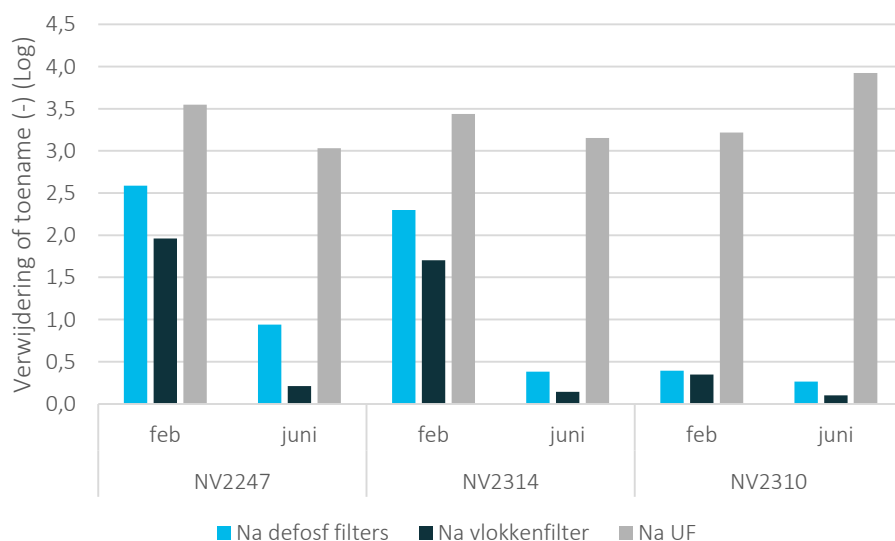
In het oppervlaktewater van het kanaal Kortrijk Bossuit zijn de virussen NV2038, NV2306 en NV2307 niet gedetecteerd, maar waren de virussen NV2247, NV2310 en NV2314 wel in hoge concentratie aanwezig. Daarom zijn deze drie virussen ingezet om de virusverwijdering door de verschillende processen te meten. Deze productielocatie is gemonitord met drie verschillende virussen, waarvan twee metingen zijn uitgevoerd in februari, en één in juni (figuur 3.3).





Figuur 3.3. Het aantal gen kopieën per liter van virus NV2247, NV2310 en NV2314 in het ruwe water en na zuiveringsprocessen bij drinkwaterproductielocatie De Gavers.

Figuur 3.3 laat zien dat de verwijdering van virussen NV2247 en NV2314 door zuiveringsprocessen erg op elkaar lijkt. Deze virussen worden verwijderd door de defosfateringsfilters in de voorzuivering, en door de vlokkenfilters en vooral UF in de nazuivering. Ook kan uit de figuur worden afgeleid dat de virusverwijdering van deze twee virussen door de defosfateringsfilters en de vlokkenfilters in de winter aanmerkelijk beter verloopt dan in de zomer. Verder is het aantal natuurlijke virussen in De Gavers plas in de winter hoger dan in de zomer. Het beeld van NV2310 wijkt voor wat betreft de filterprocessen af van de virussen NV2247 en NV2314, in die zin dat dit virus, zowel in februari als in juni, nauwelijks wordt verwijderd door de defosfaterings- en vlokkenfilters. De UF laat voor de drie virussen wel een consistent beeld zien, en de verwijdering van deze virussen is zowel in februari als in juni minimaal 3 log (Figuur 3.4). UF is een fysische barrière, en UF-membranen hebben een poriegrootte van 10 tot 100 nm. Virussen hebben een grootte van 20-300 nm, en afhankelijk van de poriegrootte is een UF daarom geen absolute barrière voor alle virussen. Uit de resultaten blijkt dat de UF in deze zuivering een verwijdering van tussen de 3 en 4 log van de drie natuurlijke virussen bewerkstelligd.

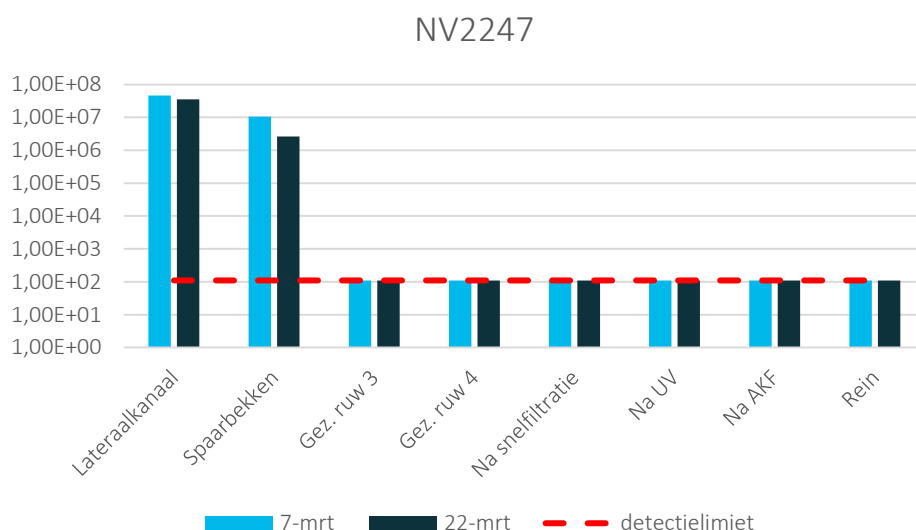


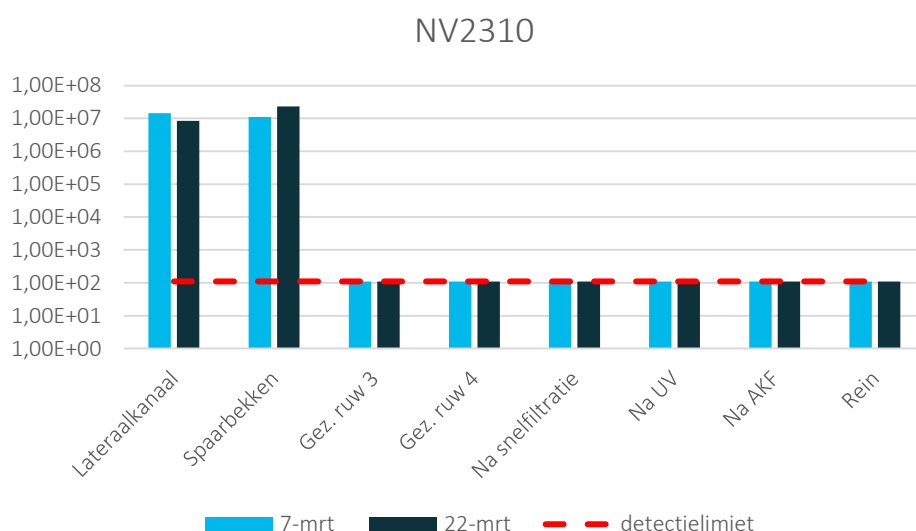
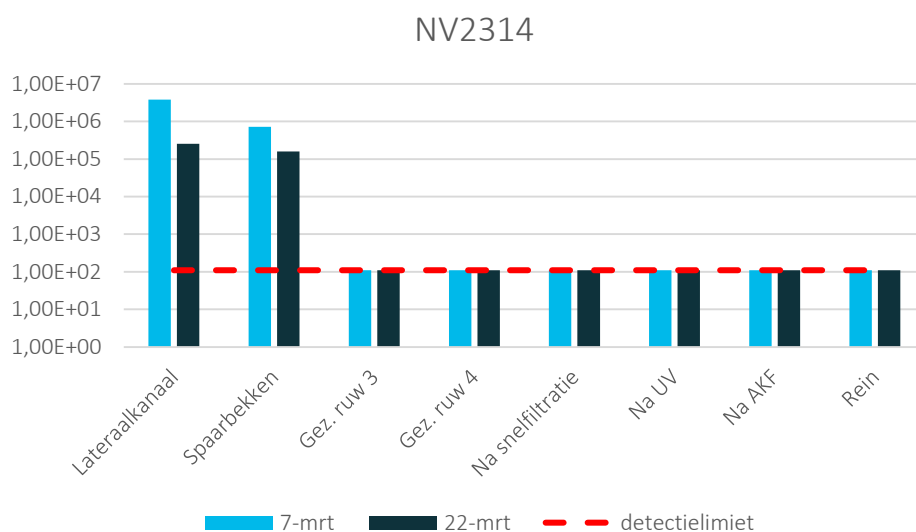
Figuur 3.4. De logverwijdering van drie natuurlijke virussen door het defosfateringsfilter in de voorzuivering, en het vlokkenfilter en de UF in de nazuivering.

In figuur 3.4 is de verwijdering weergegeven van de verschillende processtappen voor de drie virussen in februari en in juni, waarbij de twee metingen van februari zijn gemiddeld. Voor beide filterstappen (en ook voor de UF) wordt FeCl gedoseerd. Virus NV2247 en NV2314 laten beiden een verwijdering zien in de winter van ongeveer 2,5 log na defosfateringsfilters en iets minder dan twee log na de vlokkenfilters. In de zomerperiode laten deze processtappen veel minder verwijdering zien van deze virussen.

3.2.3 Drinkwaterproductielocatie Heel (WML)

Ook bij drinkwaterproductielocatie Heel worden de virussen NV2247, NV2310 en NV2314 aangetroffen in het ruwe water van het Lateraalkanaal. Na het spaarbekken ondergaat het water een bodempassage stap, waarna het verder wordt gezuiverd. Zoals uit de resultaten blijkt is de bodempassage een effectieve stap in het zuiveren van oppervlaktewater, want geen van de virussen wordt aangetroffen in de processen na de bodempassage. Ook na de snelfiltratie of AKF worden de virussen niet aangetroffen. Dit betekent dat de bodempassage hier minimaal 5 log virusreductie bewerkstelligd, en waarschijnlijk meer, omdat de metingen na bodempassage onder de detectielimiet zijn.





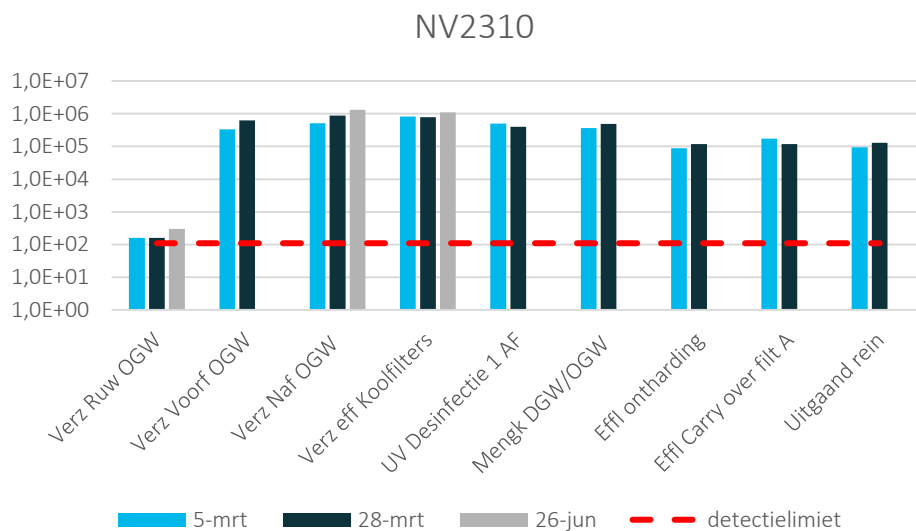
Figuur 3.5. Het aantal gen kopieën per liter van virus NV2247, NV2310 en NV2314 in het ruwe water en na zuiveringsprocessen bij drinkwaterproductielocatie Heel.

Bij deze productielocatie is twee keer gemeten in maart 2019, en geeft daarom een beperkt beeld van de situatie. Om een beeld te krijgen van de bescherming door bodempassage wordt aanbevolen meer frequent te meten, en te meten bij verschillende putten om eventuele kortsluitstromingen uit te sluiten.

3.2.4 Drinkwaterproductielocatie de Steeg (Oasen)

Bij drinkwaterproductielocatie De Steeg wordt drinkwater geproduceerd uit oeverfiltraat vanuit de rivier de Lek. Eerder is aangetoond dat de zes geselecteerde virussen allen voorkomen in het Lekkanaal. De Steeg heeft een diepe en een ondiepe winning, en voor dit experiment is het water onderzocht uit de ondiepe winning (OGW). De natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314 zijn bepaald in het OGW en na een aantal zuiveringsstappen. Ook hier laat oeverfiltratie zien dat deze stap effectief is in verwijderen van virussen, want in het verzameld ruw van het ondiepe grondwater worden 5 van de 6 virussen niet aangetroffen. Virus NV2310 wordt wel aangetroffen in een lage concentratie vlak boven de detectiegrens. Opvallend is dat virus NV2310 direct na het voorfiltraat wordt

aangetroffen in een concentratie van iets boven de 1×10^5 gc/l, en na de opvolgende processtappen aanwezig blijft, en niet afneemt. Ontharding laat een kleine vermindering zien van de virusaantallen. De aanwezigheid van dit virus na het voorfilteraat is onverwacht, en kan niet goed worden verklaard, omdat na bodempassage de virussen afwezig zijn, of aanwezig in een zeer lage concentratie. Daarom lijkt het eerste zandfilter de bron te zijn van dit virus. Het virus is tijdens alle drie de bemonsteringen in het proces aangetroffen, en lijkt daarmee daadwerkelijk na het voorfilteraat aanwezig te zijn.



Figuur 3.6. Het aantal gen kopieën per liter van virus NV2247, NV2310 en NV2314 in het ruwe water en na zuiveringsprocessen bij drinkwaterproductielocatie De Steeg.

4 Discussie

4.1 Het meten van zuiveringsprocessen met natuurlijke virussen

In deze studie zijn vier drinkwaterproductielocaties, waarvan er twee oppervlaktewater en twee oeverfiltraat gebruiken als grondstof voor de productie van drinkwater, doorgemeten op de verwijdering van natuurlijke virussen, waarbij wordt aangenomen dat deze virussen een maat zijn voor de verwijdering van ziekteverwekkende virussen. Tot op heden was het niet mogelijk om snel en routinematig de virusverwijdering in een full scale zuivering te bepalen, omdat de tot dan toe daarvoor gebruikte colifagen in een te lage concentratie voorkomen in het ruwe water en na zuiveringsprocessen. Natuurlijke virussen hebben dit probleem niet, en drie van de hier geteste natuurlijke virussen worden frequent gedetecteerd in hoge concentratie op verschillende locaties.

In eerder BTO-onderzoek is al wel gekeken naar de aanwezigheid van natuurlijke virussen in het ingaande en uitgaande water van een zuivering (BTO2018.036), maar is niet naar de afzonderlijke processen gekeken. In deze studie wordt voor de eerste keer gebruik gemaakt van deze virussen om de virusverwijdering door zuiveringsprocessen te bepalen in een full scale zuivering. Daarbij was het doel tweeledig; 1. Komen deze virussen op alle locaties in hoge concentratie voor in het ruwe water. De reden om dit te onderzoeken is dat er nog te weinig gegevens zijn over het voorkomen van deze virussen op verschillende locaties, typen water en of de virussen onderhevig zijn aan seizoensinvloeden. 2. Kunnen we deze virussen gebruiken om de virusverwijdering door afzonderlijke processtappen te bepalen.

Om meer duidelijkheid te krijgen over onderdeel 1 zijn in deze studie drie locaties op drie verschillende tijdstippen bemonsterd. Hoewel dit niet veel metingen zijn, bevestigt dit wel het beeld dat we hebben na het meten van deze virussen in het oppervlaktewater in eerdere studies. In die studies is de Rijn, de Maas en het IJsselmeer bemonsterd op verschillende locaties. De virussen NV2247, NV2310 en NV2314 waren over het algemeen aanwezig in hoge tot zeer hoge concentraties, net zoals op de locaties in deze studie. Een uitzondering is de Drentse Aa, waar de virussen in een lagere concentratie voorkwamen. Frequentere metingen op meer locaties zijn nodig om het algemeen voorkomen van deze virussen, zowel spatiaal als temporaal, beter te kunnen vaststellen, maar met name virus NV2247 en NV2310 zijn tot nu toe in alle geteste oppervlaktewaterlocaties gevonden. Ook zijn deze virussen recent gevonden in een rivier in Nepal (E. Haramoto, persoonlijke communicatie).

Op alle locaties zijn voor en na zuiveringsprocessen watermonsters genomen, zodat van de afzonderlijke processen de virusverwijdering kon worden vastgesteld. Bij de beide oppervlaktewaterproductielocaties was virusreductie meetbaar voor de processen coagulatie/sedimentatie en LZF bij de Punt, en drielaagsfiltratie in de voor- en nazuivering, en UF bij de Gavers. Bij de Gavers wordt voor de drielaagsfilters en de UF FeCl_3 gedoseerd ter bevordering van vlokvorming. Hoewel de processen bij beide locaties verschillen, was de verwijdering van de natuurlijke virussen NV2247 en NV2310 (De Punt) en NV2247 en NV2314 (De Gavers) in de winter duidelijk hoger na de coagulatie/sedimentatie of vlokvorming en filtratie, wat een indicatie zou kunnen zijn dat deze processen in de winter effectiever zijn in virusverwijdering dan in de zomer. De waarneming van virus NV2310 bij de Gavers komt daar niet mee overeen, want dit virus wordt in de Gavers nauwelijks door de vlokkenfilters verwijderd. Hier is op dit moment geen verklaring voor. Het kan zijn dat dit virus onder de condities bij de Gavers niet neerslaat of bindt, en als een los virusdeeltje door de zuivering gaat. Daardoor kan het wel alle drielaagsfiltratieprocessen passeren, maar wordt het door de UF in gelijke mate tegengehouden als de overige virussen. Omdat de virussen ook na de UF worden waargenomen, kan een deel van de virussen de UF passeren. Dit is niet onverwacht, want de poriën van een UF membraan zijn te groot om een absolute barrière te zijn voor virussen. Virussen kleiner dan de poriën in een UF (van 10-100 nm) kunnen passeren, maar het kan ook zijn dat het membraansysteem of de afdichtingen niet volledig integer zijn, en dus virussen de UF kunnen passeren middels routes buiten het membraan

om. Omdat op dit moment niet bekend is hoe groot de natuurlijke virusmerkers zijn, kan niet worden bepaald of van deze virussen kan worden verwacht dat ze door een UF-membraan worden tegengehouden, en dus welke route de virussen hier nemen om het membraansysteem te passeren.

Een andere studie met natuurlijke virussen laat zien dat deze virussen bij membraanprocessen (in dat geval een RO-membraan, wat een absolute barrière voor virussen is) goed de integriteit van het membraan kunnen vaststellen (Hornstra et al, 2019).

Beide oeverfiltratiewinningen laten zien dat bodempassage een enorm effectieve stap is in het verwijderen van virussen. De hoge aantallen virussen die zijn gedetecteerd in het ruwe water worden in het onttrokken oeverfiltraat niet meer aangetroffen. Daarmee lijken deze virussen ook een goede merker te zijn om bijvoorbeeld kortsluitstromingen te detecteren bij bodempassage. Omdat de virussen voorkomen in een concentratie hoger dan 10^7 gc/l kan in ieder geval worden vastgesteld dat de virusverwijdering meer dan 5 log bedraagt. Omdat de virussen niet meer voorkomen na bodempassage kunnen de processen daarna niet meer afzonderlijk geëvalueerd worden op virusverwijdering.

In de Steeg wordt NV2310 wel gedetecteerd in hoge concentratie na het voorfiltraat en in alle processen daarna. Hier is geen duidelijke verklaring voor. Mogelijk dat de gastheer van dit virus een bacteriesoort is die behoort tot de natuurlijke populatie in dit filter.

4.2 Viruseigenschappen en de relatie met humane ziekteverwekkende virussen

Van de in de tabel 4.1 aangegeven water gerelateerde ziekteverwekkende virussen wordt door de WHO het risico op infectie als gemiddeld tot hoog geïdentificeerd (WHO, 2011, Gall et al, 2015).

Tabel 4.1. Ziekteverwekkende virussen die in oppervlaktewater kunnen worden aangetroffen (WHO, 2011)

	Genoom	Grootte nm	envelop
Adenovirus	ds DNA	90-100	Nee
Astrovirus	ss RNA	28-32	Nee
Hepatitis A	ss RNA	27-32	Nee
Hepatitis E	ss RNA	27-34	Nee
Rotavirus	ds RNA	77	Nee
Norovirus	ss RNA	23-40	Nee
Sapovirus	ss RNA	27-40	Nee
Enterovirus	Groep virussen		
Polyomavirus (urine)	ds DNA	40-50	Nee
Cytomegalovirus (urine)	ds DNA	150-200	Ja

Het doel van virusverwijdering middels zuiveringsprocessen is het verwijderen van ziekteverwekkende virussen voor mens/plant/dier afhankelijk van het gebruik van het te zuiveren water. De virusmerkers moeten daarom zoveel mogelijk dezelfde eigenschappen hebben als ziekteverwekkende virussen, om een goede voorspellende waarde te hebben voor de verwijdering van de (in lage concentraties voorkomende) ziekteverwekkers. Op dit moment wordt als modelvirus voor ziekteverwekkende virussen vaak bacteriofaag MS2 gebruikt. Vanwege de grootte (een klein virus van 27 nm) en het feit dat het behoorlijk goed bestand is tegen oxidatietechnieken wordt dit virus vaak beschouwd als een goed model voor ziekteverwekkende virussen, met name enterovirussen. Overigens is de relatie verwijdering van humane versus indicatorvirussen bij de huidige indicatorvirussen zoals somatische of F-specifieke colifagen, of model bacteriofaag MS2 ook vaak niet vastgesteld. Ook voor de virusmerkers gebaseerd op natuurlijke

virussen is het verband tussen de verwijdering van ziekteverwekkende virussen en de ziekteverwekkers niet bekend, maar wordt aanbevolen bij de verdere ontwikkeling van de virusmarkers dit verband wel te onderzoeken. Hiervoor is samenwerking gezocht met Erasmus MC “Afdeling viroscience”, waar veel kennis aanwezig is op het gebied van het vertalen van genomische informatie naar viruseigenschappen.

Omdat de grootte van de huidige natuurlijke virusmarkers niet bekend is, kan het zijn dat de natuurlijke virussen door bepaalde waterbehandelingen worden tegengehouden, terwijl de ziekteverwekkende virussen wel kunnen passeren. Indien eigenschappen zoals grootte, morfologie, lading etc. van de natuurlijke virussen bekend zijn, dan kan specifiek een set van virussen worden geselecteerd voor specifieke waterbehandelingstoepassingen, bijvoorbeeld wat grotere virussen voor UF-membranen, en kleine natuurlijke virussen voor RO-membranen. Daarom is deze informatie belangrijk om te verkrijgen. Ook kan een vergelijking worden gemaakt met het eerder beschreven PMMoV en/of CrAssphage, die nu worden ingezet als fecale en procesindicator, en waar in het geval van het PMMoV al is gekeken naar de verwijdering van het PMMoV in relatie tot bepaalde ziekteverwekkers (Shirasaki et al, 2017).

4.3 Gebruik van virusmarkers bij oxidatieve processen

De meting van de virusmarkers is gebaseerd op de detectie van een DNA-fragment van het desbetreffende virus. De vergelijking van het aantal virusdeeltjes in het ruwe water met het aantal na een zuiveringsproces is een maat voor de verwijdering van de virussen. Bij oxidatieve processen en UV is het mogelijk dat het virus is geïnactiveerd, maar het DNA nog wel intact is. In dat geval worden geïnactiveerde virussen door de methode gedetecteerd, en kan er geen verschil worden waargenomen in de virusaantallen voor en na de behandeling. Daarmee is de methode op dit moment niet geschikt om virusinactivatie te bepalen als gevolg van oxidatie en UV. Een hoge oxidatiedosis geeft wel schade aan het DNA, en dat kan wel door de methode worden vastgesteld, maar dan heeft virusinactivatie waarschijnlijk al eerder plaatsgevonden na een korte blootstellingstijd en loopt de reductie van virusdeeltjes gemeten met de nieuwe virusmethode niet synchroon met de mate van afsterving van virusdeeltjes. Op labschaal is het wel mogelijk om de schade als gevolg van oxidatieve technieken nauwkeuriger vast te stellen, volgens een aangepast protocol, maar deze methode is nog niet verder ontwikkeld voor praktijktoepassingen (Hornstra, BTO 2013.027(s)).

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Natuurlijke virussen NV2247, NV2310 en NV2314 worden in de tot nu toe geteste oppervlaktewateren in een voldoende hoge concentratie aangetroffen om virusverwijdering door zuiveringsprocessen vast te stellen.

Bij de oppervlaktewaterwinningen zijn de virussen meetbaar na alle zuiveringsprocessen, waardoor van elke afzonderlijke stap de virusafname (of toename in geval van De Gavers bassin) kan worden bepaald. De totale verwijderingscapaciteit van een zuivering voor virussen kan daarmee regelmatig en routinematig worden vastgesteld.

Coagulatie, drielaagsfiltratie, LZF, UF en bodempassage zijn de processen die in deze studie zorgen voor een reductie van virussen.

De coagulatie en drielaagsfiltratieprocessen (waar voorafgaand aan de filtratie FeCl_3 wordt toegevoegd) laten in de winterperiode een betere virusverwijdering zien dan in de zomer. Dit is een indicatie dat deze processen in de winter een grotere reductie bewerkstelligen dan in de zomer.

Beide oeverfiltraatwinningen lieten zien dat het water na bodempassage geen van de in het oppervlaktewater aanwezige virussen meer bevatte, waarmee wordt onderstreept dat bodempassage een zeer effectieve stap is (>5 log) in de verwijdering van virussen.

5.2 Aanbevelingen

De huidige metingen geven door de beperkte meetfrequentie slechts een beperkt beeld van de virusverwijdering door verschillende processen, en met name de verschillen door mogelijke seizoensinvloeden. Aanbevolen wordt om met een hogere frequentie een drinkwaterzuivering gedurende langere tijd door te meten om een goed en consistent beeld te krijgen van voorkomen van deze virussen in ruw water en de reductie van virussen door drinkwaterzuiveringsprocessen.

Het beeld van virusverwijdering door coagulatie en door FeCl_3 in combinatie met drielaagsfilters is nog niet eenduidig, en wordt mogelijk veroorzaakt door seizoensinvloeden. Als met natuurlijke virussen nauwkeurig kan worden vastgesteld wanneer (op welk moment) deze processen veel virussen verwijderen, dan kan dat worden meegenomen in de AMVD. Ook kan dan effectief worden onderzocht hoe de coagulatie/sedimentatie en FeCl_3 in combinatie met drielaagsfilters het best kan worden geoptimaliseerd.

Om een goed beeld te krijgen van de verwijdering van specifieke viruspopulaties is het belangrijk om de fysische eigenschappen van de virussen vast te stellen, om zo de relatie tussen de virusmarkers en de ziekteverwekkers te kunnen leggen. Dit kan ook mogelijke verschillen in virusverwijdering van de verschillende virusmarkers verklaren, bijv. na de drielaagsfilters.

De fysische eigenschappen van de virussen moeten worden vastgesteld om voor processen specifieke virusmarkers te kunnen selecteren, bijvoorbeeld op grootte, lading of hydrofobiciteit. Zo kunnen sets van virussen met verschillende grootte worden gekozen om bijvoorbeeld specifiek membranen op basis van size exclusion te monitoren.

Om een relatie te kunnen leggen tussen vaker gebruikte bacteriofagen zoals de “gold standard” MS2, de natuurlijke virussen en de humane ziekteverwekkende virussen, wordt aanbevolen om de verwijdering van deze te bepalen op kleine schaal in een pilot systeem, en deze zo te kunnen vergelijken. Op deze wijze kan worden vastgesteld welke natuurlijke virussen het gedrag van ziekteverwekkende virussen in verschillende zuiveringsprocessen het best beschrijven.

Om ook het effect van oxidatieve processen te kunnen meten, wordt aanbevolen de eerder onder labcondities ontwikkelde methode (Hornstra, BTO2013.027) uit te werken naar een praktijkmethode met natuurlijke virussen. Dan kan naast het effect van de fysische verwijdering ook de effectiviteit van de inactivatie door UV en oxidatieve stappen worden meegenomen.

6 Literatuur

Farkas K, Evelien M. Adriaenssens, David I. Walker. James E. McDonald, Shelagh K. Malham, Davey L. Jones. 2019. Critical Evaluation of CrAssphage as a Molecular Marker for Human Derived Wastewater Contamination in the Aquatic Environment Food and Environmental Virology (2019) 11:113–119

Gall, A.M, Mariñas, B.J, Lu, Y, Shisler, J.L. 2015. Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. PLOS Pathogens | DOI:10.1371/ June25,2015

Jofre, J, Francisco Lucena, Anicet R. Blanch and Maite Muniesa. 2016. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. Water 2016, 8, 199.

Haramoto E. Masaaki Kitajima, Naohiro Kishida, Yoshiaki Konno, Hiroyuki Katayama, Mari Asami, Michihiro Akiba. 2013. Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan. AEM December 2013 Volume 79 Number 23. p7413

Heijnen, L, Anita van der Veen, Luc Hornstra (2018). Nieuwe virussen als procesindicator voor zuiveringsstappen (BTO2018.036)

Hornstra, L. De inactivatie van MS2 door lage druk en midden druk UV. (BTO2013.027)

Hornstra, L. 2016 Nieuwe indicatororganismen om de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen te bepalen (BTO2016.041)

Hornstra, L.M. Tania Rodrigues da Silva, Bastiaan Blankert, Leo Heijnen, Erwin Beerendonk, Emile R. Cornelissen and Gertjan Medema. Monitoring the integrity of reverse osmosis membranes using novel indigenous freshwater viruses and bacteriophages. Environmental Science Water Research & Technology

Kitajima M, Hannah P. Sassi, and Jason R. Torrey. 2018. Pepper mild mottle virus as a water quality indicator npj Clean Water (2018) 19

N. Shirasaki*, T. Matsushita, Y. Matsui, K. Murai. (2017). Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. Water Research Volume 115, 15 May 2017, Pages 29-39

Stachler, E. and Kyle Bibby. 2014. Metagenomic Evaluation of the Highly Abundant Human Gut Bacteriophage CrAssphage for Source Tracking of Human Fecal Pollution. Environ. Sci. Technol. Lett. 2014, 1, 405–409

Werkgroep Infectierisico (WIR). 2019. Richtsnoer Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD). (Nog niet publiek concept rapport RIVM)

WHO (2011) Guidelinesfordrinking-waterquality-4thed. Geneva,Switzerland: WHOPress

