



Virusverwijdering uit oppervlaktewater door coagulatie/sedimentatie en snelle zandfiltratie

BTO 2013.012
Januari 2013

Virusverwijdering uit oppervlaktewater door coagulatie/sedimentatie en snelle zandfiltratie

**BTO 2013.012
Januari 2013**

© 2013 KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Colofon

Titel

Virusverwijdering uit oppervlaktewater door coagulatie/sedimentatie en snelle zandfiltratie

Opdrachtnummer

B111633

Rapportnummer

BTO 2013.12

Onderzoeksprogramma

Microbiologie

Projectmanager

Niels Dammers

Opdrachtgever

Waterleidingbedrijven

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteur

Ronald Italiaander

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Voorwoord

Dit onderzoek is begeleid door de PBC Microbiologie. Yolanda Dullemont en Hein Braam van Waternet worden bedankt voor het faciliteren van het nemen van monsters bij de WRK in Nieuwegein en het aanleveren van chemische analysedata van de monsterpunten. Voor het opwerken van de monsters en de bacteriofaaganalyses wordt Carola Blokker van KWR bedankt.

Samenvatting

Virussen die overdraagbaar zijn via water vormen een belangrijke bedreiging voor de veiligheid van drinkwater. Ten behoeve van de uitvoering van de wettelijke Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD) zijn door de waterbedrijven gegevens verzameld over het voorkomen van virussen in oppervlaktewater dat gebruikt wordt voor de productie van drinkwater. Om te komen tot een betere schatting van de microbiologische veiligheid van drinkwater is het noodzakelijk om meer kennis te genereren over de effectiviteit van drinkwaterzuiveringsprocessen voor het reduceren van de concentratie virussen.

In dit onderzoek is de toepasbaarheid van drie verschillende virustypen, de bacterievirussen somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen en menspathogene adenovirussen type 40/41, voor het bepalen van de effectiviteit van verschillende zuiveringsstappen voor de reductie van virussen vastgesteld. Om deze effectiviteit te bepalen is het noodzakelijk om zeer gevoelige methoden toe te passen. De hemoflow- en centricon-concentratiemethoden zijn gebruikt om uit grote volumes water virussen te concentreren. Somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen zijn vervolgens gedetecteerd met kweekmethoden. Voor de detectie van menspathogene adenovirussen type 40/41 is een kwantitatieve PCR (Q-PCR) techniek gebruikt.

Er zijn metingen uitgevoerd in het ruwe oppervlaktewater uit het Lekkanaal dat gebruikt wordt bij de WRK in Nieuwegein en in het water na de zuivering op deze locatie. Bij de WRK in Nieuwegein wordt het oppervlaktewater voorgezuiverd door middel van coagulatie/sedimentatie en snelle zandfiltratie alvorens het getransporteerd wordt voor verdere zuivering naar het productiebedrijf Leiduin.

Hiernaast is aanvullend onderzoek gedaan naar de invloed van het spoelen van de snelfilters op de effectiviteit van de virusverwijdering.

De analyses van het water voor en na zuivering laten zien dat de concentratie F-specifieke RNA fagen 10x tot 100x lager is dan de concentratie somatische colifagen en adenovirussen type 40/41. Voor alle drie de virustypen geldt dat de concentratie in het ruwe water in de winter hoger is dan in de zomer. Ook na de zuivering zijn de concentraties in de winterperiode het hoogst. De virussen worden met ongeveer één log eenheid verwijderd door de toegepaste zuivering.

Na de concentratiestappen (hemoflow en centricon) is de virusconcentratie afzonderlijk bepaald in het pellet na centrifugatie en het supernatant. Uit de analyses in dit onderzoek is gebleken dat het verschil in concentratie F-specifieke fagen en somatische colifagen tussen het pellet en het supernatant dermate groot is dat analyse van het supernatant volstaat, om de concentratie in het geconcentreerde monster voor- en na zuivering nauwkeurig te bepalen. Voor de adenovirussen type 40/41 geldt dit alleen voor het monster na zuivering. In het monster voor zuivering hebben beide fracties een substantieel aandeel in de concentratie adenovirussen type 40/41. Dit geeft aan dat fagen anders in water voorkomen dan adenovirussen. Waarschijnlijk speelt binding van adenovirussen aan deeltjes een belangrijke rol bij het grote aantal adenovirussen dat na centrifugatie in het pellet terecht komt.

In het aanvullend onderzoek zijn geen aanwijzingen gevonden voor een verminderde virusverwijdering in bepaalde fasen van een snelfilter tussen beide spoelingen.

De (fysische) verwijdering van virussen door coagulatie- en filtratieprocessen is goed vast te stellen met de kweekmethode voor somatische colifagen en de Q-PCR methode voor

adenovirussen. De combinatie van deze twee methoden heeft het ook mogelijk gemaakt de verwijdering van de somatische colifagen als indicator voor verwijdering van humane virussen te vergelijken met die van humane adenovirussen. De concentratie van beide virustypen in het Lekkanaal waren hoog en lagen in dezelfde ordegrootte. Voor het vaststellen van de verwijdering door de zuivering leverde de kweekmethode met colifagen een gevoeligere methode (ca 100x). Dit ligt vooral aan het beperkte volume dat voor de Q-PCR in behandeling kan worden genomen.

De gemeten verlaging van de concentratie lag voor zowel adenovirussen als voor somatische colifagen op 0,7 log voor de niet-gebonden virusdeeltjes. Gebonden virusdeeltjes werden beter verwijderd, respectievelijk >2,0 en 1,7 log. Uit de metingen is duidelijk geworden dat adenovirussen veel meer dan de colifagen aan deeltjes gehecht voorkomen. Dat maakt in deze situatie de colifagen een conservatieve indicator voor het bepalen van de verwijdering van adenovirussen.

Voor onderzoek aan de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen is een combinatie van somatische colifagen en adenovirussen gewenst, maar moet wel rekening gehouden worden met het verschil in gevoeligheid. Bij grotere mate van verwijdering zijn, bij de huidige gevoeligheid, alleen de somatische colifagen bruikbaar.

Inhoud

Voorwoord	1
Samenvatting	3
Inhoud	5
1 Inleiding	7
2 Methoden	11
2.1 Monsterpunten	11
2.2 Monsterconcentratie	11
2.3 Bepaling van colifagen	12
2.3.1 Bepaling van somatische colifagen	13
2.3.2 Bepaling van F-specifieke (RNA-)colifagen	13
2.4 Extractie van DNA en Q-PCR voor adenovirussen	13
2.4.1 Extractie van DNA	13
2.4.2 Q-PCR voor adenovirussen	14
3 Resultaten	15
3.1 Rendementen van de concentratiemethoden en de Q-PCR	15
3.2 Concentraties F-specifieke RNA-fagen, somatische colifagen en adenovirussen	16
3.3 Relatie troebelingsgraad, temperatuur en virusconcentratie	18
3.4 Virus in pellet en supernatant	20
3.5 Invloed spoelen op effectiviteit snelle zandfilter	24
4 Discussie, conclusies en aanbevelingen	29
4.1 Rendement van de concentratiemethoden	29
4.2 Virussen in het pellet na centrifugatie	29
4.3 Virusconcentraties in het oppervlaktewater en na de zuivering	30
4.3.1 F-specifieke RNA fagen	30
4.3.2 Somatische colifagen	31
4.3.3 Adenovirussen	31
4.4 Invloed spoelen op effectiviteit snelle zandfilter	31
4.5 Verwijdering virussen door coagulatie/snelfiltratie	31
4.6 Toepasbaarheid virusmethoden voor verwijdering in de zuivering	32
5 Literatuur	33
6 Bijlagen	35

1 Inleiding

Via water overdraagbare virussen vormen een belangrijke bedreiging voor de veiligheid van drinkwater. Er ontstaan steeds nieuwe virussen, vanwege de grote genetisch variatie, die zich in hoog tempo over de wereld kunnen verspreiden. Door het kleine formaat van veel virussen (20-80 nm) zijn de in de zuivering toegepaste fysisch chemische verwijderingsmethoden, zoals filtratie en passage door de bodem, minder goed in staat om virussen te verwijderen. Virussen die ziekte kunnen veroorzaken bij mensen worden in grote aantallen door geïnfecteerde personen uitgescheiden. Deze virussen komen in het rioolwater en worden maar zeer beperkt verwijderd in rioolwaterzuiveringsinstallaties. Vandaar dat het oppervlaktewater wordt belast met een scala aan virussen (de Roda Husman et al., 2005, de Roda Husman et al., 2006, Taylor et al., 2001) en dat hoge concentraties in oppervlaktewater worden gevonden die bij de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater verwijderd moeten worden.

Ten behoeve van de uitvoering van de wettelijke Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD), zoals vastgelegd in de Inspectierichtlijn (Anoniem, 2005) zijn door de waterbedrijven gegevens verzameld over het voorkomen van virussen in oppervlaktewater dat gebruikt wordt voor de productie van drinkwater. Deze virussen worden gebruikt als indicator voor de aanwezigheid van virussen van fecale oorsprong. Daarnaast is voor de AMVD kwantitatieve informatie nodig over de effectiviteit van de zuiveringprocessen voor de reductie van de concentratie virussen. Echter, de kennis over de effectiviteit van de verschillende processtappen voor de reductie van de concentratie virussen uit oppervlaktewater is beperkt. Veel van de kennis is gebaseerd op experimenten waarbij op laboratorium- en proefinstallatieschaal de individuele zuiveringsstappen zijn nagebootst en de verwijdering van verschillende virussen is bestudeerd (Medema and Theunissen, 1996, Schijven, 2001). Er is slechts weinig onderzoek gedaan naar de effectiviteit van deze zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie virussen in operationele zuiveringen. In de jaren 80 zijn enige gegevens verzameld over de verwijdering van enterovirussen in verschillende zuiveringen (van Olphen et al., 1984) maar het bleek dat de concentraties te laag zijn om de effectiviteit van de zuiveringsstappen betrouwbaar te bepalen. Uitgebreider onderzoek naar de concentraties enterovirussen in ruw oppervlaktewater met celkweek (de Roda Husman et al., 2005, Theunissen et al., 1998) toonde aan dat de concentraties van deze enterovirussen in het oppervlaktewater bij de innamepunten van de waterbedrijven laag zijn (0,4 - 3 PVE/l). Ze zijn daarom minder geschikt om de effectiviteit van zuiveringsstappen voor de reductie van de concentratie virussen te kunnen meten.

Om te komen tot een betere schatting van de microbiologische veiligheid van drinkwater is het noodzakelijk om meer kennis te genereren over de effectiviteit van drinkwaterzuiveringsprocessen voor het reduceren van de concentratie virussen (Heijnen, 2011).

Doel van dit onderzoek was het vaststellen van de toepasbaarheid van drie verschillende virustypen voor het bepalen van de effectiviteit van verschillende zuiveringsstappen bij de drinkwaterbereiding: somatische colifagen, F-specifieke RNA fagen en adenovirussen 40/41.

In het kader van de AMVD worden momenteel metingen van bacterievirussen (F-specifieke RNA fagen en somatische colifagen) gebruikt voor het vaststellen van de effectiviteit van zuiveringsprocessen voor de reductie van de concentratie virussen. De resultaten die worden verkregen met deze bacterievirussen zijn variabel en er is behoefte om de resultaten te valideren door de resultaten te vergelijken met de resultaten die worden verkregen met

menspathogene virussen. Bovendien hebben experimenten op laboratoriumschaal aangetoond dat er verschillen zijn in de effectiviteit van zuiveringsstappen voor het reduceren van virusconcentraties die behoren tot verschillende typen (Abbaszadegan et al., 2007, Abbaszadegan et al., 2008). Het is dus mogelijk dat de effectiviteit van zuiveringsstappen voor het reduceren van fagen niet in alle situaties vergelijkbaar is met de effectiviteit voor het reduceren van de menspathogene virussen.

Voor deze validatie is gekozen voor het meten van humane adenovirussen vanwege de hoge concentraties die in andere onderzoeken zijn aangetoond in oppervlaktewater (Albinana-Gimenez et al., 2009a, Albinana-Gimenez et al., 2009b). Ook zijn adenovirussen zeer resistent tegen UV-desinfectie (Heijnen, 2011) en zijn kwantitatieve methoden beschikbaar. Voor kwantitatieve detectie van het DNA van adenovirus 40/41 wordt een Q-PCR methode gebruikt waarmee een kenmerkend DNA fragment van adenovirus 40/41 wordt vermenigvuldigd met een polymerase kettingreactie (PCR) en gedetecteerd tijdens de PCR-reactie (real-time) door gebruik te maken van synthetische, fluorescente DNA-probes. Doordat er een verband is tussen de DNA-concentratie aan het begin van de PCR-reactie en het tijdstip waarop een detecteerbaar signaal wordt gevormd door de PCR-reactie is met deze methode kwantificatie van het adenovirus-DNA en daarmee ook adenovirusdeeltjes mogelijk. Deze Q-PCR methode is bij KWR ontwikkeld in het BTO onderzoek van 2006-2007. Zeer recent is ook het gebruik van adenovirussen voor het meten van de effectiviteit van de zuivering beschreven (Albinana-Gimenez et al., 2009a).

Het gebruik van somatische colifagen voor het monitoren van de effectiviteit van zuiveringsprocessen is eerder beschreven (Payment, 1991, Payment and Franco, 1993). Voor het aantonen van somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen worden standaard kweekmethoden toegepast waarmee infectieuze virusdeeltjes worden aangetoond.

Om het mogelijk te maken om nog virussen te meten na zuiveringsstappen is het noodzakelijk om zeer gevoelige methoden te gebruiken. Voor een hoge gevoeligheid is het noodzakelijk om grote volumes water te kunnen onderzoeken, hiervoor worden goede concentreringsmethoden toegepast waarmee het mogelijk is om de virussen, met hoge opbrengst, uit grote volumes te concentreren. Daarom is in dit onderzoek de hemoflow ultra-filtratie-methode (Veenendaal, 2007) gebruikt om een groot volume monster (ca. 60 l) sterk te concentreren tot een veel kleiner volume (ca. 0,5 l) en zijn vervolgens de deeltjes in dit concentraat nog verder geconcentreerd, tot een volume van ca. 15 ml, door toepassing van een centricon-ultrafiltratie methode (Veenendaal, 2007). Van deze concentratiemethoden is aangetoond dat bacteriofagen, bacteriën en protozoa met een hoge opbrengst, eenvoudig met een factor 1000 tot 10.000 geconcentreerd kunnen worden (Veenendaal, 2007).

Eerder onderzoek (Heijnen, 2011), naar de virusverwijdering bij productielocaties van drinkwater waar oppervlaktewater gebruikt wordt, toont aan dat de zuivering bij de WRK in Nieuwegein een zeer geschikte locatie is om dit onderzoek uit te voeren. Uit dit onderzoek en uit eerdere ervaringen blijkt dat de concentratie somatische colifagen in ieder geval voldoende hoog is om direct in het Lekkanaal en in het concentreerde monster voor en na de zuivering te kunnen meten. Daarnaast zijn er in het onderzoek van Heijnen in 2011 ook adenovirussen 40/41 gemeten in het ruwe en gezuiverde water. Bij de WRK in Nieuwegein wordt het oppervlaktewater voorgezuiverd door middel van coagulatie/sedimentatie en snelle zandfiltratie. Vervolgens wordt het water getransporteerd naar de Amsterdamse waterleidingduinen waar het door duinpassage en door zuiveringsstapen bij het productiebedrijf Leiduin verder gezuiverd wordt.

Het primaire doel van dit onderzoek is om de virusverwijdering uit het oppervlaktewater door coagulatie/sedimentatie en snelle zandfiltratie vast te stellen. Secundair doel is de toepasbaarheid van de somatische colifagen (met de kweekmethode) en adenovirus 40/41 (met de qPCR methode) om de virusverwijdering vast te stellen te beschrijven en tegelijk te bepalen of de mate van verwijdering voor beide virustypen vergelijkbaar is. Daarnaast is er aanvullend onderzoek gedaan naar de invloed van het spoelen van de snelfilters op de effectiviteit van de virusverwijdering.

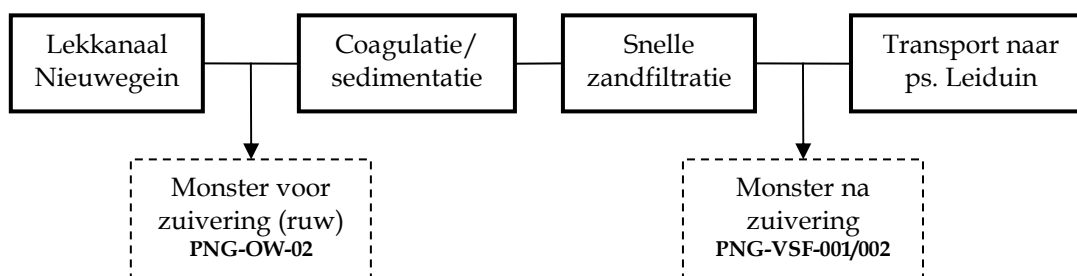
Snelle zandfilters bestaan uit grover en gelijkmatiger filtermateriaal dan de langzame zandfilters. Hierdoor kan het (ruwe) water er met een grotere snelheid doorheen. Doordat de poriegrootte van de snelle zandfilters groter is komt de vervuiling dieper in het zandbed. Na verloop van tijd raken de filters verstopt en moeten ze, na één tot enkele dagen filtratie, schoongemaakt worden. Doordat het vuil zo diep het zandbed in gaat moet ook het gehele filterbed schoongemaakt worden. Dit wordt gedaan door middel van spoeling. Water wordt met een grote snelheid in de omgekeerde richting door het zandbed gespoeld en hierdoor wordt de verontreiniging losgemaakt en met het spoelwater afgevoerd. Doel van het aanvullende onderzoek is om het effect te bepalen van spoelen van snelle zandfilters op de virusverwijdering aan de hand van somatische colifagen, F-specifieke fagen en adenovirus type 40/41.

Om deze onderzoeksvragen te beantwoorden zijn de concentrerings- en analysemethoden van augustus 2011 tot en met augustus 2012 periodiek toegepast bij de WRK in Nieuwegein. De methoden zijn toegepast om te onderzoeken in welke concentraties en hoedanigheid de verschillende virussen voorkomen in ruw water en na filtratie, hoe effectief de zuivering bij de WRK Nieuwegein de verschillende virussen verwijdert en wat de invloed is van het spoelen van het snelfilter op de virusverwijdering.

2 Methoden

2.1 Monsterpunten

Voor dit onderzoek is, van augustus 2011 tot en met augustus 2012, bij de WRK in Nieuwegein onderzoek gedaan naar de concentratie van somatische-, F-specifieke colifagen en adenovirussen in het ingenomen oppervlaktewater en na snelle zandfiltratie. Daar te verwachten is dat de concentratie van somatische-, F-specifieke colifagen en adenovirussen in de wintermaanden hoger is, zijn in de maanden november 2011 tot en met april 2012 eens per twee weken monsters genomen. Tijdens de overige maanden is dit eens per vier weken gebeurd. Figuur 1 geeft een schematisch overzicht van de voorzuivering van het ruwe water bij de WRK te Nieuwegein en de monsterpunten. Het effect van het spoelen van de snelle zandfilters is bepaald in week 9 (27 februari tot en met 2 maart 2012), door in deze periode tussen twee spoelingen in het effluent van één snelfilter tien metingen uit te voeren.

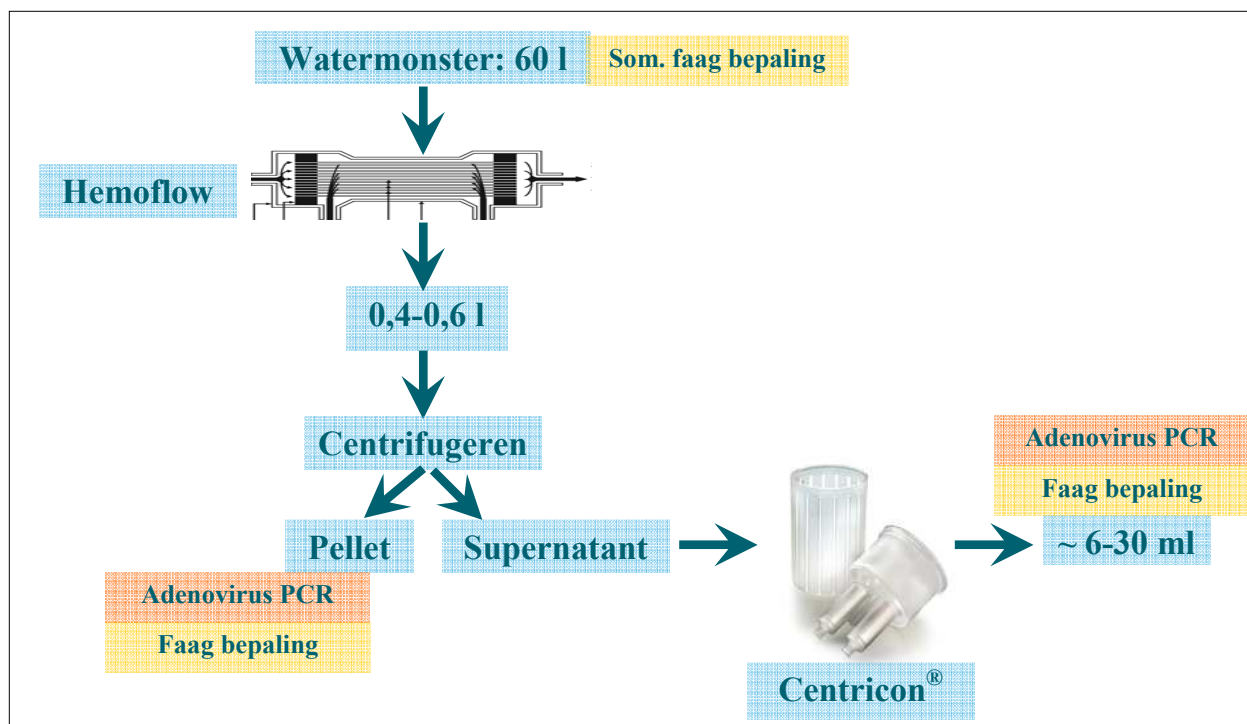


Figuur 1. Schematisch overzicht van de voorzuivering van het ruwe water bij de WRK te Nieuwegein en de monsterpunten.

2.2 Monsterconcentratie

Om de lage concentraties somatische-, F-specifieke colifagen en adenovirussen na zuiveringstappen te kunnen meten is een lage detectiegrens van belang. Daarom worden de virussen uit de watermonsters eerst geconcentreerd. Een schematisch overzicht van de verschillende stappen die zijn toegepast bij het concentreren van de monsters is weergegeven in figuur 2. Voor het concentreren is gebruik gemaakt van de eerder ontwikkelde hemoflow methode (Veenendaal, 2007). Bij deze hemoflow methode wordt cross-flow ultrafiltratie gebruikt om deeltjes, waaronder de virusdeeltjes, uit het water te concentreren. Een monstervolume van ca. 60 l is in een eerste concentratiestap m.b.v. het Hemoflow polysulfone® filter (Fresenius) teruggebracht tot een volume van ca. 0,5 l. Om grotere deeltjes uit het geconcentreerde monster te verwijderen zijn de troebele monsters gecentrifugeerd. Daardoor komen de grotere deeltjes in het pellet terecht en wordt verdergegaan met het supernatant van de centrifugestap. De toegepaste snelheid van centrifugatie is bij deze stap te gering om vrije (niet aan deeltjes gebonden) virusdeeltjes te peletteren, vrije virusdeeltjes blijven dus in het supernatant. In dit stadium van het onderzoek is zowel het pellet als het supernatant geanalyseerd op virussen om te onderzoeken of na centrifugatie virusdeeltjes toch in het pellet terecht komen doordat ze gebonden zijn aan deeltjes of in aggregaten voorkomen. De virusdeeltjes uit het supernatant zijn verder geconcentreerd door gebruik te maken van een Centricon® filter (Millipore). Deze Centricon® filters zijn voorzien van een ultrafiltratie

membraan dat in staat is om o.a. de virusdeeltjes tegen te houden. Water en andere kleine moleculen worden middels centrifugatie door het membraan heengedraaid. Aansluitend wordt het filter omgekeerd en opnieuw gecentrifugeerd. Het water dat in het membraan is achtergebleven wordt door de centrifugatiekracht het filter uitgedraaid en neemt daarbij de deeltjes (waaronder de virusdeeltjes) mee. De Centricon® concentratiemethode zorgt ervoor dat het volume dat na de hemoflow is overgebleven (ca. 0,5 l) verder kan worden geconcentreerd tot een volume van ca. 6 ml zonder dat daarbij grote verliezen optreden (Veenendaal, 2007).



Figuur 2: Schematisch overzicht van de monsterconcentratie stappen en de fracties die zijn gebruik voor de analyses

In figuur 2 is aangegeven welke analyses op welke fracties van de monsters zijn uitgevoerd. Het pellet verkregen na centrifugatie van het Hemoflowconcentraat en het supernatant na concentratie met Centricon® worden geanalyseerd op de aanwezigheid van somatische en F-specifieke fagen en adenovirussen.

Het rendement van de methode kan worden bepaald door de gevonden concentratie te vergelijken met de directe methode (zonder concentratiestappen). Zoals in eerder uitgevoerd onderzoek is gebleken (Heijnen, 2011) is de concentratie F-specifieke fagen en adenovirussen niet hoog genoeg om direct, zonder concentratiestap, bepaald te worden. Hierom wordt het rendement van de methode bepaald door de concentratie somatische fagen in het onbehandelde watermonster te bepalen en te vergelijken met de gemeten concentratie somatische fagen na Hemoflow en Centricon.

2.3 Bepaling van colifagen

Colifagen zijn virussen die in staat zijn om de bacteriesoort *Escherichia coli* (*E. coli*) (en verwante bacteriën) te infecteren. De bepaling van fagen wordt uitgevoerd door een mengsel te maken van het monster met vers gekweekte *E. coli* gastheercellen en agar. Dit mengsel wordt uitgetogen in een petrischaal die, nadat de agar gestold is, wordt geïncubeerd. Tijdens de

incubatie zullen de aanwezige colifagen de *E. coli* cellen infecteren. Op de plaats van een geïnfecteerde *E. coli* cel zal een heldere zone (plaque) ontstaan in het bacteriedek doordat de fagen zich vermeerderen in de *E. coli* cellen en daarbij lysis van de *E. coli* cellen veroorzaken. Door de ontstane plaques te tellen kan de concentratie infectieuze faagdeeltjes in het monster bepaald worden. Deze concentratie wordt uitgedrukt in plaque vormende eenheden (PVE) per liter.

2.3.1 Bepaling van somatische colifagen

Infectie van somatische colifagen vindt plaats door binding van het virus aan de celwand van *E. coli*, het virus dringt vervolgens de *E. coli* cel binnen en zal zich daar vermeerderen. De bepaling van somatische colifagen heeft plaats gevonden door gebruik te maken de ISO standaardmethode ISO 10705-2 waarbij de *E. coli* stam WG5 als gastheer is gebruikt (Anonymous, 2000) en de somatische colifaag Φ X174 als positieve controle.

2.3.2 Bepaling van F-specifieke (RNA-)colifagen

F-specifieke (RNA-)fagen zijn fagen die RNA als genetisch materiaal hebben en gebruik maken van de F-pili om de bacteriecel binnen te dringen en een infectie te veroorzaken. De bepaling van F-specifieke colifagen is uitgevoerd volgens standaardmethode ISO 10705-1, waarbij *Salmonella typhimurium* (WG49) als gastheer is gebruikt (Anonymous, 1995, Havelaar et al., 1993, Mooijman et al., 2002) en de F-specifieke RNA-colifaag MS2 als positieve controle. In deze *Salmonella* stam is een plasmide aangebracht met hierop de genetische informatie voor F-pili van *E. coli*. De incubatie van de geïnfecteerde WG49 cellen in de agar wordt uitgevoerd in aanwezigheid van RNase (enzym dat RNA afbreekt) aan de agar. F-specifieke fagen die RNA als genetisch materiaal hebben zullen zich niet vermeerderen in aanwezigheid van RNase. Het verschil tussen de aantallen fagen die gevonden worden in afwezigheid van RNase (DNA- en RNA-fagen) en de aantallen in aanwezigheid van RNase (DNA-fagen) geeft het aantal F-specifieke RNA-fagen weer.

2.4 Extractie van DNA en Q-PCR voor adenovirussen

2.4.1 Extractie van DNA

Voor de analyse van watermonsters, die zijn verkregen door concentratie van een groot volume water, is het toepassen van een extractiemethode, waarmee DNA kan worden geëxtraheerd met hoge opbrengst en hoge zuiverheid van groot belang. Daarom is voor dit onderzoek gekozen voor het gebruik van de "PowerBiofilm DNA Isolation Kit" (MoBio). Een vergelijkend onderzoek naar verschillende DNA extractie methoden (Italiaander, 2011) wijst uit dat de "PowerBiofilm DNA Isolation Kit" met een hoge opbrengst DNA extraheert uit onder andere geconcentreerde oppervlaktewater monsters. Er is daarbij ook aangetoond dat het DNA dat met deze methode wordt geëxtraheerd slechts weinig stoffen bevat die remming van het, bij PCR gebruikte, Taq-polymerase enzym kunnen veroorzaken waardoor slechts zeer weinig vals-negatieve reacties ten gevolge van geremde PCR-reacties optreden.

Bij deze methode wordt 300 μ l van ieder monster (zowel van het pellet na centrifugatie als van het concentraat na Centricon®) in een buisje met glaspereels, een "Bead Tube", en lysis buffer gebracht. Dit mengsel wordt zeer krachtig geschud (bead-beaten) waardoor de deeltjes in het monster worden gehomogeniseerd en de celwanden en/of celmembranen van de organismen (protozoa, bacteriën) of het kapsel (virussen) door een combinatie van fysische kracht en

chemische inwerking van de lysis buffer worden kapot gemaakt. Door dit proces wordt (o.a.) het DNA uit de virussen vrijgemaakt. Nadat contaminerende organische en anorganische stoffen zijn geprecipiteerd en verwijderd wordt het DNA uit het lysaat gezuiverd door het DNA in de suspensie op basis van lading te laten binden aan het silica-membraan in een zogenoemd spin-filter. Het aan het silica-membraan gebonden DNA wordt een aantal malen “gewassen” waarna een gezuiverd DNA-preparaat aan de silica deeltjes gebonden blijft. Ten slotte wordt het DNA van het silica-membraan losgemaakt door te elueren met een buffer met een andere zoutsterkte en pH waardoor de lading van de DNA-moleculen veranderd en deze loslaten van het silica-membraan. Hierna is er een gezuiverde DNA suspensie (met een volume van 100 µl) verkregen die bruikbaar is voor PCR-analyses. Van deze DNA suspensie wordt 10 µl gebruikt in één PCR reactie.

2.4.2 Q-PCR voor adenovirussen

▪ *De adenovirus Q-PCR methode*

Met de Q-PCR techniek is het mogelijk om een kenmerkend fragment van het DNA van het te detecteren virus in korte tijd tot grote hoeveelheden te vermenigvuldigen en te kwantificeren. Voor deze vermenigvuldiging worden korte synthetische DNA moleculen (primers) gebruikt. De samenstelling (DNA-sequentie) van deze primers is zodanig gekozen dat deze primers slechts binden aan het DNA van adenovirus type 40 en 41. Na binding van de primers aan het adenovirus-DNA, wordt een enzymatische kettingreactie in gang gezet die verloopt onder invloed van wisseling van temperatuur. Bij Q-PCR wordt de vorming van het vermenigvuldigde DNA fragment al tijdens de PCR reactie gemeten (Real-Time) door gebruik te maken van lichtgevend synthetische DNA-moleculen (probes) die pas licht gaan geven indien het PCR fragment gevormd wordt. Doordat er een relatie is tussen het tijdstip waarop detectie van het gevormde fragment mogelijk is (CT-waarde) en de concentratie van het DNA fragment aan het begin van de reactie is met deze techniek ook kwantificatie mogelijk. Verdunningen van een DNA suspensie met bekende hoeveelheden van een plasmide waarin het PCR-fragment van adenovirus type 41 gekloneerd is, zijn gebruikt voor het genereren van een ijklijn.

Voor detectie van adenovirussen wordt een Q-PCR methode gebruikt waarmee een deel van het fiber gen wordt geamplificeerd. Een eerder beschreven methode (Jothikumar et al., 2005) heeft de basis gevormd voor de ontwikkeling van deze nieuwe methode in het BTO programma van 2006-2007. Met deze PCR methode worden alleen de humaan pathogene typen (serotype 40 en 41) gedetecteerd, deze adenovirus-typen zijn in staat om gastro-enteritis te veroorzaken.

De primers die gebruikt worden bij deze methode hebben de volgende DNA-sequentie:

- JTVFFb: CTTTCTCTCTT(A/C)ATAGACGCCC
- JTVFRb: GAGGGGGCTA(G/C)AAAACAAAA

De probe die gebruikt wordt om real-time detectie mogelijk te maken heeft de volgende DNA-sequentie:

- JTVpr: FAM5'-CGGGCACTCTTCGCCTTCAAAGTGC-3'BHQ-1

Van alle monsters is in duplo de adenovirus concentratie bepaald.

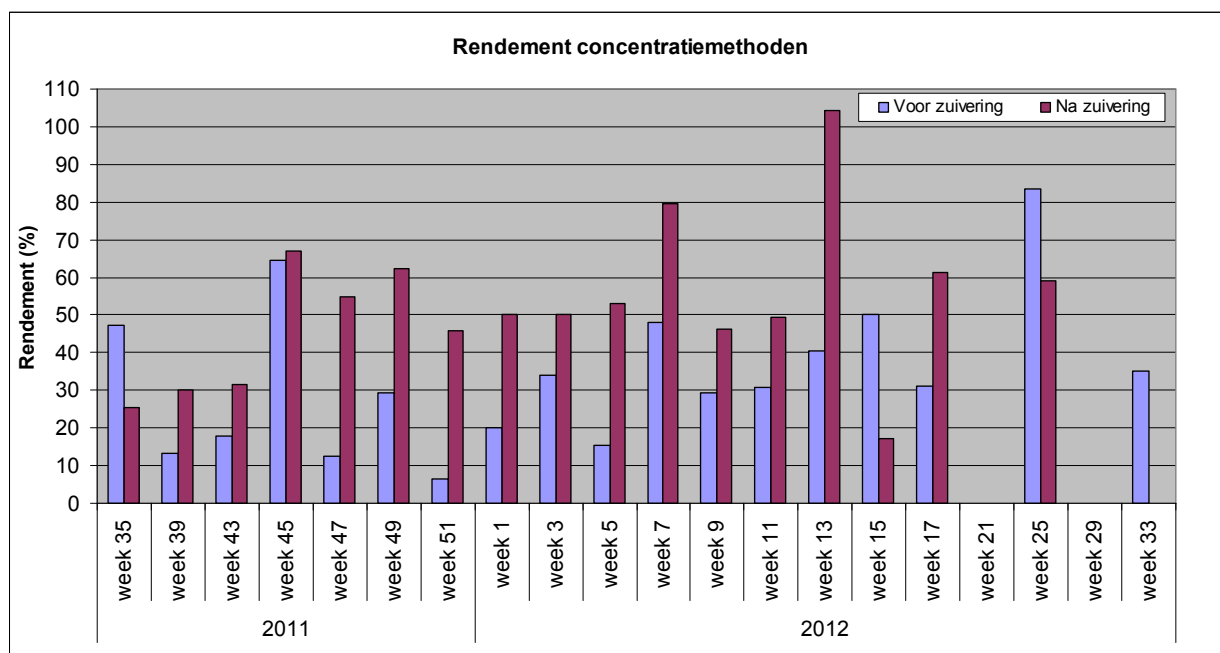
3 Resultaten

3.1 Rendementen van de concentratiemethoden en de Q-PCR

▪ Hemoflow en Centricon®

In dit onderzoek zijn de rendementen, aan de hand van concentraties somatische colifagen, van de concentratiestappen onderzocht. Dit was mogelijk bij monsters waarbij zowel voor- als na de concentratiestappen somatische colifagen gedetecteerd werden. Uit eerder onderzoek (Heijnen, 2011) en uit ervaring is gebleken dat de concentratie somatische colifagen in het Lekkanaal voldoende hoog is om de rendementen van de concentratiestappen voor- en na zuivering bij de WRK Nieuwegein te bepalen. Van de concentratie F-specifieke RNA-fagen en adenovirus type 40/41 viel te verwachten dat deze niet hoog genoeg zijn (Heijnen, 2011). Hierom is besloten om het rendement van de methode te bepalen aan de hand van de somatische colifagen. De resultaten van alle virusanalyses zijn gecorrigeerd met de rendementen van de concentratiestappen die bepaald zijn met de concentraties somatische colifagen (figuur 3).

Het rendement is bepaald door de opbrengsten te vergelijken van wat er direct, zonder concentratiestappen, en na hemoflow- en centriconfilters is aangetoond. De concentraties die gevonden zijn in de fracties “pellet” en “supernatant na centricon” zijn bij elkaar opgeteld en gebruikt als gedetecteerde concentratie na de concentratiestappen.



Figuur 3: De rendementen van de concentratiestappen, bepaald met de concentratie somatische colifagen, voor de onderzochte monsters (zowel voor- als na de zuivering) tijdens dit onderzoek.

Week 17: Het rendement van de concentratiemethode na de zuivering is niet te bepalen omdat er in het directe monster geen somatische colifagen zijn gedetecteerd. Uitgaande van 1 gedetecteerde somatische colifaag is het rendement minimaal 61,2%. Dit rendement is gebruikt in het onderzoek.

Week 21: Er zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.

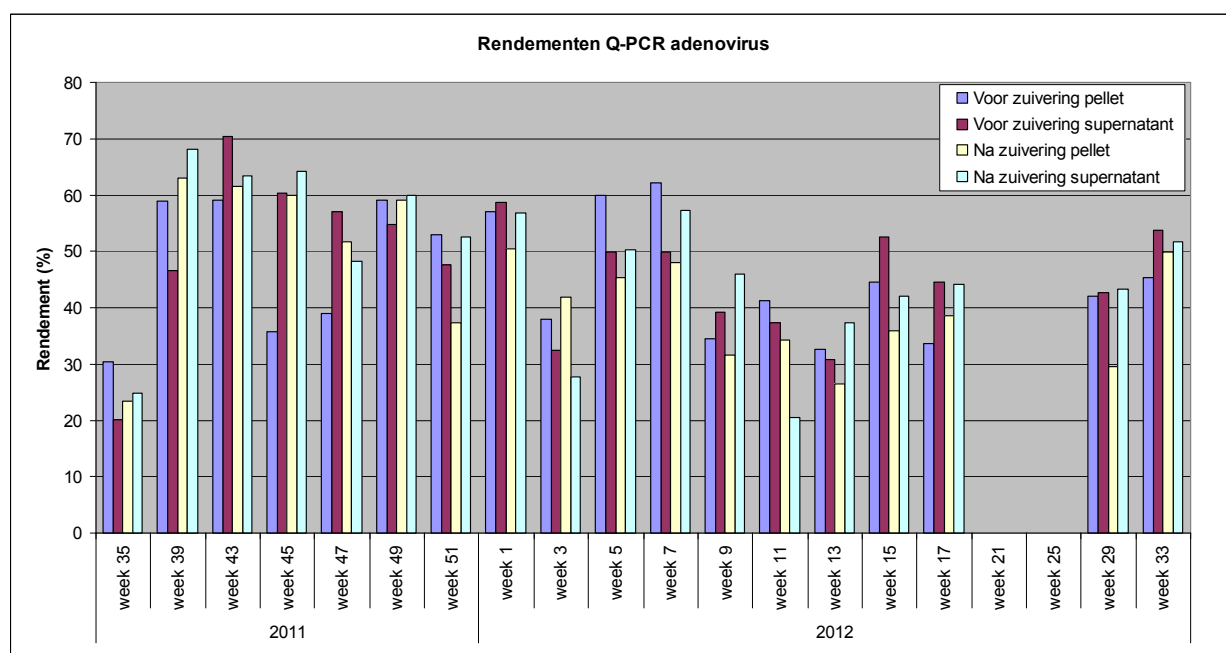
Week 29: Het rendement is niet te bepalen want de concentratie somatische colifagen in de directe monsters is niet bepaald. De gemiddelde rendementen van voor- (33,9%) en na zuivering (52,2%) zijn gebruikt in dit onderzoek.

Week 33: Er zijn geen somatische colifagen aangetoond in het geconcentreerde monster na zuivering. Hierdoor is het rendement niet te bepalen en is het gemiddelde rendement na zuivering (52,2%) in dit onderzoek gebruikt.

In deze studie was de gemiddelde opbrengst voor het concentreren van de monsters voor de zuivering 33,9% (range: 6,6-83,6%) en na de zuivering 52,2% (range: 17,4-104,4%).

▪ Q-PCR adenovirus type 40/41

Tijdens de extractie van het DNA uit de geconcentreerde watermonsters is aan de lysisbuffer bij elk monster een “gestandaardiseerd” DNA fragment toegevoegd (interne controle, IC). Dit toegevoegde fragment kan middels Q-PCR gelijktijdig met de adenovirus Q-PCR analyses worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Analyse van deze interne controle geeft inzicht in de opbrengst van de DNA-extractie procedure en de mogelijke aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen. De opbrengst van het IC-DNA wordt middels Q-PCR gemeten en deze opbrengst wordt vervolgens gebruikt om de adenovirus metingen te corrigeren (voor opbrengst en remming). De rendementen van de Q-PCR staan weergegeven in figuur 4.



Figuur 4: De rendementen van de verschillende fracties van de monsters voor- en na zuivering van de adenovirus type 40/41 Q-PCR.

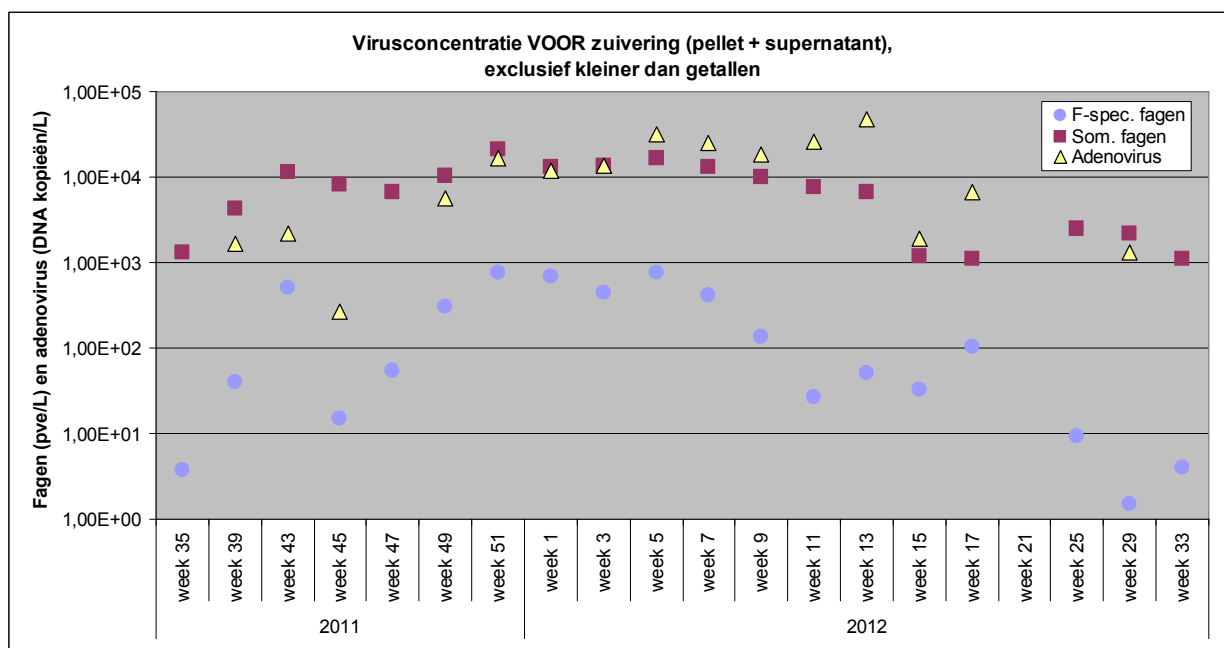
Week 21: Er zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.

Week 25: Er zijn geen analyses gedaan omdat er geen deel van de fracties opzij gezet is voor de Q-PCR.

Het gemiddelde rendement van de geanalyseerde monsters met Q-PCR bedraagt 46,1% (range: 20,1-70,4%). Dit betekent dat alle monsters boven het in het LMB voorschrift (LMB-065; Onderzoek naar micro-organismen in watermonsters met behulp van Q-PCR en een specifieke probe) vastgestelde minimum percentage (20%) scoren en de gedetecteerde concentraties met Q-PCR gecorrigeerd zijn voor het rendement.

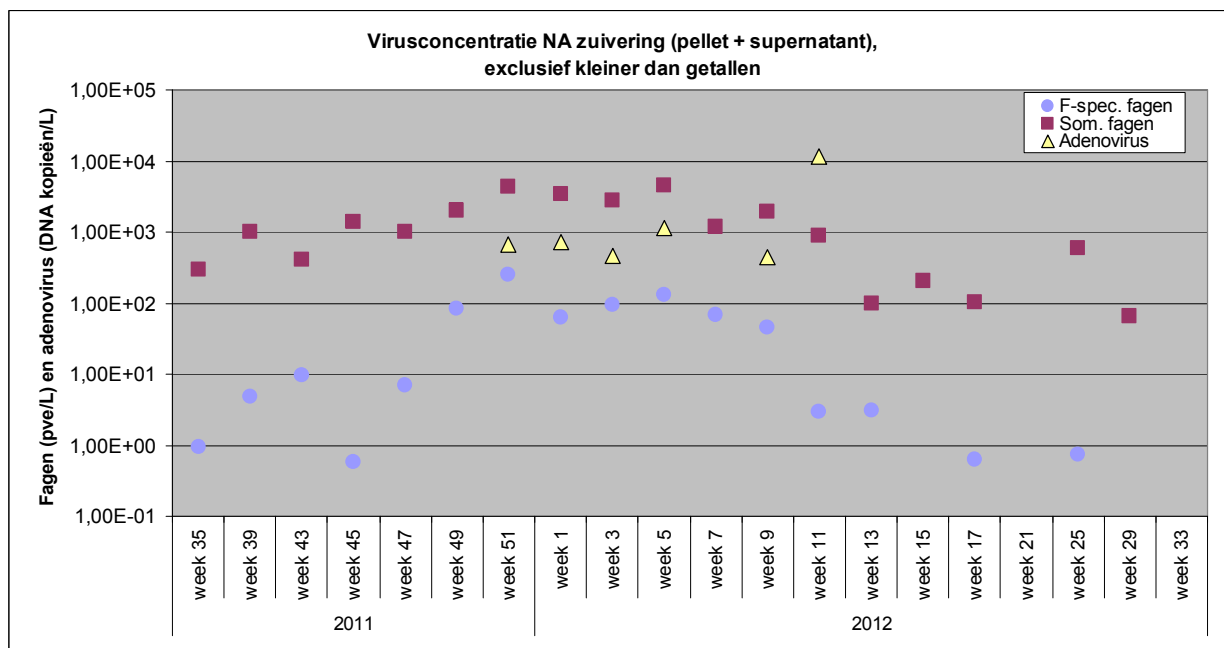
3.2 Concentraties F-specifieke RNA-fagen, somatische colifagen en adenovirussen

De concentraties F-specifieke RNA-fagen, somatische colifagen en adenovirus type 40/41 zijn bepaald in dit onderzoek gedurende een jaar (augustus 2011-augustus 2012). De totale concentraties, de concentratie in het pellet en in het supernatant na centrifugeren, van deze virussen zijn weergegeven in figuur 5 en 6.



Figuur 5: De totale (pellet en supernatant na centricon) virusconcentratie in het water voor de zuivering (Lekkanaalwater).

In week 21 zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.



Figuur 6: De totale (pellet en supernatant na centricon) virusconcentratie in het water na de zuivering voor transport naar pompstation Leiduin.

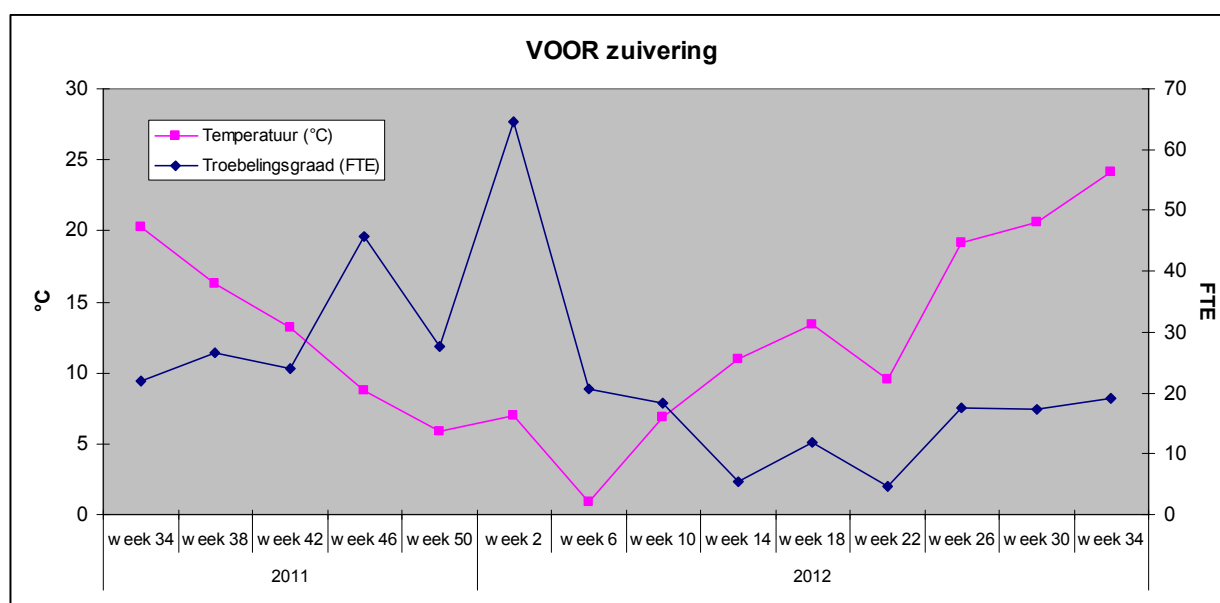
In week 21 zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.

Figuur 5 en 6 maken duidelijk dat de concentraties infectieuze F-specifieke RNA fagen duidelijk lager zijn dan de concentraties infectieuze somatische colifagen en adenovirus. Daarnaast blijkt dat de concentraties van de fagen en adenovirussen in de wintermaanden ongeveer een log-eenheid hoger zijn dan in de zomermaanden. Deze trend is zowel voor- als na de zuivering waar te nemen. De concentraties somatische colifagen ($\pm 1 \times 10^4$ pve/L in de winter en $\pm 2 \times 10^3$ pve/L in de zomer), F-specifieke RNA-fagen ($\pm 1 \times 10^2$ - 1×10^3 pve/L in de winter en $\pm 1 \times 10^0$ - 1×10^2 pve/L in de zomer) en adenovirussen ($\pm 1 \times 10^4$ DNA kopieën/L in de

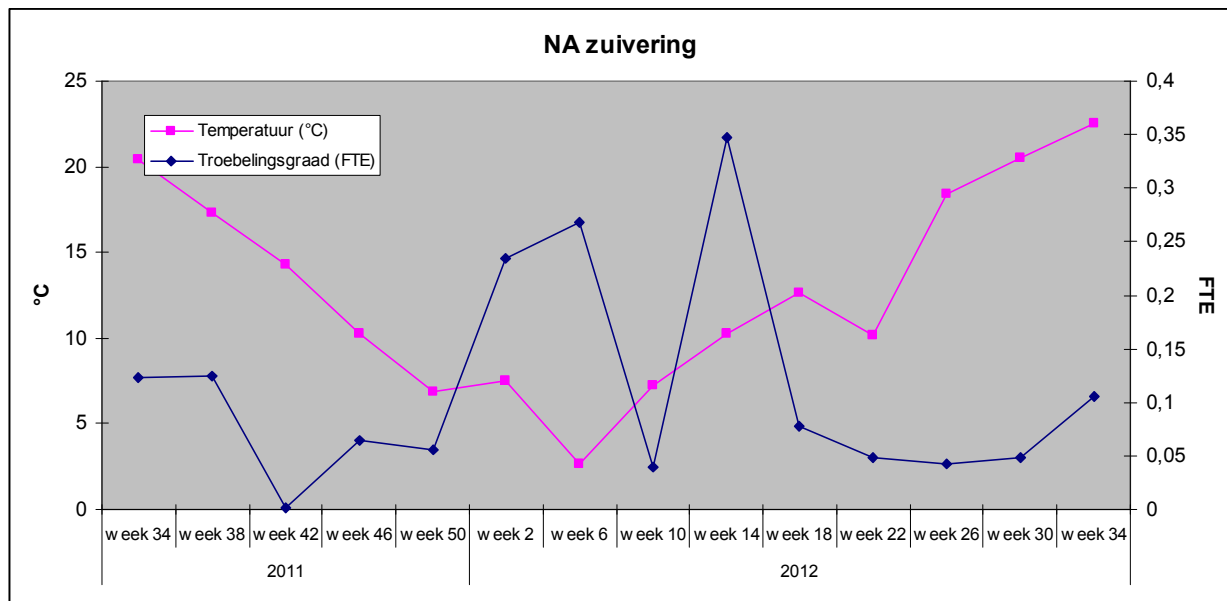
winter en $\pm 2 \times 10^3$ DNA kopieën /L in de zomer) voor de zuivering is ongeveer 10 maal hoger dan de concentraties somatische colifagen ($\pm 2 \times 10^3$ pve/L in de winter en $\pm 3 \times 10^2$ pve/L in de zomer), F-specifieke RNA-fagen ($\pm 1 \times 10^2$ pve/L in de winter en $< 1 \times 10^0$ pve/L in de zomer) en adenovirussen ($\pm 1 \times 10^3$ DNA kopieën/L in de winter en niet gedetecteerd in de zomer) na de zuivering. Opmerkelijk is dat er na de zuivering in week 33 helemaal geen virussen zijn gedetecteerd, zelfs geen somatische colifagen, terwijl deze de rest van het jaar wel zijn aangetroffen.

3.3 Relatie troebelingsgraad, temperatuur en virusconcentratie

De bemonsterde punten, voor- en na de zuivering, zijn ook 4 wekelijks bemonsterd door Waternet. De door Waternet verkregen analysesresultaten van temperatuur en troebelingsgraad zijn in figuur 7 en 8 weergegeven.



Figuur 7: De temperatuur en troebelingsgraad van het water voor zuivering uitgezet tegen de week van bemonstering.



Figuur 8: De temperatuur en troebelingsgraad van het water na zuivering uitgezet tegen de week van bemonstering.

Zowel voor- als na de zuivering lijkt er een relatie waarneembaar te zijn tussen de troebelingsgraad en de temperatuur. Wanneer de temperatuur laag is, is de troebelingsgraad hoog en vice versa. Enige uitzondering is in week 10 van 2012 bij het monster na de zuivering. Hier is de troebelingsgraad laag en de temperatuur ook. Bij de lage temperatuur lijkt de zuivering minder goed in staat de troebeling te verwijderen. In dezelfde periode zijn de virusconcentraties na de zuivering het hoogst.

In tabel 1 staat weergegeven in welke mate de troebelingsgraad en de virusconcentratie correleren. De mate van correlatie (R^2) is berekend uit de trendlijn die verkregen is door de twee parameters tegen elkaar uit te zetten, waarbij opgemerkt wordt dat de troebelingsgraad steeds een week eerder gemeten is en de correlatie minder betrouwbaar is. Er is voor de F-specifieke RNA fagen, somatische colifagen en adenovirussen voor- en na de zuivering berekend hoe sterk de correlatie is met de troebelingsgraad. Van de virusconcentratie is de log-waarde genomen voordat deze is uitgezet tegen de troebelheid om invloed van hoge aantallen te verminderen.

Tabel 1: Correlatie tussen de troebelingsgraad en de virusconcentratie.

Locatie:	Virus:	$R^2 =$	Mate van correlatie:
Voor zuivering	F-specifieke RNA fagen	0,15	Zwak
	Somatische colifagen	0,32	Matig
	Adenovirussen	0,09	Zeer zwak
Na zuivering	F-specifieke RNA fagen	0,19	Zwak
	Somatische colifagen	0,01	Zeer zwak
	Adenovirussen	0,42*	Matig

* Berekend met slechts drie analyses (wanneer adenovirus is gedetecteerd)

Uit tabel 1 is op te maken dat er slechts een zwakke correlatie is tussen de troebelingsgraad en de virusconcentratie van de geanalyseerde virussen. Alleen bij de somatische colifagen voor de zuivering en bij de adenovirussen na de zuivering (gebaseerd op slechts drie analyses) is een matige correlatie. Hier tegenover staat dat er bij de somatische colifagen na de zuivering en adenovirussen voor de zuivering juist een zeer zwakke correlatie is.

Op een vergelijkbare manier is de mate van correlatie tussen de temperatuur en de virusconcentratie (ook hier zijn van de virusconcentraties de log-waarden gebruikt) berekend (tabel 2). Hierbij moet opgemerkt worden dat de temperatuurmetingen tegelijk zijn uitgevoerd met de bemonsteringen ten behoeve van de virusdetectie.

Tabel 2: Correlatie tussen de temperatuur en de virusconcentratie.

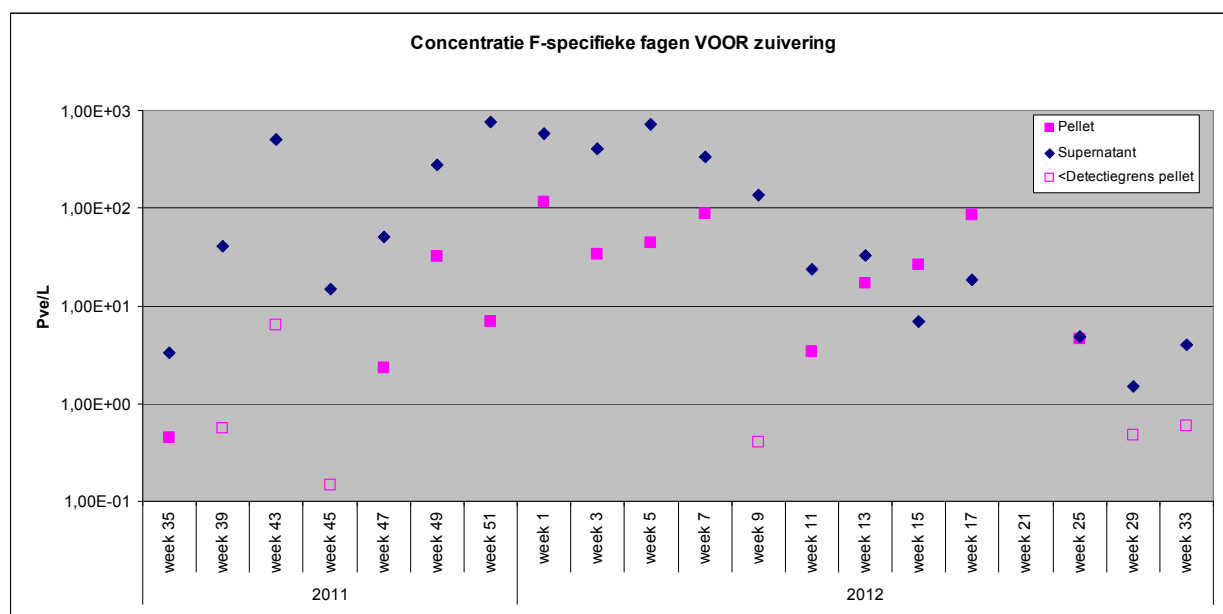
Locatie:	Virus:	R ² =	Mate van correlatie:
Voor zuivering	F-specifieke RNA fagen	0,72	Sterk
	Somatische colifagen	0,56	Sterk
	Adenovirussen	0,44	Matig
Na zuivering	F-specifieke RNA fagen	0,66	Sterk
	Somatische colifagen	0,34	Matig
	Adenovirussen	0,13*	Zwak

* Berekend met slechts vijf analyses (wanneer adenovirus is gedetecteerd)

De correlatie tussen de temperatuur en de virusconcentratie is groter dan tussen de troebelingsgraad en de virusconcentratie. Met name de F-specifieke fagen correleren sterk met de temperatuur. Deze relatie is zowel voor- als na de zuivering te zien. Waar de somatische fagen nog een matige tot sterke correlatie tot de temperatuur hebben, hebben de adenovirussen een zwakke tot matige correlatie.

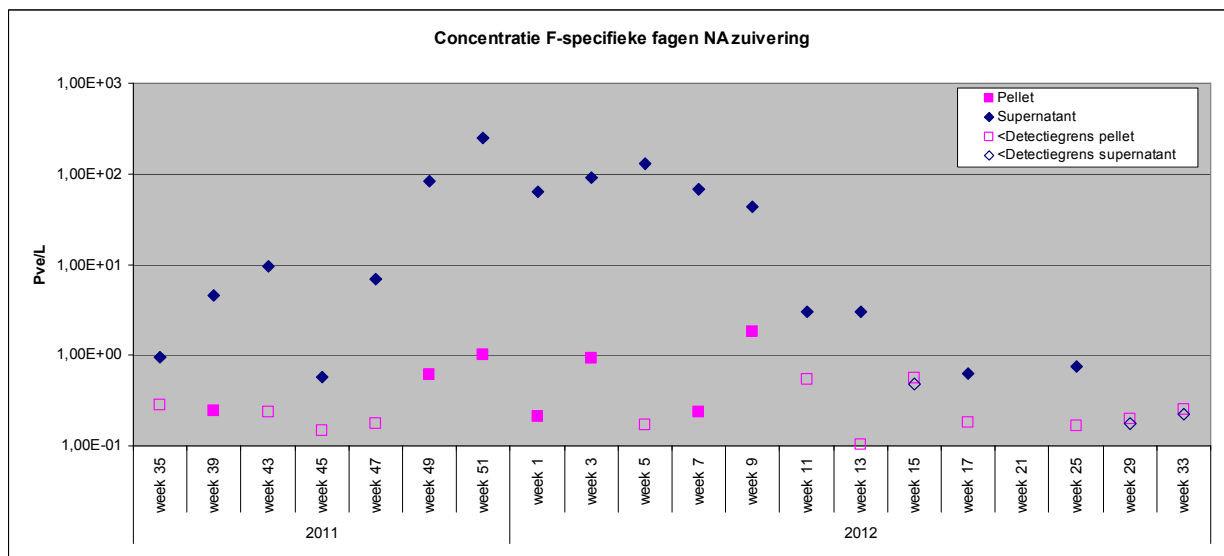
3.4 Virus in pellet en supernatant

Na de centrifugatiestap (figuur 2) zijn aparte analyses uitgevoerd voor het pellet en het supernatant. Het pellet bevat voornamelijk aan deeltjes gebonden virus en het supernatant na centricon het niet gebonden virus (vrij virus). In figuur 9 en 10 zijn de resultaten van de aparte analyses van pellet en supernatant vóór en ná de zuivering weergegeven van de F-specifieke RNA fagen. Voor de somatische colifagen (figuur 11 en 12) en de adenovirussen (figuur 13 en 14) zijn deze aparte analyse van pellet en supernatant ook weergegeven in een figuur.



Figuur 9: Concentratie F-specifieke RNA fagen in pellet en supernatant voor zuivering.

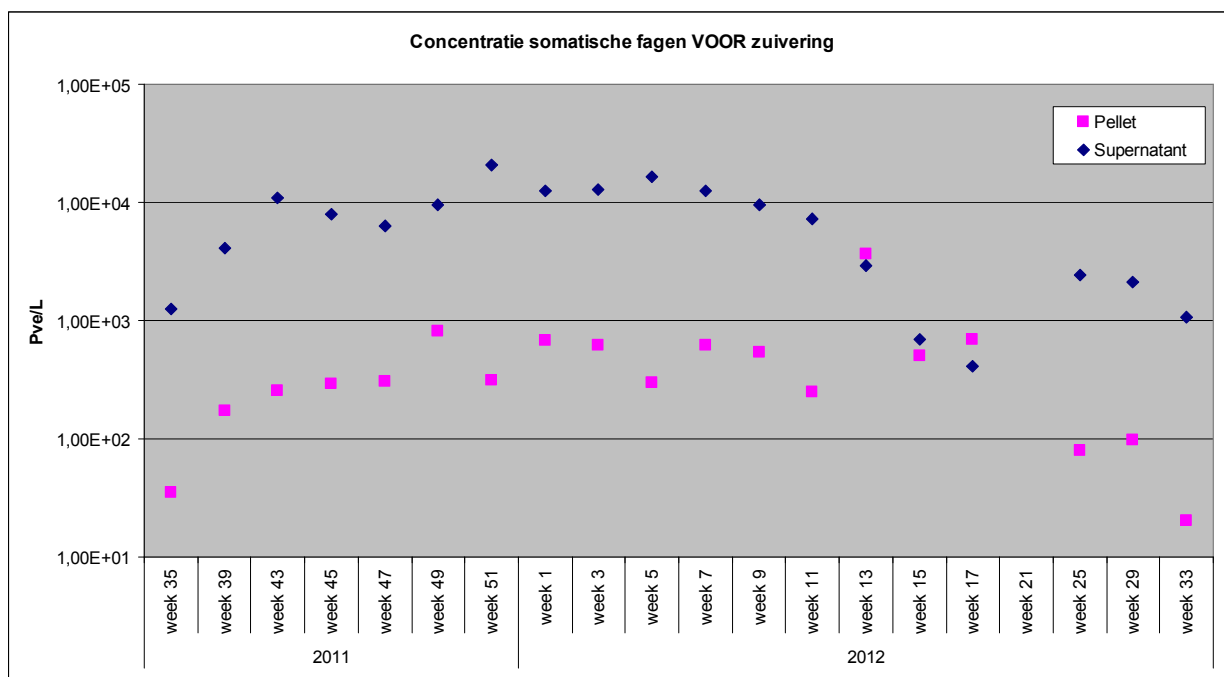
In week 21 zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.



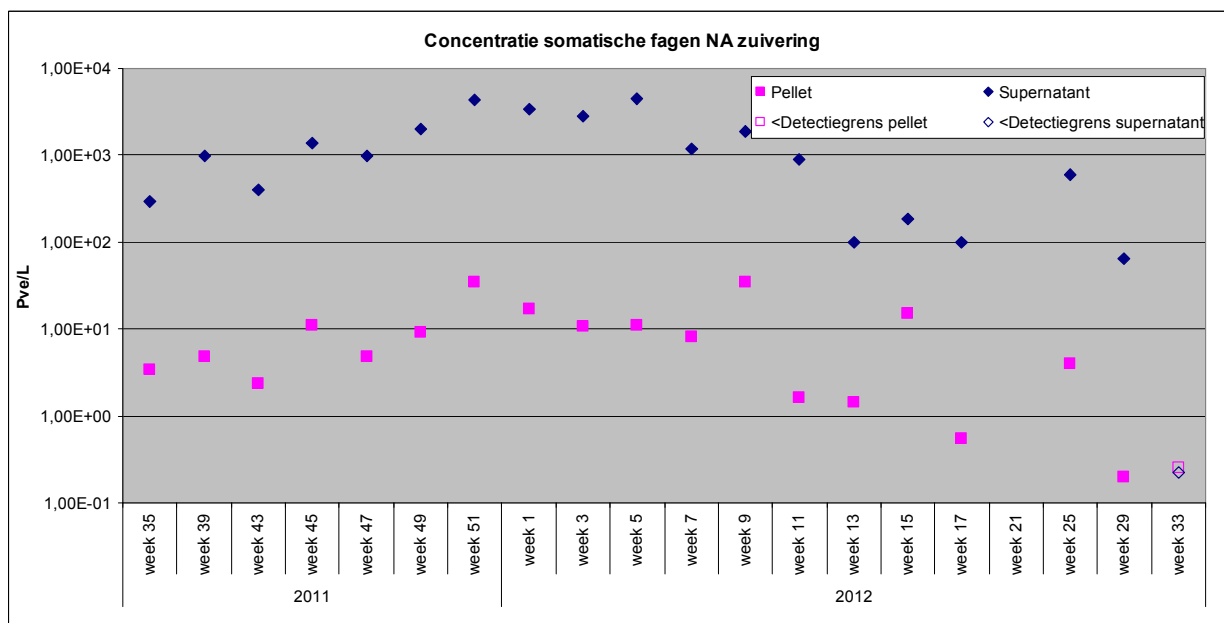
Figuur 10: Concentratie F-specifieke RNA fagen in pellet en supernatant na zuivering.

In week 21 zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. opperolaktewater.

Figuur 9 en 10 maken duidelijk dat de meeste F-specifieke RNA fagen niet gebonden zijn aan deeltjes. De concentratie F-specifieke RNA-fagen, zowel voor- als na de zuivering, is in het supernatant hoger dan in het pellet (uitgezonderd in week 15 en 17 voor de zuivering). Voor de zuivering is dat ongeveer 10x hoger en na de zuivering tot ongeveer 100x hoger. In de zomermaanden zijn, vooral na de zuivering, zeer lage concentraties (± 1 pve/L) of geen F-specifieke RNA fagen aangetroffen in het pellet. Hieruit blijkt dat de gebonden virussen beter verwijderd worden door de zuivering dan de vrije virussen. Het patroon zoals beschreven in paragraaf 3.2, waarbij duidelijk hogere concentraties F-specifieke RNA fagen worden gemeten in de wintermaanden dan in de zomermaanden is ook waar te nemen wanneer de fracties pellet en supernatant apart geanalyseerd worden. Hierbij moet opgemerkt worden dat in de zomermaanden, vooral na de zuivering, zeer lage concentraties (± 1 pve/L) of geen F-specifieke RNA fagen zijn aangetroffen in het pellet.



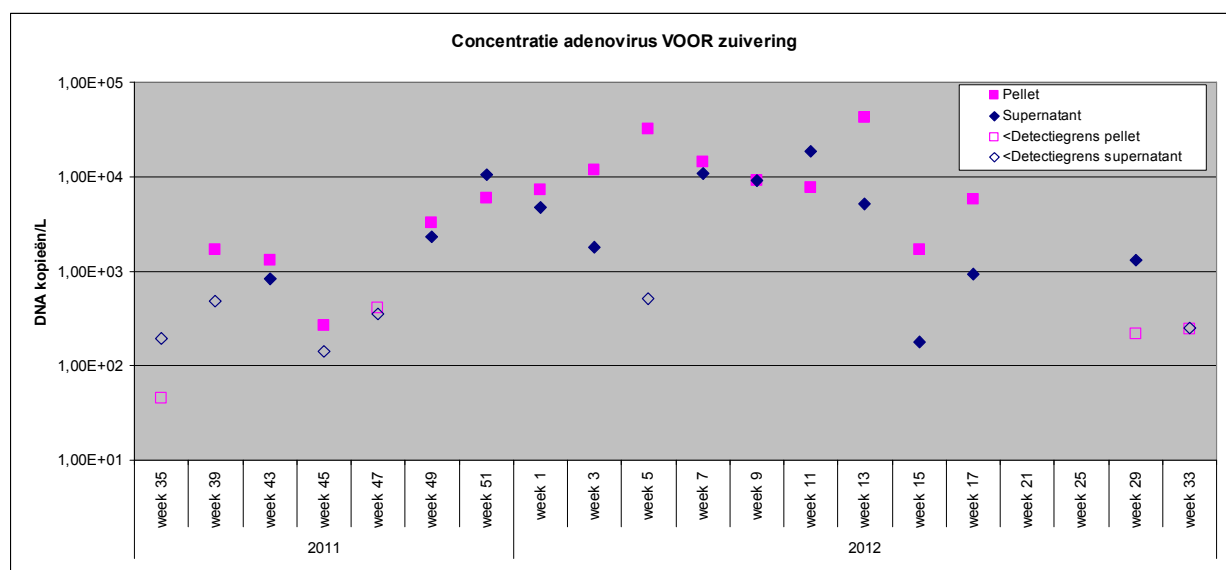
Figuur 11: Concentratie somatische coli fagen in pellet en supernatant voor zuivering.
In week 21 zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.



Figuur 12: Concentratie somatische colifagen in pellet en supernatant na zuivering.
In week 21 zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater is gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.

De concentratie somatische colifagen in het supernatant is, zowel voor- (20x tot 60x) als na de zuivering (100x tot 250x), hoger dan in het pellet (figuur 11 en 12). Alleen in week 13, 15 en 17 is er in de geanalyseerde fracties voor de zuivering een vergelijkbare concentratie somatische colifagen aangetoond. Week 33 na de zuivering is de enige keer dat er in de fracties geen somatische colifagen zijn aangetoond. Deze resultaten tonen aan dat somatische colifagen voor het grootste en belangrijkste deel vrije virussen zijn en niet gebonden aan deeltjes. Uit het feit dat de verhouding van de concentratie somatische colifagen in het supernatant ten opzichte van het pellet na de zuivering nog groter is dan voor de zuivering, kan opgemaakt worden dat de gebonden virussen ook hier beter verwijderd worden. Somatische colifagen worden tijdens

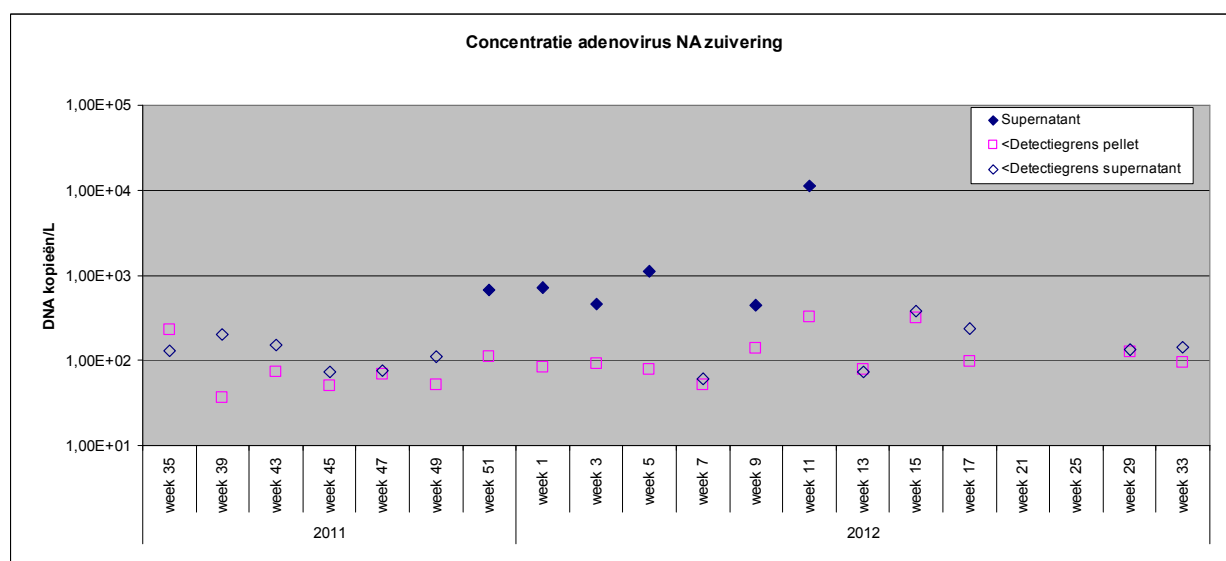
de zuivering met ongeveer 0,7 log verwijderd als wordt beoordeeld aan de hand van de metingen uit het supernatant na centricon en met ongeveer 1,7 log met de metingen uit het pellet. De directe metingen laten een verwijdering van ongeveer 0,7 log zien.



Figuur 13: Concentratie adenovirus in pellet en supernatant voor zuivering.

Week 21: Er zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater was gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.

Week 25: Er zijn geen analyses gedaan omdat er geen deel van de fracties opzij gezet is voor de Q-PCR.



Figuur 14: Concentratie adenovirus in pellet en supernatant na zuivering.

Week 21: Er zijn geen analyses gedaan omdat er grondwater was gebruikt voor de productie van het drinkwater i.p.v. oppervlaktewater.

Week 25: Er zijn geen analyses gedaan omdat er geen deel van de fracties opzij gezet is voor de Q-PCR.

Over het hele jaar bekeken is de concentratie adenovirus voor de zuivering ongeveer 3x hoger in het pellet dan in het supernatant. Met regelmaat wordt er in het supernatant meer adenovirus gedetecteerd dan in het pellet en kan geconcludeerd worden dat beide fracties een substantieel aandeel hebben in de totale adenovirusconcentratie. Dit is duidelijk verschillend van de beide faagtypen. De hoeveelheid gedetecteerd adenovirus voor de zuivering in het pellet bedraagt in de zomermaanden ongeveer 2×10^3 DNA kopieën/L en in de wintermaanden ongeveer $1,5 \times 10^4$ DNA kopieën/L. Dit verschil tussen zomer- en wintermaanden ($\pm 8x$ meer in de winter) is ook zichtbaar bij de hoeveelheid gedetecteerd adenovirus voor de zuivering in het supernatant

(1×10^3 DNA kopieën/L in de zomermaanden en 8×10^3 DNA kopieën/L in de wintermaanden). Hierbij moet wel rekening gehouden worden dat ongeveer de helft van de metingen in de zomermaanden in het pellet en het supernatant geen adenovirus is aangetroffen. In werkelijkheid is het verschil in concentratie adenovirus in de wintermaanden waarschijnlijk meer dan 8x hoger dan in de zomermaanden wanneer rekening wordt gehouden met dit gegeven.

Na de zuivering is er alleen nog in de wintermaanden in het supernatant adenovirus 40/41 aangetoond ($\pm 7 \times 10^2$ DNA kopieën/L). De resultaten van de adenovirus concentraties in het supernatant voor- en na de zuivering (figuur 13 en 14) laten ongeveer 0,7 log verwijdering zien van adenovirus type 40/41 door de zuivering. Opvallend is de hoge concentratie adenovirus in week 11 (1×10^4 DNA kopieën/L). De concentratie is dan ruim 10x hoger dan in de andere weken in de winter. Deze is slechts 1,5x lager dan voor de zuivering. De beide faagtypen geven op dat moment geen hoge concentratie na de zuivering te zien. In het pellet na de zuivering is gedurende de metingen over het gehele jaar geen adenovirus aangetoond. Net als bij de F-specifieke RNA fagen en somatische colifagen worden de aan deeltjes gebonden beter gezuiverd (>2.0 log) dan de niet gebonden (vrije) deeltjes.

3.5 Invloed spoelen op effectiviteit snelle zandfilter

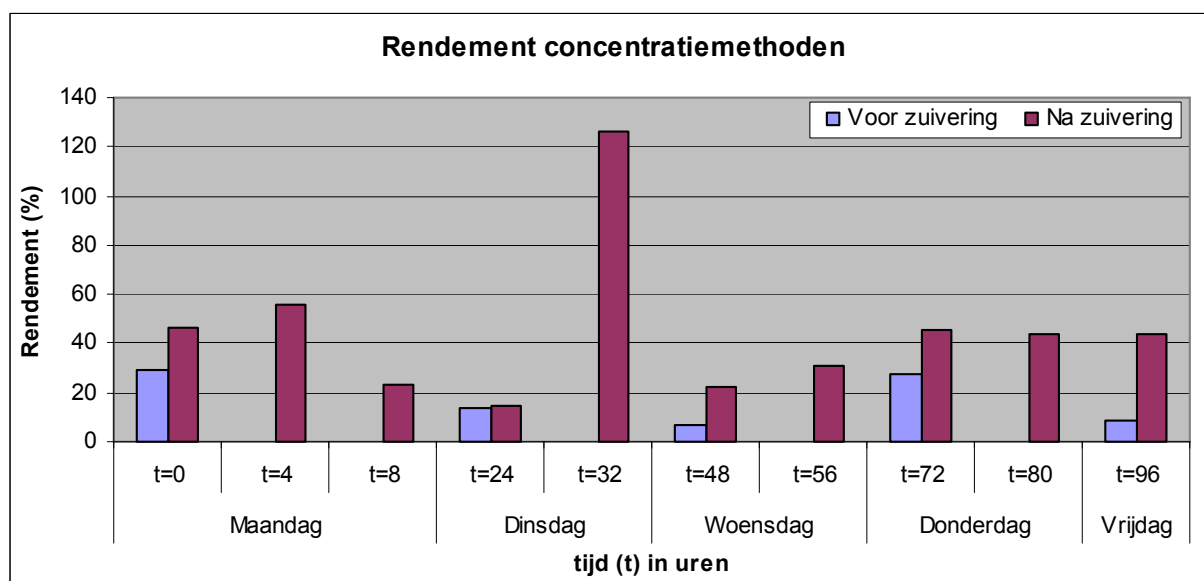
Aanvullend op het onderzoek naar de virusverwijdering bij de WRK is er gekeken naar de invloed van het spoelen op de effectiviteit van een snelle zandfilter. Dit is gedaan door op tien tijdstippen tussen twee spoelingen van één filter (periode van ongeveer 96 uur) in het effluent de concentratie F-specifieke RNA fagen, somatische colifagen en adenovirus type 40/41 te bepalen. Eén van de snelle zandfilters is handmatig gespoeld vlak voor de start van het onderzoek. Direct nadat het filter weer in gebruik is genomen is het eerste monster genomen ($t=0$). Het monster voor de zuivering is één keer per dag geanalyseerd, er van uitgaande dat de concentratie virussen in het onbehandelde oppervlaktewater niet veel zal veranderen binnen één werkdag (tabel 3). Besloten is om aan het eind van de winter te starten met dit onderzoek omdat uit eerder onderzoek (Heijnen 2011) is gebleken dat de concentratie F-specifieke RNA fagen, somatische colifagen en adenovirus dan hoger is. Op deze manier moet duidelijk worden wat geconcludeerd kan worden over de invloed van het spoelen op de effectiviteit van de virusverwijdering van een snelle zandfilter.

Tabel 3: Het monsterschema van het onderzoek naar de invloed van het spoelen op de effectiviteit van de virusverwijdering van een snelle zandfilter.

Datum:	Tijd:	t= (uur)	Geanalyseerde monsters
Ma 27 feb	8.00 uur	0	Voor en na zuivering
	12.00 uur	4	Na zuivering
	16.00 uur	8	Na zuivering
Di 28 feb	8.00 uur	24	Voor en na zuivering
	16.00 uur	32	Na zuivering
Wo 29 feb	8.00 uur	48	Voor en na zuivering
	16.00 uur	56	Na zuivering
Do 1 mrt	8.00 uur	72	Voor en na zuivering
	16.00 uur	80	Na zuivering
Vr 2 mrt	8.00 uur	96	Voor en na zuivering

- Rendementen concentratiemethoden en Q-PCR

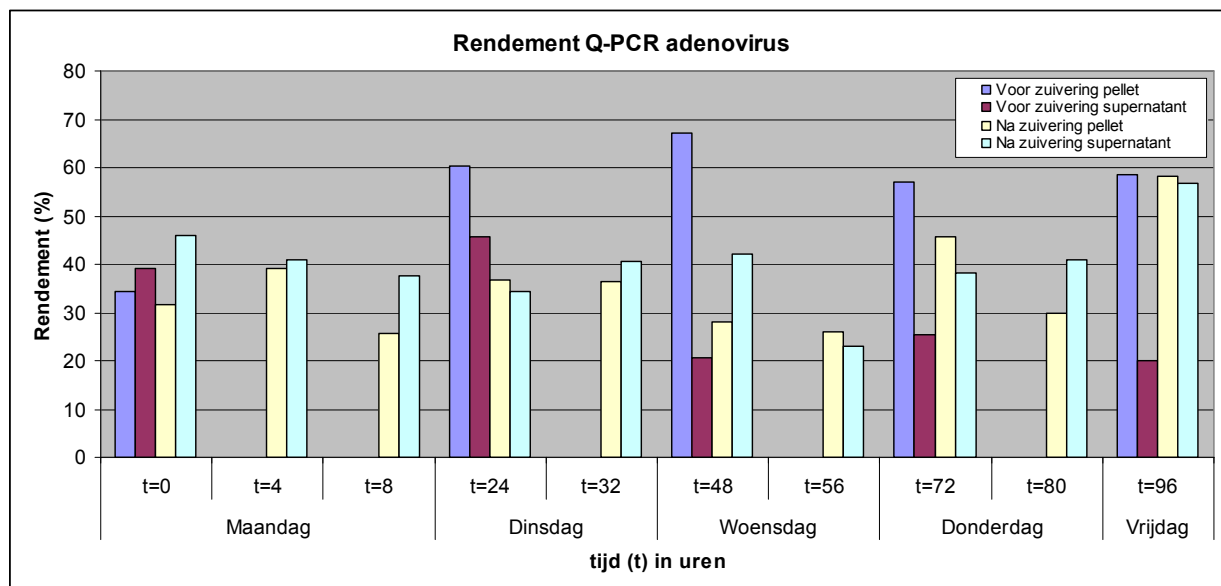
Ook bij deze spoelmonsters is het rendement van de concentratiemethoden bepaald (figuur 15) aan de hand van de concentratie somatische colifagen zoals ook beschreven is in paragraaf 3.1.



Figuur 15: De rendementen van de concentratiestappen, bepaald met de concentratie somatische colifagen, voor de onderzochte monsters (zowel voor- als na de zuivering) tijdens dit onderzoek. De monsters voor de zuivering zijn maar één maal per dag onderzocht.

Gedurende het gehele meetprogramma is het rendement van de concentratiemethoden van de monsters van voor de zuivering (gem. 17%) lager dan na de zuivering (gem. 45%).

Met behulp van IC-DNA is het rendement van de Q-PCR adenovirus type 40/41 van de geanalyseerde monsters bepaald (figuur 16). De methode staat beschreven in paragraaf 3.1.

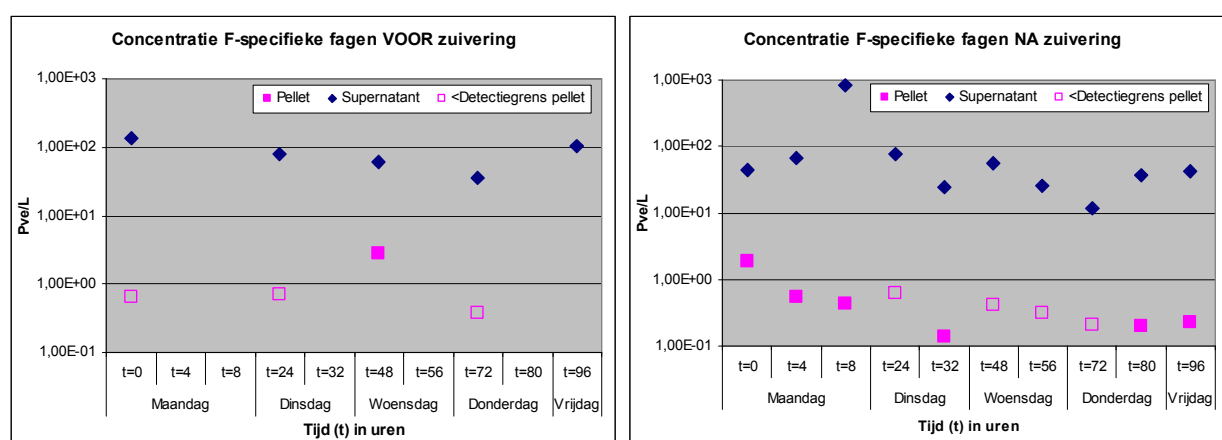


Figuur 16: De rendementen van de Q-PCR adenovirus voor de onderzochte monsters (zowel voor- als na de zuivering) tijdens dit onderzoek. De monsters voor de zuivering zijn maar één maal per dag onderzocht.

Het rendement voor alle geteste monsters is gemiddeld 40% (range 20% - 68%). Opvallend is dat het rendement van de pellet-fracties voor zuivering het hoogst is (gem. 55%) van de geteste monsters. Verwacht werd dat na zuivering de monsters schoner zijn en daarom een hoger rendement zouden opleveren.

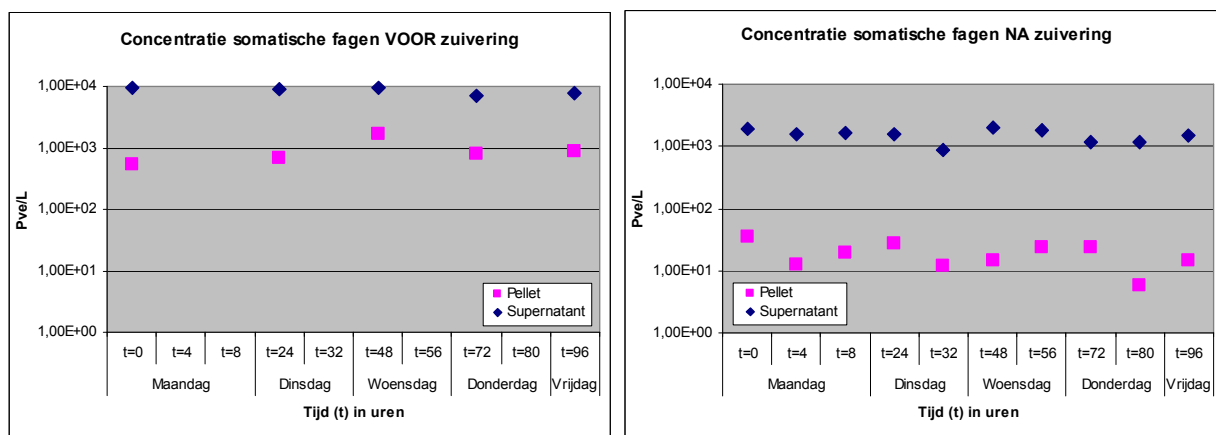
▪ *Concentraties virussen in pellet en supernatant*

De concentratie F-specifieke RNA fagen in het pellet en het supernatant na centricon is bepaald voor- en na de zuivering. Deze resultaten staan weergegeven in figuur 17. Er is geen duidelijke afname of toename van de effectiviteit van het snelfilter waar te nemen tussen twee spoelingen. De F-specifieke RNA fagen komen voor- en na de zuivering ongeveer 100x meer voor in het supernatant dan in het pellet. Gemiddeld worden de F-specifieke RNA fagen met iets minder dan een halve log verwijderd uit het supernatant. Met minder zekerheid is deze verwijdering ook aangetoond in het pellet. Deze onzekerheid komt doordat de concentratie F-specifieke RNA fagen in het pellet rond de detectiegrens (0,2 – 0,8 pve/L) ligt.



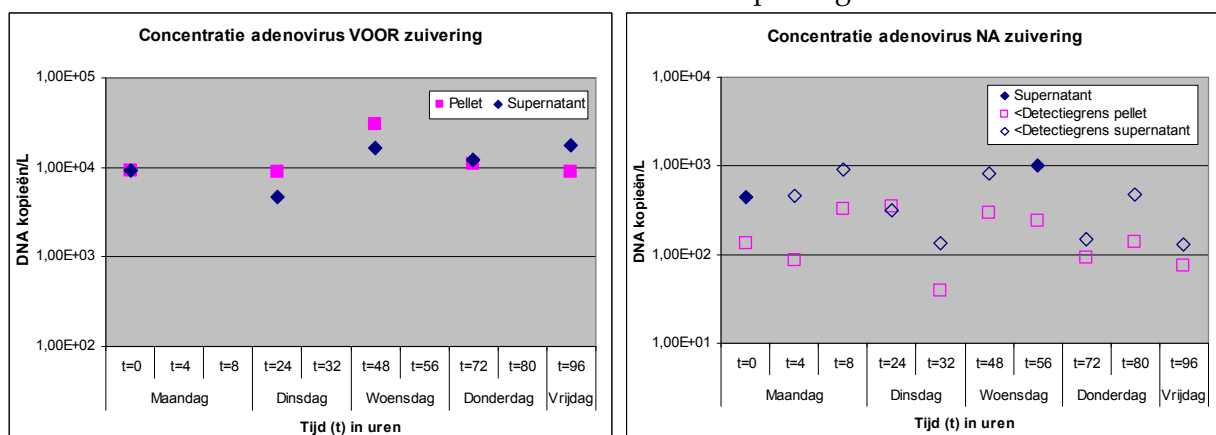
Figuur 17: De concentratie F-specifieke RNA fagen in pellet en supernatant, voor- en na zuivering.
De concentratie F-specifieke RNA fagen in pellet voor zuivering was niet te bepalen door contaminatie.

Figuur 18 geeft de concentratie somatische colifagen weer die aangetoond zijn in het pellet en het supernatant na centricon voor- en na de zuivering. In de monsters voor de zuivering is de concentratie somatische colifagen ongeveer 10x hoger in het supernatant dan in het pellet. Na de zuivering is dit ongeveer 100x hoger dan in het pellet. De verwijdering van somatische colifagen na zuivering is in het supernatant bijna één log. Uit het pellet wordt bijna twee log verwijderd. Hieruit blijkt dat somatische colifagen beter verwijderd worden uit het pellet dan uit het supernatant. Net als bij de F-specifieke RNA-fagen is geen duidelijke afname of toename van de effectiviteit van het snelfilter waar te nemen tussen twee spoelingen.



Figuur 18: De concentratie somatische colifagen in pellet en supernatant, voor- en na zuivering.

De concentratie adenovirus in het pellet en het supernatant is vergelijkbaar (figuur 19). Voor de zuivering is de concentratie ongeveer 1×10^4 DNA kopieën/L en na de zuivering is slechts op twee momenten in het supernatant, adenovirus gedetecteerd. Uitgaande van een detectiegrens van 2×10^2 - 4×10^2 DNA kopieën/L is de minimale verwijdering bijna twee log. Ook bij het onderzoek naar de adenovirussen type 40/41 is er geen duidelijke afname of toename van de effectiviteit van het snelfilter waar te nemen tussen twee spoelingen.



Figuur 19: De concentratie adenovirus type 40/41 in pellet en supernatant, voor- en na zuivering.

4 Discussie, conclusies en aanbevelingen

4.1 Rendement van de concentratiemethoden

Het rendement van de concentratiemethoden is bepaald aan de hand van de concentratie somatische colifagen. Hiermee kan gecorrigeerd worden voor het verlies van somatische colifagen tijdens de concentratie van het watermonster. Om dit rendement te kunnen bepalen moeten er zowel voor als na de concentratiestappen somatische colifagen aangetoond kunnen worden. Bij de meeste analysedata is dit ook het geval geweest. Het gemiddelde rendement (33,9% in water voor de zuivering en 52,2% in water na de zuivering) en de variatie in het rendement is vergelijkbaar met andere virusstudies (Rutjes and de Roda Husman, 2007).

In week 17 (geen somatische colifagen gedetecteerd in het ongeconcentreerde monster), week 29 (de concentratie somatische colifagen in het ongeconcentreerde monster is niet bepaald) en week 33 (geen somatische colifagen aangetroffen in het geconcentreerde monster na zuivering) kon het rendement niet bepaald worden. Bij deze analyse data is gebruik gemaakt van het rendement wanneer er één somatische colifaag aangetroffen wordt (week 17, rendement = 61,2%) of het gemiddelde rendement van het monster voor de zuivering (week 29, rendement = 33,9%) of na de zuivering (week 29 en week 33, rendement = 52,2%).

Een ander, wellicht belangrijker, punt van discussie is of het gebruik van het rendement van de concentratiemethoden dat verkregen is met de gedetecteerde concentraties somatische colifagen ook voor de F-specifieke RNA fagen en adenovirus type 40/41 gebruikt kan worden. In dit onderzoek wordt verondersteld dat dit vergelijkbaar is, maar er zijn geen gegevens bekend waarmee deze vergelijking direct kan worden gemaakt.

4.2 Virussen in het pellet na centrifugatie

Na het toepassen van de hemoflow-methode voor het concentreren van deeltjes uit de watermonsters (figuur 2) wordt centrifugatie toegepast om de grotere deeltjes uit het geconcentreerde monster te pelletteren en verder te gaan met de vrij gesuspendeerde virussen in het supernatant. Bij analyse van het pellet-materiaal blijkt dat hierin hoge concentraties adenovirussen worden aangetoond. In een aantal monsters is het aantal virusdeeltjes in de pellet zelfs hoger dan in het supernatant. In de wetenschappelijke literatuur is dit niet eerder beschreven. Het is niet mogelijk dat individuele virusdeeltjes bij deze centrifugestap naar beneden worden gedraaid en daarbij in de pellet terecht komen. De dichtheid van de virusdeeltjes, de toegepaste centrifugatie-kracht en -tijd zijn daarvoor te gering. Mogelijk dat adenovirusdeeltjes complexen vormen die onder invloed van de centrifugatiekrachten in de pellet terecht komen. Het aggregeren van adenovirussen tot complexen van een grote aantallen is eerder beschreven (Galdiero, 1979). In deze laboratorium studie vond de vorming van virusaggregaten plaats onder omstandigheden waarbij de pH laag was (< 5) en de virusconcentraties zeer hoog ($> 1 \times 10^{11}$ deeltjes/ml). De pH waarden en adenovirusconcentraties in de geconcentreerde monsters wijken hiervan zeer sterk af en hierdoor is niet te verwachten dat aggregatie van de virussen een grote rol speelt. Wong et al., 2012 vonden ook niet of nauwelijks aggregatie van adenovirussen onder normale omstandigheden in water.

Het is waarschijnlijker dat binding van adenovirussen aan deeltjes een belangrijke rol speelt bij het grote aantal adenovirussen dat na centrifugatie in het pellet terecht komen. Hechting van

adenovirussen aan deeltjes in het water zou ook gevolgen kunnen hebben voor de verwijdering van adenovirussen door zuiveringsprocessen. Voor de verwijdering in de coagulatie/filtratie van WRK Nieuwegein is dit ook zichtbaar: in het water na de zuivering worden alleen adenovirussen in het supernatant (vrij gesuspendeerde adenovirussen) aangetroffen. Voor andere zuiveringsprocessen, zoals desinfectie zou de hechting juist bescherming kunnen betekenen.

De concentraties somatische colifagen en F-specifieke fagen die worden aangetoond in het pellet zijn veel lager en vormen slechts een klein deel van de totale hoeveelheid fagen die in een monster aanwezig zijn. Dit geeft aan dat fagen anders in water voorkomen dan adenovirussen. Fagen binden waarschijnlijk minder efficiënt aan deeltjes. Bij binding aan deeltjes is het mogelijk dat lading van het oppervlak of de fibers van de adenovirussen een rol speelt. De lading van het oppervlak van virusdeeltjes wordt bepaald door het iso-electrisch punt (IEP, de pH waarbij het deeltje geen lading bezit) van de oppervlakte-eiwitten van de virusdeeltjes. De beschikbare informatie over IEP's van virusdeeltjes is beperkt. Uit een onderzoek waarbij de IEP's van verschillende virussen met elkaar vergeleken zijn (Michen and Graule, 2010) blijkt dat het IEP van één type adenovirus bepaald is (Humaan adenovirus type-5). Het IEP (4,5) van dit adenovirus en van Wong et al., 2012 van humaan adenovirus (IEP 3,5-4,0) blijkt niet sterk af te wijken van de IEP's van een groot aantal verschillende fagen zodat niet te verwachten valt dat de lading aan het oppervlak van dit adenovirus sterk afwijkt van fagen. Op basis hiervan is niet te verwachten is dat verschil in lading een belangrijke rol speelt in de verschillen in binding aan deeltjes. Aanwezigheid van bivalente kationen is wel bepalend voor de binding van adenovirussen aan deeltjes (Wong et al., 2012), maar dat geldt ook voor de beide fagen.

Het is ook niet uit te sluiten dat aggregatie ook voor de fagen een grotere rol speelt dan de metingen laten zien. Het is mogelijk dat aggregaten van meerdere fagen niet herkend kunnen worden als meerdere fagen doordat deze bij de gebruikte bepalingmethode slechts één plaque zullen vormen.

4.3 Virusconcentraties in het oppervlaktewater en na de zuivering

Bij de voorzuivering bij de WRK in Nieuwegein wordt oppervlaktewater gebruikt voor de productie van water dat bij Leiduin wordt geïnfiltreerd. In het water voor- en na de zuivering is de concentratie F-specifieke RNA fagen, somatische colifagen en adenovirussen bepaald. Hierbij is na de concentratiestappen (hemoflow en centricon; figuur 2) de concentratie van de virussen in het pellet en het supernatant afzonderlijk bepaald.

4.3.1 F-specifieke RNA fagen

In het monster voor de zuivering worden in alle onderzochte monsters F-specifieke RNA fagen aangetoond in het supernatant. In ruim tweederde (70%) van de monsters voor de zuivering worden ook in het pellet F-specifieke RNA fagen aangetoond. Na de zuivering is dit voor het pellet in 35% en voor het supernatant in 85% van de monsters het geval.

Het grootste deel van de F-specifieke RNA fagen zijn niet gebonden aan deeltjes. De concentratie F-specifieke RNA fagen is, zowel voor- als na de zuivering, in het supernatant hoger dan in het pellet (uitgezonderd week 15 en 17 voor de zuivering). Voor de zuivering is dat ongeveer 10x hoger en na de zuivering tot ongeveer 100x hoger. Dit betekent dat de gebonden virussen (aanwezig in het pellet) beter verwijderd worden door de zuivering dan de vrije virussen (aanwezig in het supernatant). Het verschil in concentratie tussen het pellet en het supernatant is dermate groot dat het analyseren van het supernatant na centricon volstaat,

om de concentratie F-specifieke RNA fagen in een oppervlaktewater monster dat geconcentreerd is met de hemoflow-methode, nauwkeurig te bepalen.

4.3.2 Somatische colifagen

Somatische colifagen worden, uitgezonderd in week 33, in alle onderzochte monsters in het pellet en het supernatant aangetoond. De concentratie somatische colifagen in het supernatant is hoger dan in het pellet. Voor de zuivering is de concentratie 20x tot 60x hoger en na de zuivering 100x tot 250x. Alleen in week 13, 15 en 17 is er in de geanalyseerde fracties voor de zuivering een vergelijkbare concentratie somatische colifagen gedetecteerd. Uit het feit dat de verhouding van de concentratie somatische colifagen in het supernatant ten opzichte van het pellet na de zuivering nog groter is dan voor de zuivering, kan opgemaakt worden dat de gebonden virussen, net als bij de F-specifieke RNA fagen, beter verwijderd worden. Ook voor de somatische colifagen geldt dat het analyseren van het supernatant volstaat om de concentratie nauwkeurig te bepalen in een oppervlaktewater monster dat geconcentreerd is met de hemoflow-methode.

4.3.3 Adenovirussen

De zuivering verwijdert ongeveer 1 log aan adenovirussen type 40/41 uit het pellet en het supernatant na centricon. Voor de zuivering wordt er in beide fracties ongeveer een vergelijkbare concentratie adenovirussen aangetroffen. In tegenstelling tot de F-specifieke RNA fagen en de somatische colifagen spelen beide fracties een belangrijke rol in de totale adenovirus type 40/41 concentratie in het water. Na zuivering wordt er slechts alleen in de wintermaanden adenovirus gedetecteerd in het supernatant. In het pellet van het monster na zuivering zijn het gehele jaar geen adenovirussen aangetroffen. Ook hier, net als bij de fagen, wordt weer bevestigd dat gebonden virusdeeltjes makkelijker verwijderd worden dan vrije virusdeeltjes. De gevonden verwijdering van adenovirussen is vergelijkbaar met die van de beide fagen. Die wordt (vrijwel) geheel bepaald door de doorslag van vrij gesuspenderde virussen. Doordat voor adenovirussen het aandeel vrij gesuspenderde virussen nog steeds substantieel is, is de invloed van de deeltjesgebonden virussen op de uiteindelijk gemeten verwijdering beperkt.

4.4 Invloed spoelen op effectiviteit snelle zandfilter

Er zijn geen aanwijzingen gevonden voor een verminderde virusverwijdering in bepaalde fasen van een snelfilter tussen beide spoelingen.

4.5 Verwijdering virussen door coagulatie/snelfiltratie

De gegevens laten zien dat voor alle virussen geldt dat de concentratie in het Lekkanaal hoger is in de winter dan in de zomer. Ook na de zuivering zijn de virussen aangetroffen en zijn de concentraties in de winterperiode het hoogst. Dat gaat in ieder geval gepaard met het hogere virusaanbod uit het Lekkanaal en mogelijk met verminderde coagulatie en/of filtratie bij lagere watertemperaturen. De winterperiode is dus voor adenovirussen, net als voor enterovirussen (van Olphen et al, 1984), de meest kritische periode voor wat betreft voorkomen in oppervlaktewater en verwijdering door coagulatie en zandfiltratie. Onderzoek naar voorkomen in oppervlaktewater en effectiviteit van coagulatie en zandfiltratie (en waarschijnlijk ook andere filtratieprocessen) kan zich dus het beste richten op de winterperiode. De gemiddelde gemeten verlaging van de concentratie somatische colifagen is 0,7 log. Voor somatische fagen die gebonden zijn aan deeltjes is de verlaging 1,7 log. Voor

adenovirussen is de gemiddelde verlaging ook 0,7 log; voor de adenovirussen die aan deeltjes zijn gebonden is de verwijdering minimaal 2.0 log.

4.6 Toepasbaarheid virusmethoden voor verwijdering in de zuivering

Uit dit onderzoek is gebleken dat de (fysische) verwijdering van virussen door coagulatie- en filtratieprocessen goed is vast te stellen met de kweekmethode voor somatische colifagen en de Q-PCR methode voor adenovirussen. De combinatie van deze twee methoden heeft het ook mogelijk gemaakt de verwijdering van de somatische colifagen als indicator voor verwijdering van humane virussen te vergelijken met die van humane adenovirussen. De concentratie van beide virustypen in het Lekkanaal waren hoog en lagen in dezelfde ordegrrootte. Voor het vaststellen van de verwijdering door de zuivering leverde de kweekmethode met colifagen een gevoeliger methode (ca 100x). Dit ligt vooral aan het beperkte volume dat voor de Q-PCR in behandeling kan worden genomen.

De gemeten verlaging van de concentratie lag voor zowel adenovirussen als voor somatische colifagen op 0,7 log voor de niet-gebonden virusdeeltjes. Gebonden virusdeeltjes werden beter verwijderd, respectievelijk >2,0 en 1,7 log. Uit de metingen is duidelijk geworden dat adenovirussen veel meer dan de colifagen aan deeltjes gehecht voorkomen. Dat maakt in deze situatie de colifagen een conservatieve indicator voor het bepalen van de verwijdering van adenovirussen.

Voor onderzoek aan de verwijdering van virussen door zuiveringsprocessen is een combinatie van somatische colifagen en adenovirussen gewenst, maar moet wel rekening gehouden worden met het verschil in gevoeligheid. Bij grotere mate van verwijdering zijn, bij de huidige gevoeligheid, alleen de somatische colifagen bruikbaar.

5 Literatuur

- Abbaszadegan, M., Mayer, B.K., Ryu, H. and Nwachuku, N., 2007. Efficacy of removal of CCL viruses under enhanced coagulation conditions. *Environ Sci Technol* 41 (3), 971-977.
- Abbaszadegan, M., Monteiro, P., Nwachuku, N., Alum, A. and Ryu, H., 2008. Removal of adenovirus, calicivirus, and bacteriophages by conventional drinking water treatment. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 43 (2), 171-177.
- Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L. and Girones, R., 2009a. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res* 43 (7), 2011-2019.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J.M., Courtois, S. and Girones, R., 2009b. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods* 158 (1-2), 104-109.
- Anoniem, 2005. Inspectierichtlijn "Analyse microbiologische veiligheid drinkwater". VROM-Inspectie Artikelcode 5318.
- Anonymous, 1995. ISO 10705-1: Water quality -- Detection and enumeration of bacteriophages -- Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages ISO standard.
- Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water quality -- Detection and enumeration of bacteriophages -- Part 2: Enumeration of somatic coliphages. ISO standard.
- de Roda Husman, A.M., Penders, E.J.M., Krom, A.P., Bakker, G.L. and Hoogenboezem, W., 2005. Viruses in the Rhine and source waters for drinking water production. RIWA Report 330200.
- de Roda Husman, A.M., Ketelaars, H.A.M., Lodder, W.J., Medema, G.J. and Schets, F.M., 2006. De microbiologische kwaliteit van het ingenomen en afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001. RIVM rapport 330250002
- Galdiero, F., 1979. Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment. *Arch Virol* 59 (1-2), 99-105.
- Havelaar, A.H., van Olphen, M. and Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 59 (9), 2956-2962.
- Heijnen, L., 2011. Virusverwijdering door drinkwaterzuiveringsprocessen; de waarde van somatische fagen, F-specifieke fagen en adenovirussen. BTO 2011.010.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Hill, V.R., Lu, X., Sobsey, M.D. and Erdman, D.D., 2005. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl Environ Microbiol* 71 (6), 3131-3136.
- Medema, G.J. and Theunissen, J.J.H., 1996. Eliminatie van virussen, *Cryptosporidium* en *Giardia* door drinkwaterzuiveringsprocessen. RIVM rapport (289202016).
- Michen, B. and Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol*.
- Mooijman, K.A., Bahar, M., Muniesa, M. and Havelaar, A.H., 2002. Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages. *J Virol Methods* 103 (2), 129-136.
- Payment, P., 1991. Fate of human enteric viruses, coliphages, and *Clostridium perfringens* during drinking-water treatment. *Can J Microbiol* 37 (2), 154-157.
- Payment, P. and Franco, E., 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol* 59 (8), 2418-2424.
- Rutjes, S.A. and de Roda Husman, A.M., 2007. Optimalisatie van virusdetectie ten behoeve van het Nederlands Waterleidingbesluit. RIVM rapport (703719018).
- Schijven, J.F., 2001. Virus Removal from Groundwater by Soil Passage. Modeling, Field and Laboratory Experiments. PHD-Thesis "Delft University of Technology" ISBN 90-646-4046-7.
- Taylor, M.B., Cox, N., Vrey, M.A. and Grabow, W.O., 2001. The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Res* 35 (11), 2653-2660.
- Theunissen, J.J.H., Nobel, P.J., van de Heide, R., de Bruin, H.A.M., van Veenendaal, D., Lodder, W.J., Schijven, J.F., Medema, G.J. and Van der Kooij, D., 1998. Enterovirusconcentraties bij innamepunten van oppervlaktewater voor de bereiding van drinkwater. RIVM rapport 28920213.

- van Olphen, M., Kapsenberg, J.G., van de Baan, E. and Kroon, W.A., 1984. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 47 (5), 927-932.
- Veenendaal, H.R.B.-H., A. J., 2007. Een methode voor het concentreren van grote volumes water. BTO rapport BTO 2007.051.
- Wong, K., Mukherjee, B., Zepp, R., Kahler, A. and Riblet, S., 2012. Influence of inorganic ions and aggregation and adsorption behaviors of human adenovirus. Presented at American Society of Microbiology 2012 Annual Conference, June 16 – 21.

6 Bijlagen

Bijlage A: Rendement concentratiemethoden(in %) gebaseerd op de gedetecteerde aantallen somatische colifagen

Jaar	2011							2012											
Weeknr.	35	39	43	45	47	49	51	1	3	5	7	9	11	13	15	17	25	29	33
Voor zuivering	47,3	13,3	17,9	64,6	12,4	29,4	6,6	19,9	33,9	15,5	47,9	29,3	30,7	40,3	50,2	31,2	83,6	33,9 ^{b)}	35,2
Na zuivering	25,5	30,2	31,6	66,9	54,9	62,4	45,9	50,1	50,0	53,1	79,4	46,2	49,3	104,4	17,4	61,2 ^{a)}	59,2	52,2 ^{b)}	52,2 ^{c)}

a) Geen somatische fagen aangetoond in het direct monster na zuivering. Uitgaande van één gedetecteerde somatische faag is het rendement 61,2%.

b) Geen somatisch faag-analyse gedaan op het directe monster. Gemiddeld rendement gebruikt van voor zuivering (33,9%) en na zuivering (52,2%).

c) Geen somatische fagen aangetoond in het geconcentreerde monster na zuivering. Gemiddeld rendement gebruikt van na zuivering (52,2%).

Bijlage B: Rendement interne controle (IC) DNA-isolatie en Q-PCR methode(in %)

Jaar		2011							2012											
Weeknr		35	39	43	45	47	49	51	1	3	5	7	9	11	13	15	17	25	29	33
Voor zuivering	Pellet	30,3	58,8	59,1	35,6	38,9	59,1	53,0	57,1	37,9	59,9	62,1	34,4	41,2	32,6	44,5	33,7	ND	42,1	45,4
	Supernant	20,1	46,5	70,4	60,3	57,0	54,7	47,5	58,7	32,4	49,8	49,9	39,1	37,3	30,7	52,6	44,5	ND	42,7	53,7
Na zuivering	Pellet	23,3	62,9	61,6	59,9	51,6	59,0	37,4	50,4	41,9	45,4	48,0	31,6	34,3	26,5	35,9	38,5	ND	29,5	49,8
	Supernant	24,8	68,2	63,4	64,3	48,3	59,8	52,6	56,9	27,7	50,3	57,3	46,0	20,6	37,4	42,1	44,1	ND	43,3	51,7

ND: Not done

Bijlage C: Virusconcentraties gecorrigeerd voor rendement concentratiemethoden en interne controle (adenovirussen)

Jaar			2011								2012										
Weeknr.			35	39	43	45	47	49	51	1	3	5	7	9	11	13	15	17	25	29	33
Somatische colifagen (kve/L)	Voor zuivering	Direct Pellet Supernant	1,3x10 ³ 3,5x10 ¹ 1,3x10 ³	4,3x10 ³ 1,7x10 ² 4,1x10 ³	1,1x10 ⁴ 2,5x10 ² 1,1x10 ⁴	8,3x10 ³ 2,9x10 ² 8,0x10 ³	6,6x10 ³ 3,0x10 ² 6,3x10 ³	1,0x10 ⁴ 8,2x10 ² 9,6x10 ³	2,1x10 ⁴ 3,2x10 ² 2,1x10 ⁴	1,3x10 ⁴ 6,8x10 ² 1,3x10 ⁴	1,3x10 ⁴ 6,2x10 ² 1,3x10 ⁴	1,7x10 ⁴ 3,0x10 ² 1,7x10 ⁴	1,3x10 ⁴ 6,2x10 ² 1,3x10 ⁴	1,1x10 ⁴ 5,5x10 ² 9,5x10 ³	7,6x10 ³ 2,5x10 ² 7,4x10 ³	6,6x10 ³ 3,7x10 ³ 3,0x10 ³	1,2x10 ³ 5,0x10 ² 7,0x10 ²	1,1x10 ³ 6,9x10 ² 4,1x10 ²	2,5x10 ³ 7,9x10 ¹ 2,4x10 ³	b) 1,3x10 ¹ 1,3x10 ³	1,1x10 ³ 2,1x10 ¹ 1,1x10 ³
	Na zuivering	Direct Pellet Supernant	3,0x10 ² 3,4x10 ⁰ 3,0x10 ²	1,0x10 ³ 4,9x10 ⁰ 1,0x10 ³	4,0x10 ² 2,4x10 ⁰ 4,0x10 ²	4,4x10 ³ 1,1x10 ¹ 1,4x10 ³	1,0x10 ³ 4,8x10 ⁰ 1,0x10 ³	2,0x10 ³ 9,2x10 ⁰ 2,0x10 ³	4,4x10 ³ 3,5x10 ¹ 4,4x10 ³	3,4x10 ³ 1,7x10 ¹ 3,4x10 ³	2,8x10 ³ 1,1x10 ¹ 2,8x10 ³	4,5x10 ³ 1,1x10 ¹ 4,5x10 ³	1,2x10 ³ 8,1x10 ⁰ 1,2x10 ³	1,9x10 ³ 3,5x10 ¹ 1,9x10 ³	9,0x10 ² 1,6x10 ⁰ 9,0x10 ²	1,0x10 ² 1,4x10 ⁰ 9,9x10 ¹	2,0x10 ² 1,5x10 ¹ 1,9x10 ²	<1,0x10 ² 5,5x10 ⁻¹ 1,0x10 ²	6,0x10 ² 4,0x10 ⁰ 6,0x10 ²	b) 1,3x10 ⁻¹ 1,3x10 ¹	2,0x10 ² <2,5x10 ⁻¹ <2,2x10 ⁻¹
F-specifieke RNA fagen (kve/L)	Voor zuivering	Pellet Supernant	4,4x10 ⁻¹ 3,3x10 ⁰	<5,6x10 ⁻¹ 4,1x10 ¹	<6,3x10 ⁰ 5,1x10 ²	<1,5x10 ⁻¹ 1,5x10 ¹	2,3x10 ⁰ 5,1x10 ¹	3,2x10 ¹ 2,7x10 ²	6,9x10 ⁰ 7,6x10 ²	1,2x10 ² 5,7x10 ²	3,4x10 ¹ 4,1x10 ²	4,4x10 ¹ 7,3x10 ²	8,8x10 ¹ 3,3x10 ²	<4,0x10 ⁻¹ 1,4x10 ²	3,4x10 ⁰ 2,4x10 ¹	1,7x10 ¹ 3,3x10 ¹	2,6x10 ¹ 7,0x10 ⁰	8,5x10 ¹ 1,8x10 ¹	4,7x10 ⁰ 4,8x10 ⁰	<4,8x10 ⁻¹ 1,5x10 ⁰	<5,9x10 ⁻¹ 4,0x10 ⁰
	Na zuivering	Pellet Supernant	<2,8x10 ⁻¹ 9,6x10 ⁻¹	2,4x10 ⁻¹ 4,6x10 ⁰	<2,4x10 ⁻¹ 9,6x10 ⁰	<1,5x10 ⁻¹ 5,7x10 ⁻¹	<1,8x10 ⁻¹ 6,9x10 ⁰	6,1x10 ⁻¹ 8,3x10 ¹	1,0x10 ⁰ 2,5x10 ²	2,1x10 ⁻¹ 6,3x10 ¹	9,3x10 ⁻¹ 9,2x10 ¹	<1,7x10 ⁻¹ 1,3x10 ²	2,4x10 ⁻¹ 6,8x10 ¹	1,8x10 ⁰ 4,4x10 ¹	5,4x10 ⁻¹ 3,0x10 ⁰	<1,0x10 ⁻¹ 3,0x10 ⁰	<5,6x10 ⁻¹ <4,9x10 ⁻¹	<1,8x10 ⁻¹ 6,2x10 ⁻¹	<1,7x10 ⁻¹ 7,5x10 ⁻¹	<2,0x10 ⁻¹ <1,7x10 ⁻¹	<2,5x10 ⁻¹ <2,2x10 ⁻¹
Adeno-virussen (DNA kopieën/L)	Voor zuivering	Pellet Supernant	<4,6x10 ¹ <1,9x10 ²	1,7x10 ³ <4,8x10 ²	1,3x10 ³ 1,3x10 ³	2,6x10 ² <1,4x10 ²	<4,0x10 ² <3,5x10 ²	3,3x10 ³ 2,3x10 ³	5,9x10 ³ 1,1x10 ⁴	7,3x10 ³ 4,3x10 ³	1,2x10 ⁴ 1,8x10 ³	3,2x10 ⁴ <5,2x10 ²	1,4x10 ⁴ 1,1x10 ⁴	9,2x10 ³ 9,1x10 ³	7,7x10 ³ 1,9x10 ⁴	4,3x10 ³ 5,1x10 ³	1,7x10 ³ 1,8x10 ²	5,8x10 ³ 9,2x10 ²	a) a)	<2,1x10 ² 1,3x10 ³	<2,4x10 ² <2,5x10 ²
	Na zuivering	Pellet Supernant	<2,3x10 ² <1,3x10 ²	<3,6x10 ¹ <2,0x10 ²	1,3x10 ³ 1,3x10 ³	<5,1x10 ¹ <7,4x10 ¹	<7,0x10 ¹ <7,5x10 ¹	<5,3x10 ¹ <1,1x10 ²	<1,1x10 ² 6,7x10 ²	<8,4x10 ¹ 7,6x10 ²	<9,1x10 ¹ 4,6x10 ²	<7,7x10 ¹ 1,1x10 ³	<5,1x10 ¹ <6,1x10 ¹	<1,4x10 ² 4,4x10 ²	<3,2x10 ² 1,1x10 ⁴	<7,9x10 ³ <7,3x10 ³	<1,3x10 ² <1,3x10 ²	<9,7x10 ¹ <2,4x10 ²	a) a)	<1,3x10 ² <1,3x10 ²	<9,5x10 ¹ <1,4x10 ²

Week 21: geen analyses uitgevoerd; grondwater gebruikt voor productie i.p.v. oppervlaktewater.

a) geen concentraat voor adenovirusanalyse bewaard.

b) Concentratie somatische fagen niet bepaald in direct monster

Bijlage D: Temperatuurgegevens (in °C) gebruikt voor correlatieberekening temperatuur-virusconcentratie

Jaar	2011						2012										
Weeknr.	35	39	43	45	49	51	3	5	7	9	11	13	15	17	25	29	33
Voor zuivering	19,2	16,9	11,9	11,7	6,7	5,0	5,9	4,5	0,1	4,9	7,6	11,2	10,5	10,5	18,2	19,7	21,5
Na zuivering	19,2	17,1	12,3	Niet gemeten	6,9	5,5	7,1	5,5	1,2	5,2	Niet gemeten	10,1	10,4	10,6	18,4	19,1	20,6

Bijlage E: Virusconcentraties (log-waarden) gebruikt voor correlatieberekening temperatuur-virusconcentratie

Jaar		2011						2012										
Weeknr.		35	39	43	45	49	51	3	5	7	9	11	13	15	17	25	29	33
Voor zuivering	F-spec. fagen (pve/L)	0,58	1,61	2,71	1,17	2,48	2,88	2,64	2,89	2,62	2,14	1,43	1,70	1,52	2,01	0,98	0,17	0,60
	Som. fagen (pve/L)	3,11	3,63	4,05	3,92	4,02	4,33	4,13	4,23	4,12	4,00	3,88	3,82	3,08	3,04	3,40	3,34	3,04
	Adeno (DNA-kopieën/L)	a)	3,23	3,33	2,42	3,75	4,22	4,13	4,51	4,40	4,26	4,42	4,68	3,28	3,83	a)	3,12	a)
Na zuivering	F-spec. fagen (pve/L)	-0,02	0,68	0,98	-0,24	1,92	2,39	1,97	2,11	1,84	1,66	0,48	0,48	a)	-0,21	-0,13	a)	a)
	Som. fagen (pve/L)	2,48	3,00	2,60	3,15	3,30	3,64	3,45	3,65	3,08	3,28	2,95	2,00	2,30	2,00	2,78	1,81	a)
	Adeno (DNA-kopieën/L)	a)	a)	a)	a)	a)	2,83	2,66	3,05	a)	2,65	4,05	a)	a)	a)	a)	a)	a)

a) concentratie ligt beneden de detectiegrens en is niet meegenomen.

Bijlage F: Troebelingsgraad (in FTE) gebruikt voor correlatieberekening troebelingsgraad-virusconcentratie

Jaar	2011					2012							
Weeknr.	34	38	42	46	50	2	6	10	14	18	26	30	34
Voor zuivering	22,031	26,532	24,022	45,799	27,524	64,638	20,612	18,219	5,501	11,824	17,524	17,213	19,169
Na zuivering	0,123	0,124	0,001	0,064	0,055	0,234	0,268	0,039	0,347	0,078	0,043	0,048	0,105

Bijlage G: Virusconcentraties (log-waarden) gebruikt voor correlatieberekening troebelingsgraad-virusconcentratie

Jaar		2011					2012							
Weeknr.		35	39	43	47	51	3	7	11	15	17	25	29	33
Voor zuivering	F-spec. fagen (pve/L)	0,58	1,61	2,71	1,73	2,88	2,64	2,62	1,43	1,52	2,01	0,98	0,17	0,60
	Som. fagen (pve/L)	3,11	3,63	4,05	3,82	4,33	4,13	4,12	3,88	3,08	3,04	3,40	3,34	3,04
	Adeno (DNA-kopieën/L)	a)	3,23	3,33	a)	4,22	4,13	4,40	4,42	3,28	3,83	a)	3,12	a)
Na zuivering	F-spec. fagen (pve/L)	-0,02	0,68	0,98	0,48	2,39	1,97	1,84	0,48	a)	-0,21	-0,13	a)	a)
	Som. fagen (pve/L)	2,48	3,00	2,60	3,00	3,64	3,45	3,08	2,95	2,30	2,00	2,78	1,81	a)
	Adeno (DNA-kopieën/L)	a)	a)	a)	a)	2,83	2,66	a)	4,05	a)	a)	a)	a)	a)

a) concentratie ligt beneden de detectiegrens en is niet meegenomen.

Bijlage H: Gegevens gebruikt voor correlatieberekening troebelingsgraad-temperatuur

	Jaar	2011					2012								
	Weeknr.	34	38	42	46	50	2	6	10	14	18	22	26	30	34
Troebelingsgraad (FTE)	Voor zuivering	22,031	26,532	24,022	45,799	27,524	64,638	20,612	18,219	5,501	11,824	4,772	17,524	17,213	19,169
	Na zuivering	0,123	0,124	0,001	0,064	0,055	0,234	0,268	0,039	0,347	0,078	0,078	0,043	0,048	0,105
Temperatuur (°C)	Voor zuivering	20,3	16,3	13,2	8,8	5,9	7,0	0,9	6,9	11,0	13,4	9,5	19,1	20,6	24,1
	Na zuivering	20,4	17,3	14,3	10,3	6,9	7,5	2,7	7,2	10,3	12,6	10,2	18,4	20,5	22,5

Bijlage I: Gegevens experiment invloed spoelen op effectiviteit snelle zandfilter

Dag		Maandag 27-2-2012			Dinsdag 28-2-2012		Woensdag 29-2-2012		Donderdag 1-3-2012		Vrijdag 2-3-2012
Tijdstip na start experiment in uren		t=0	t=44	t=8	t=24	t=32	t=48	t=56	t=72	t=80	t=96
Rendement concentratiemethoden (%)		Voor zuivering ^{a)}	29,3	-	-	13,6	-	7,1	-	27,9	8,3
		Na zuivering	46,2	56,2	23,2	14,7	126,5	22,3	31,2	45,8	44,2
Rendement interne controle (IC) DNA-isolatie en Q-PCR methode (%)	Voor zuivering ^{a)}	Pellet	34,4	-	-	60,4	-	67,3	-	56,9	58,6
		Supernatant	39,1	-	-	20,7	-	20,7	-	25,5	20,0
	Na zuivering	Pellet	31,6	39,0	25,7	36,6	36,5	28,2	25,9	45,6	58,1
		Supernatant	46,1	40,9	37,5	34,2	40,6	42,1	23,0	38,2	56,8
Somatische colifagen (pve/L)	Voor zuivering ^{a)}	Direct	1,0x10 ⁴	-	-	9,7x10 ³	-	1,1x10 ⁴	-	7,8x10 ³	8,5x10 ³
		Pellet	5,5x10 ²	-	-	7,0x10 ²	-	1,7x10 ³	-	8,1x10 ²	8,7x10 ²
	Na zuivering	Supernatant	9,5x10 ³	-	-	9,0x10 ³	-	9,3x10 ³	-	7,0x10 ³	7,7x10 ³
		Direct	1,9x10 ³	1,6x10 ³	1,7x10 ³	1,6x10 ³	9,0x10 ²	2,0x10 ³	1,8x10 ³	1,2x10 ³	1,5x10 ³
Fspecifieke RNA fagen (pve/L)	Voor zuivering ^{a)}	Pellet	3,5x10 ¹	1,3x10 ¹	2,0x10 ¹	2,7x10 ¹	1,2x10 ¹	1,4x10 ¹	2,3x10 ¹	2,4x10 ¹	1,5x10 ¹
		Supernatant	1,9x10 ³	1,6x10 ³	1,7x10 ³	1,6x10 ³	8,9x10 ²	2,0x10 ³	1,8x10 ³	1,2x10 ³	1,5x10 ³
	Na zuivering	Direct	<6,4x10 ⁻¹	-	-	<7,0x10 ⁻¹	-	2,8x10 ⁰	-	<3,8x10 ⁻¹	ntb
		Pellet	1,4x10 ²	-	-	7,7x10 ¹	-	5,9x10 ¹	-	3,5x10 ¹	1,1x10 ²
Adenovirussen (DNA kopieën/L)	Voor zuivering ^{a)}	Pellet	1,8x10 ⁰	5,4x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻¹	<6,3x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻¹	<4,1x10 ⁻¹	<3,0x10 ⁻¹	<2,1x10 ⁻¹	2,3x10 ⁻¹
		Supernatant	4,4x10 ¹	6,6x10 ¹	8,2x10 ²	7,5x10 ¹	2,4x10 ¹	5,6x10 ¹	2,6x10 ¹	1,2x10 ¹	4,2x10 ¹
	Na zuivering	Direct	9,2x10 ³	-	-	8,9x10 ³	-	3,0x10 ⁴	-	1,1x10 ⁴	8,9x10 ³
		Pellet	9,1x10 ³	-	-	4,8x10 ³	-	1,7x10 ⁴	-	1,2x10 ⁴	1,7x10 ⁴
	Na zuivering	Pellet	<1,4x10 ²	<8,8x10 ¹	<3,2x10 ²	<3,5x10 ²	<4,0x10 ¹	<3,0x10 ²	<2,4x10 ²	<9,2x10 ¹	<7,5x10 ¹
		Supernatant	4,4x10 ²	<4,6x10 ²	<9,1x10 ²	<3,2x10 ²	<1,4x10 ²	<8,3x10 ²	1,0x10 ³	<1,5x10 ²	<1,3x10 ²

^{a)} Het monster voor de zuivering is eenmaal per dag geanalyseerd.

ntb = niet te bepalen vanwege contaminatie.

