

BTO 2006.051
7 september

Verwijdering van *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens* en centrische diatomeeën door langzame zandfiltratie

Rapportage van een doseerproef



BTO 2006.051
7 september 2006

Verwijdering van *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens* en centrische diatomeeën door langzame zandfiltratie

Rapportage van een doseerproef

© 2006 Kiwa Water
Reserach
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

Kiwa Water Research
Groningenhaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

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

Colofon

Titel

Verwijdering van *Cryptosporidium parvum*,
Clostridium perfringens en centrische diatomeeën
door langzame zandfiltratie

Opdrachtgever

Waternet (K. Bosklopper¹) en BTO

Projectmanagers

Y.J. Dullemond¹
W.J.M.K. Senden²

Kwaliteitsborgers

Y.J. Dullemond¹
G.J. Medema²

Auteurs

Hijnen², W.A.M., Y.J. Dullemond¹, A.J. Brouwer-
Hanzens², M. Rosielle³, J.F. Schijven⁴ en G.J.
Medema²

¹ Waternet

² Kiwa Water Research

³ Het Waterleidinglaboratorium

⁴ RIVM

Voorwoord

Dit onderzoek is uitgevoerd in een samenwerkingsverband tussen Waternet Amsterdam¹, , Kiwa Water Research², Duinwaterbedrijf Zuid-Holland³, (DZH), RIVM⁴ en 'Het Waterlaboratorium' (HWL)⁵ en is gefinancierd door WLB, het BTO en NV Waterbedrijf Groningen.

De auteurs zijn dank verschuldigd aan Michel Collin¹, Karin Bosklopper¹, Meindert de Graaf², Carola Blokker², Aleksandra Magic⁵ en Wim Oorthuizen³ voor hun bijdragen aan dit onderzoek.

Samenvatting

Waternet Amsterdam is in de afgelopen jaren actief bezig geweest om de capaciteit van hun zuiveringen om micro-organismen te verwijderen te kwantificeren. Aanleiding hiervoor is het nieuwe Waterleidingbesluit waarin, voor bedrijven met oppervlaktewater als bron voor de drinkwaterbereiding, een kwantitatieve microbiologische risico analyse (QMRA) vereist is. De pathogene protozoa, *Cryptosporidium* en *Giardia*, zijn twee belangrijke indexpathogenen (VROM Richtlijn, 2005) waarvoor een dergelijke QMRA moet worden opgesteld.

Beide bedrijfsvestigingen van Waternet te Weesperkarspel en Leiduin hebben langzame zandfiltratie als laatste stap in de zuivering. In de QMRA's die tot dusver zijn gemaakt van beide vestigingen (Dullefont *et al.*, 2002; 2004), is voor de verwijdering van beide protozoa voornamelijk uitgegaan van de gegevens over de verwijdering van sporen van sulfiet-reducerende clostridia (SSRC) door de praktijkfilters zoals beschreven in de VROM Richtlijn. Onderzoek heeft echter de juistheid van het gebruik van SSRC als surrogaatparameter bij langzame zandfiltratie in twijfel getrokken (Hijnen *et al.*, 2004). Door ophoping van deze sporen en vertraagde doorbraak werd bij praktijkfilters op den duur een verlaagde SSRC verwijdering vastgesteld.

Om dit nader vast te stellen werd door Dullefont (2004) voorgesteld een aanvullend onderzoek te doen met als vraag wat de verwijderingscapaciteit van langzame zandfiltratie is voor oöcysten van *Cryptosporidium*, in vergelijking tot de verwijdering van SSRC en centrische diatomeeën. De laatste is een andere potentiële surrogaatparameter. Met de proefopzet zou tevens antwoord moeten worden gegeven op de vraag of ophoping en vertraagde doorbraak van oöcysten ook van invloed is op de verwijderingscapaciteit op langere termijn.

Hiervoor is een doseerexperiment uitgevoerd met een proeffilter van de proefinstallatie te Leiduin. Gedurende 3 maanden werd een constante hoeveelheid oöcysten van *Cryptosporidium*, sporen van *Clostridium perfringens* (SSRC) en cellen van *Stephanodiscus hantzschii* aan het influent gedoseerd en werd de concentratie in het filtraat bepaald met behulp van metingen in grote volumes. De monstername van het filtraat is verlengd om het vertraagde transport in het filterbed te bestuderen. Tevens zijn op twee momenten in de verlengde meetperiode van de totale looptijd van 250 dagen zandmonsters uit het filter onderzocht op de concentratie van genoemde organismen.

Uit de resultaten kan worden geconcludeerd dat de (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* effectief worden verwijderd door langzame zandfiltratie. De Decimale Eliminatie Capaciteit van het filter bedreven onder de bedrijfscondities van het zuiveringsproces Leiduin voor oöcysten is minimaal 4,7 log en zal voor de cysten van *Giardia* vergelijkbaar zijn.

Tevens is gebleken dat, waarschijnlijk door het optreden van predatie in het filterbed, er geen sprake is van ophoping en een vertraagde doorbraak van infectieuze oöcysten, die van invloed zou kunnen zijn op het infectierisico niveau op langere termijn. Dit proces is echter wel van invloed op de verwijdering van beide surrogaatparameters, de sporen van sulfiet-reducerende clostridia (SSRC) en centrische diatomeeën. Deze parameters zijn dan ook ongeschikt om de DEC van de langzame zandfilters voor de pathogene protozoa te bepalen onder praktijkcondities.

Tot slot strekt het tot de aanbeveling om de hypothese van predatie van oöcysten en ook andere micro-organismen nader te onderzoeken. Doel is om vast te stellen in welke mate dit proces bijdraagt aan de verwijdering in de langzame zandfilters en welke factoren dit proces beïnvloeden.

Inhoud

	Voorwoord	3
	Samenvatting	5
	Inhoud	7
1	Inleiding	9
2	Materialen en methoden	11
2.1	De opstelling	11
2.2	Meten in grote volumes: nieuwe concentratietechniek	11
2.3	Micro-organismen: suspensies en analysetechnieken	12
2.3.1	Cryptosporidium	12
2.3.2	Centrische diatomeeën: <i>Stephanodiscus hantzschii</i>	15
2.3.3	<i>Clostridium perfringens</i> sporen	17
2.4	De dosering	17
2.5	Monsterprogramma	19
2.6	Deeltjestelling en fysisch/chemische waterkwaliteit	19
2.7	Profielmeting: monsternamen en analyses	20
2.8	Verloop van het onderzoek	22
3	Bespreking van de resultaten	24
3.1	Problemen met de <i>Cryptosporidium</i> telling	24
3.2	De continue dosering van micro-organismen	24
3.3	Verwijdering van <i>Cryptosporidium</i>	27
3.4	Verwijdering van sporen van <i>Clostridium perfringens</i>	29
3.5	Verwijdering van <i>Stephanodiscus hantzschii</i>	31
3.6	Deeltjesverwijdering	32
3.7	Concentratie micro-organismen in het filterbed	33
3.7.1	Cryptosporidium	34
3.7.2	<i>Clostridium perfringens</i>	36
3.7.3	Centrische diatomeeën	37
3.7.4	Zoöplankton	38
3.7.5	Biochemische en fysisch-chemische samenstelling van het zand en de steunlaag	39
4	Algemene discussie en conclusies	41
4.1	Verwijdering en massabalans	41
4.1.1	Voorbelading en nalevering	41
4.1.2	Massabalans	43
4.1.3	Conclusies	45

4.2	Afname van het aantal geaccumuleerde micro-organismen in het filterbed	46
4.2.1	De afnamesnelheid	46
4.2.2	Desintegratie of predatie	48
4.2.3	Inactivatie	49
4.2.4	Conclusies	49
4.3	Vertaling naar <i>Giardia</i> cysten en onzekerheden	50
5	Eindconclusies en aanbeveling	51
6	Literatuur	52
	Bijlage 1 Lijst van afkortingen	56
	Bijlage 2 Literatuur overzicht eliminatiecapaciteit langzame zandfiltratie	57
	Bijlage 3 Technische gegevens van de opstelling	58
	Bijlage 4 Recovery kiezelwieren bepaling	59
	Bijlage 5 Fysisch/chemische waterkwaliteit	60
	Bijlage 6 Concentraties micro-organismen	61
	Bijlage 7 Analyseresultaten van <i>Cryptosporidium</i>	63
	Bijlage 8 Analyseresultaten van <i>C. perfringens</i>	69
	Bijlage 9 Analyseresultaten van de centrale diatomeeën	72
	Bijlage 10 Microbiologische gegevens profielen	74
	Bijlage 11 Fysisch/(bio)chemische resultaten	77

1 Inleiding

Kwantitatieve microbiologische risicoanalyse pathogene protozoa

Op grond van het nieuwe Waterleidingbesluit (2001) is een kwantitatieve microbiologische risicoanalyse vereist voor drinkwaterbedrijven die gebruik maken van oppervlaktewater als bron. Het gaat hierbij om gegevens over de aanwezigheid van pathogene micro-organismen in de grondstof en over de capaciteit van de zuivering om deze te verwijderen. De verwijdering van de (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia*, twee belangrijke indexpathogenen genoemd in de VROM Inspectierichtlijn (2004), is in de praktijk niet meetbaar. Hiervoor kan voorlopig de verwijdering van sporen van sulfiet-reducerende clostridia (SSRC; lijst met afkortingen in Bijlage 1) als model organismen worden gebruikt.

Dullefont (2002; 2004) is bij de microbiologische risicoanalyse van de beide productielocaties van WLB uitgegaan van verwijderinggegevens van deze sporen en voor Leiduin zijn deze gegevens aangevuld met gegevens over centrische diatomeeën. Deze laatst genoemde organismen zijn qua grootte beter vergelijkbaar met de (oo)cysten van beide protozoa en eerder als surrogaatparameter voorgesteld door Nobel *et al.* (2001). Voor SSRC werd een verwijdering van 2,5 (WPK) en 2,0 (LDN) log voor de processtappen koolfiltratie en langzame zandfiltratie gezamenlijk berekend op grond van een gering aantal positieve monsters in het eindproduct (Dullefont, 2002;2004). Net als voor de (oö)cysten werd een grote spreiding in verwijdering van de centrische diatomeeën door de langzame zandfilters gevonden van 1,1 tot 3,6 log. Dullefont (2004) concludeerde uit haar analyse dat de bruikbaarheid van zowel SSRC als de centrische diatomeeën als surrogaat voor de verwijdering van de pathogene protozoa in een apart onderzoek zal moet worden vastgesteld.

*Verwijdering van *Cryptosporidium* en *Giardia* door langzame zandfiltratie*

De Micro-organismen Eliminatie Credit (MEC) of Decimale Eliminatie Capaciteit (DEC) van de langzame zandfilters van WLB en DZH voor (oo)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* wordt geschat op respectievelijk >4 en 3,3 log (Hijnen *et al.* 2003). Deze schatting is gebaseerd op gegevens uit de literatuur en van aanvullende doseerproeven met kolommen (50 cm) gevuld met filtermateriaal afkomstig uit filters van beide bedrijven (Bijlage 2; literatuur overzicht). De belangrijkste onzekerheid bij deze MEC-waarden is de vraag of voor (oo)cysten van beide protozoa hetzelfde verschijnsel geldt als waargenomen voor de sporen van sulfiet-reducerende clostridia (SSRC): een lage MEC-waarde door toenemende ophoping, overleving en vertraagd transport (Hijnen *et al.*, 2004).

Aanvullend onderzoek: doelstelling

Op grond van de hierboven genoemde studies is besloten tot het uitvoeren van een aanvullende doseerproef met een proeffilter te Leiduin. De doelstelling van deze proef was het vaststellen van de eliminatiecapaciteit van langzame zandfilters voor *Cryptosporidium parvum*, sporen van sulfiet-

reducerende clostridia en kleine centrische diatomeeën (4 - 7 µm) onder gelijke condities.

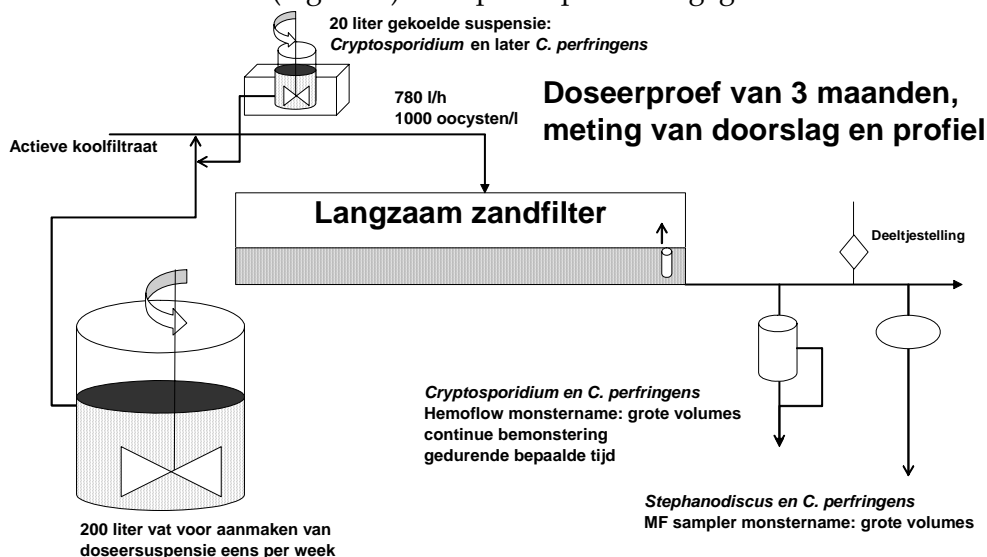
Opzet van het onderzoek en rapportage

Gezien de vraagstelling is gekozen voor een lange doseerperiode van enige maanden met een relatief lage concentratie en verlengde meting van de doorslag, gevolgd door het bepalen van het aantal opgehoopte organismen in het filterbed. De resultaten van het onderzoek zijn in dit rapport beschreven. Hoofdstuk 2 beschrijft de materialen en methoden, hoofdstuk 3 de resultaten en discussie en in hoofdstuk 4 worden deze verder geëvalueerd om daaruit conclusies te trekken en aanbevelingen te doen voor de risicoanalyse en verder onderzoek.

2 Materialen en methoden

2.1 De opstelling

De proef werd uitgevoerd met LZF1 van de proefinstallatie te Leiduin. In onderstaand schema (Figuur 1) is de proefopzet weergegeven.



*Figuur 1. De proefopzet voor het vaststellen van de eliminatiecapaciteit van een langzaam zandfilter voor *Cryptosporidium*, sporen van *C. perfringens* en centrische diatomeeën*

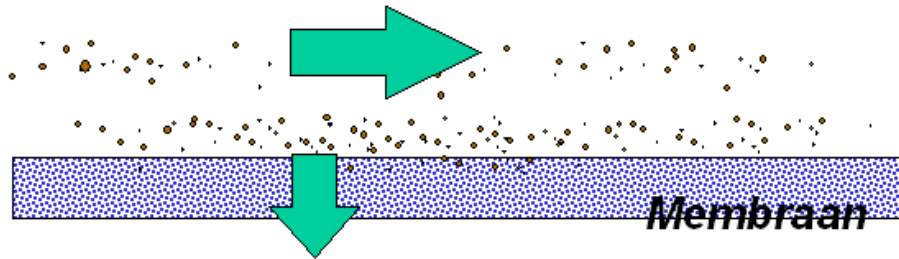
De technische details van het filter en de dosering zijn samengevat in Bijlage 3.

2.2 Meten in grote volumes: nieuwe concentratietechniek

Op grond van de verwachting dat de oöcysten nagenoeg volledig worden verwijderd, was het noodzakelijk het effluent te concentreren. Hiervoor is een nieuw ontwikkelde methode m.b.v. crossflow-filtratie (Figuur 2 en 3) toegepast (Simmons *et al.*, 2001). Voordelen van deze methode zijn (1) een hogere opbrengst voor de protozoën in vergelijking tot de gebruikelijke concentratietechniek en (2) er kunnen in het concentraat meerdere organismen worden bepaald.

Principe van de nieuwe techniek is dat de te meten organismen worden geconcentreerd in een suspensie en niet op een filter. Het concentraat kan volledig voor analyse worden gebruikt. In dit onderzoek is het grootste deel van het concentraat gebruikt om het aantal oöcysten te bepalen en een kleiner deel om het aantal SSRC te bepalen.

Hoge snelheid langs het membraan om verstopping te voorkomen.



Lage snelheid door het membraan.

Figuur 2. Principe van crossflow-filtratie



Figuur 3. Hemoflow-filtratie

2.3 Micro-organismen: suspensies en analysetechnieken

2.3.1 *Cryptosporidium*

De suspensies

Een suspensie van *C. parvum* oöcysten (2×10^9) opgekweekt in lammeren (cervine origin) is geleverd door Moredun in 5 buizen met 50 ml waterdunne feces; geschat aantal oöcysten per buis 4×10^8 . Om het materiaal te zuiveren van grote deeltjes is een eerste buis van 50 ml gefiltreerd over een gaasje met een maaswijdte van >10 micron. Het materiaal bleek qua consistentie dikker dan eerder materiaal opgekweekt in kalveren (bovine; Nobel *et al.*, 2005). De filtratie leverde uiteindelijk slechts 10 ml filtraat op. Er werd besloten de vaste delen in het filtergas te ontsluiten met 2x ca. 80 ml laureth-12 buffer (pH 7,6). Het eluaat is vervolgens opgemengd met het filtraat tot een totaal volume van 175 ml oöcysten suspensie (A).

Omdat er microscopische aanwijzingen waren dat de toegepaste voorbehandeling met laurethbuffer clustervorming had veroorzaakt, werd besloten een nieuwe buis met een gewijzigde procedure op te werken. De suspensie van 50 ml lammeren feces uit 1 buis is opgewerkt door het te filtreren over achtereenvolgens 500, 300 en 100 μm planktongaas. Het filtraat is opgevangen in een schone steriele fles. De planktongazen zijn nagespoeld met steriel leidingwater en dit water is aan het filtraat toegevoegd. Deze suspensie is 30 minuten geschud met de S50 cat en vervolgens 30 minuten weggezet voor bezinking; de zware delen zakten naar de bodem. De bovenstaande vloeistof is afgeschonken in een steriele fles (opvangfles). De

buis met het residu (zwarte delen) is tweemaal met steriel leidingwater uitgewassen; hiertoe is het residu tweemaal aangevuld met water tot een volume van 200 ml en opnieuw 30 minuten geschud. Na 30 minuten bezinking is de bovenstaande vloeistof afgeschonken en toegevoegd aan het filtraat. Deze totale suspensie werd gedurende 10 minuten gecentrifugeerd (4000 rpm) en de pellet is in steriel leidingwater gebracht en vervolgens 30 minuten geschud. In deze suspensie is het aantal oöcysten geteld. Dit heeft uiteindelijk een suspensie van 120 ml opgeleverd met een totaal aantal oöcysten van $4,5 \times 10^8$ (suspensie B). Deze procedure is toegepast op het resterende deel van de oorspronkelijk geleverde suspensie.

Omdat er van de oorspronkelijk geleverde suspensie een deel verloren was gegaan moest aan het einde van de proef nieuw materiaal worden aangeschaft. De consistentie van dit materiaal (suspensie C) bleek voldoende dun om na zeping als hierboven beschreven maar zonder verdere voorbehandeling te kunnen doseren (aantal $1,1 \times 10^8$ en $1,7 \times 10^8$ per 50 ml). Omdat de suspensie echter onvoldoende oöcysten bevatte is een tweede suspensie geleverd voor een voldoende hoge dosering in de laatste week.

Inactivatie door UV-bestraling

De oöcystensuspensie werd vooraf met UV-licht bestraald in de collimated beam opstelling van Kiwa. Van de suspensie is vooraf de UV-transmissie bepaald om vervolgens daaruit de bestralingstijd te berekenen voor een dosis van 10 mJ/cm^2 .

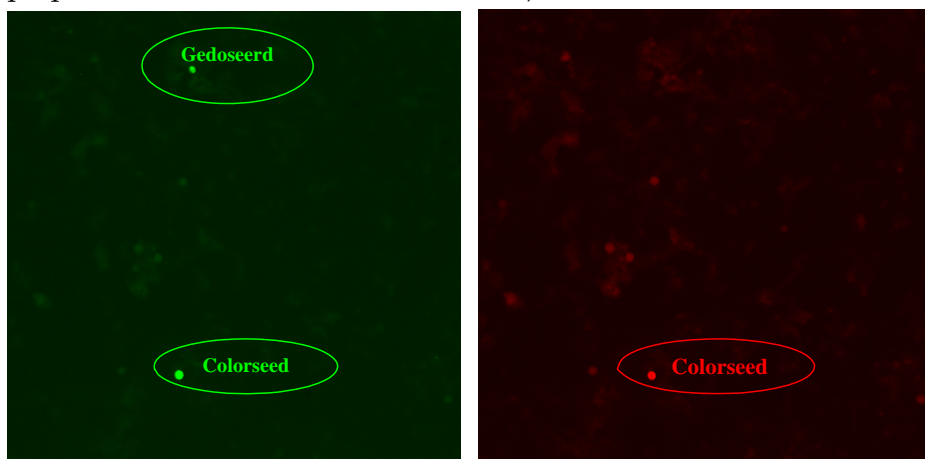
Analysetechniek

Het analysevoorschrift voor *Cryptosporidium* is afgeleid van CEN CT 97-2146 en EPA Method 1623 voor het bepalen van het aantal oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia* in water. Voor de analyse in grote volumes is gebruik gemaakt van een concentratietechniek met cross-flow-filtratie (Hemoflow).

Aan een monster of het concentraat van een groot-volumemonster werd 5 ml suspensie met een bekend aantal gelabelde (roodfluorescerende) (oö)cysten van *Cryptosporidium parvum* ($99 \pm 1,6$; stam IOWA, bovine) en *Giardia* (100) (Colorseed™; BTF Australia) gedoseerd. Het concentraat werd standaard aangevuld tot een volume van 800 ml waarvan een deel werd gebruikt voor de *C. parfringens* bepaling (meestal 50 ml). De resterende hoeveelheid concentraat werd door centrifugeren teruggebracht tot ca. 10 ml voor verdere behandeling.

De (oö)cysten in het monster of concentraat werden gezuiverd met immunomagnetische separatie (IMS). De in bewerking genomen hoeveelheid concentraat in gram (B_2) wordt berekend vanuit het gewicht van het concentraat in de buis (B_1) min het concentraat dat in de buis is achtergebleven na legen (B_3): $B_2 = B_1 - B_3$ beiden gecorrigeerd voor het leeggewicht van de buis. De geadsorbeerde (oö)cysten werden vervolgens met HCl (1 N) van de beads gescheiden. Het residu is geneutraliseerd (KOH; 1 N), op een filter gebracht en gelabeld met een fluorochroom (FITC). Na incubatie werd het gehele oppervlak van het filter door de Chemscan gescand en de gevonden spots werden met een epifluorescentie-microscop bevestigd aan de hand van specifieke kenmerken (grootte, morfologie, specifieke

fluorescentie en karakteristieke kleuring van de celinhoud; Figuur 4). Gedurende de eerste weken van het onderzoek werden alle preparaten, ook die van de doseersuspensie en het influent, met de Chemsan geteld. Uit de gegevens bleek dat de resultaten onbetrouwbaar waren en werd er overgestapt op directe telling van de preparaten (Dynal) m.b.v. epifluorescentie-microscopie (ook de eerder met de Chemsan getelde preparaten werden met de hand herteld).



Figuur 4. Microscopische opname van gelabelde (oo)cysten: (a) alle oöcysten en (b) alleen colorseed (oo)cysten

Berekening van de concentratie (gecorrigeerd voor de recovery).

De recoveryfactor R van de bepaling in een monster of in het concentraat van een groot-volumemonster werd berekend door het aantal getelde Colorseed oöcysten N_{color} te delen door het aantal vooraf vastgesteld in de geleverde vials met Colorseed ($99 \pm 1,6$):

$$R = \frac{N_{color}}{99} \quad (1)$$

De recovery is voor een groot aantal monsters bepaald en in het geval dat deze niet is bepaald, werd de gemiddelde R-waarde genomen.

De concentratie oöcysten in het influent (n/l) werd berekend uit het aantal oöcysten waargenomen in het preparaat $N_{c,i}$, het onderzochte volume V_i en de recovery in dit monster R_i

$$C_i = \frac{N_{c,i}}{V_i} * R_i \quad (2)$$

De concentratie in een effluentmonster C_e (n/l) met een groot volume V_e (liter; effluent van het filter) werd berekend met de volgende formule:

$$C_e = \frac{N_{c,e}}{V_e * (B_2/B_1)} * R_e \quad (3)$$

waarin $N_{c,e}$ het aantal getelde oöcysten in het preparaat is en B_2/B_1 de verhouding tussen de hoeveelheid in bewerking genomen concentraat B_2 en de hoeveelheid oorspronkelijk concentraat B_1 en de recovery in dit monster

R_e . Het volume V_e is berekend uit het totaal bemonsterde volume V_t gecorrigeerd voor de hoeveelheid concentraat die is gebruikt voor de *C. perfringens* bepaling (C_{cp} ; meestal 50 ml van het totale concentraat volume C_t van 800 ml):

$$V_e = V_t * \frac{(C_t - C_{cp})}{C_t} \quad (4)$$

De gemiddelde concentratie in het effluent is berekend uit:

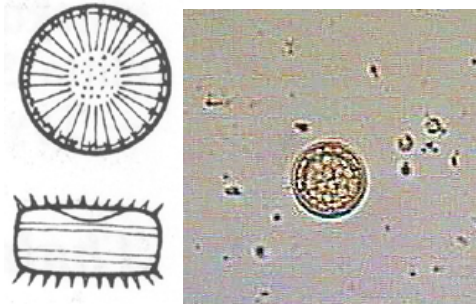
$$\bar{C}_e = \frac{\sum N_{c,e}}{\sum V_e * \left(\frac{\bar{B}_2}{\bar{B}_1} \right)} * \bar{R}_e \quad (5)$$

2.3.2 Centrische diatomeeën: *Stephanodiscus hantzschii*

De suspensies

In de aanloop van de proeven is bij Kiwa gepoogd een voldoende dichte suspensie van losliggende cellen *Stephanodiscus hantzschii* (Figuur 5) op te kweken zoals dat in eerder onderzoek was gedaan (Chung *et al.*, 2004). In tegenstelling tot in dit eerdere onderzoek, bleek de cultuur niet goed te groeien, ondanks dat dezelfde groeicondities werden toegepast. Er werd een beperkte groei geconstateerd tot een dichtheid die onvoldoende was voor toepassing in het onderzoek.

Er werd besloten de leverancier van de cultuur, Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP; SAMS Research Services Ltd. Dunstaffnage Marine Laboratory), te vragen om één suspensie per week te leveren met een totale hoeveelheid van $1,5 \times 10^8$ cellen. De eerste geleverde suspensie van 80 ml werd microscopisch geschat op een concentratie van $2,5 \times 10^6$ per ml (microscopische telkamer). Deze is gebruikt voor de eerste twee weken van het onderzoek. In de vervolgperiode werd wekelijks een suspensie van ca. 50 ml met ongeveer dezelfde dichtheid (ca. $1-2,5 \times 10^6$ /ml) besteld voor de rest van het onderzoek. Iedere zending werd voor dosering visueel en microscopisch beoordeeld en het grootste deel werd toegepast voor dosering. Het bleek dat de suspensie niet altijd van dezelfde kwaliteit was. Een enkele keer was de dichtheid onvoldoende en er werden ook twee suspensies geleverd die sterk geocoaguleerd waren. Door verdergaande incubatie gedurende 1-2 weken kon dichtheid van de dunne suspensies worden opgevoerd en konden deze worden gebruikt. De twee geocoaguleerde suspensies werden niet gebruikt, maar daarvoor in de plaats werd reservemateriaal van eerdere suspensies gebruikt dat gedurende de experimenten was verzameld.



Figuur 5. *Stephanodiscus hantzschii* (grootte van de cellen uit de cultuur is 3-7 micron)

Voorbehandeling van de suspensie

Omdat bleek dat vóór de dosering het aangevoerde water diatomeeën bevatte met dezelfde grootte als de cellen van *Stephanodiscus*, rees de vraag wat de herkomst was van de diatomeeën die in het filtraat werden gevonden: natuurlijke achtergrond of gedoseerde cellen? Om dit verder te onderzoeken werden gedurende een beperkt aantal weken de gedoseerde diatomeeën gekleurd met DAPI, een fluorescerende verbinding die bindt aan DNA. Uit vooronderzoek bleek dat de algencellen met DAPI onder een fluorescentiemicroscopie zichtbaar gemaakt konden worden. Door nog onbekende reden bleek de kleuring in de praktijk echter niet geschikt; in het influent werden geen gekleurde algencellen waargenomen. De kleuring is daarom gestaakt.

Analysetechnieken

Voor analyse van diatomeeën in het effluent werd ook een concentratie toegepast met de MF-sampler (Hijnen *et al.*, 2000). De afgevangen organismen werden vervolgens van het filter verwijderd m.b.v. ultrasoon trillen (2 minuten) en in een suspensie gebracht (concentraat). In Bijlage 4 zijn de resultaten vermeld van de recoverybepaling van deze techniek. Deze was hoog, gemiddeld 74% (53-100%).

De specifieke eigenschap van deze organismen is een verkiezelde buitenwand, waardoor bezinking als verdere concentratiemethode mogelijk wordt. Het te onderzoeken water werd geconserveerd met een KJ-oplossing en ethanol en overgebracht in cuvetten (Hydrobios) met verschillende inhoud. Na inachtneming van een zekere bezinktijd werden de diatomeeën of kiezelwieren geteld bij een vergroting van 400 maal met behulp van een omkeermicroscopie.

Monsters en telling

Er zijn monsters genomen van het water voor en na de dosering van de *Stephanodiscus hantzschii* suspensie en van het filtraat (MF-sampler). Bij de tellingen in het water voor de dosering werd onderscheid gemaakt tussen de diatomeeën met een grootte van <4, 4-7, 7-13 en >13 µm. Het influent na de dosering en het effluent van het zandfilter werden beoordeeld op de aanwezigheid van diatomeeën zoveel als mogelijk gelijkend op de gedoseerde cellen (qua grootte en vorm). Deze diatomeeën vallen in de grootteklasse van 4-7 micron.

Berekening van de concentratie

Voor het influent met en zonder dosering en het effluent werd de concentratie berekend aan de hand van het aantal getelde diatomeeën in het volume van een bezinkcuvette vermenigvuldigd met de concentratiefactor.

2.3.3 *Clostridium perfringens* sporen

De suspensie

Voor de proef werden sporen gebruikt uit een suspensie van *C. perfringens* stam D10 (6 april 2004; 175 ml) met een totaal aantal van $2,2 \times 10^9$ sporen. Deze suspensie werd aangemaakt volgens een eerder beschreven procedure [Hijnen *et al.*, 2002]. Iedere week werd een volume van 13 ml van deze suspensie voor het onderzoek gebruikt.

Analysetechniek

Er zijn twee analysetechnieken toegepast.

- Methode A: De influent- en effluentmonsters (deel van het concentraat) zijn 15 min. gepasteuriseerd bij $60 \pm 1^\circ\text{C}$ (*C. perfringens* analyse; NEN-ISO6461-2) en geïncubeerd op Perfringens Agar Base (PAB) gedurende 48 ± 4 uur bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Methode B: De membraanfilters zijn 30 min. gepasteuriseerd bij $70 \pm 1^\circ\text{C}$ (SSRC bepaling; NEN6567) en geïncubeerd op SFP-medium (Difco) gedurende 48 ± 4 uur bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

De zwarte kolonies zijn geteld en kunnen worden omschreven als sporen van sulfiet-reducerende clostridia (SSRC).

Moleculaire identificatie

Een Real-time PCR methode is gebruikt voor het specifiek typeren van SSRC kolonies op *Clostridium perfringens*. Hiervoor werd celmateriaal uit individuele zwarte kolonies geïsoleerd en gebruikt voor het uitvoeren van een Real-time PCR-reactie. Een deel van het gen dat codeert voor het A-toxine van *C. perfringens* werd geamplificeerd met specifieke primers (Yoo *et al.*, 1997) om de aanwezigheid van *C. perfringens* te bevestigen; het A-toxine gen komt alleen voor bij *C. perfringens* en niet bij andere *Clostridium*soorten.

2.4 De dosering

Bij de start van de proef is de concentratie in het bovenwater direct op de gewenste concentratie gebracht.

- Van de bestraalde oöcystensuspensie werd $2 \times 0,67$ ml gemengd in 2×1 liter bovenwater van het filter. Beide flessen zijn op twee verschillende plaatsen van het filter gedoseerd aan het bovenwater en direct opgemengd. Deze procedure is eenmalig en wordt tijdens het verloop van de proef niet meer herhaald.
- 1 ml van een *Stephanodiscus*suspensie werd gebruikt om aan het bovenwater toe te voegen.
- $2 \times 0,12$ ml *C. perfringens* suspensie in 2×1 liter filtraat van het filter werd geënt en met het bovenwater gemengd.

De oöcysten suspensie A, de *Stephanodiscus* suspensies en 13 ml van de *C. perfringens* suspensie werden gedoseerd aan 150 liter LZF-filtraat in het 200 liter vat (figuur 6). Deze 150 liter suspensie wordt vervolgens met een snelheid van 13 ml/h aan het influent gedoseerd gedurende een periode van 7 dagen. Deze doseerwijze is in de eerste twee weken van het onderzoek toegepast voor alle organismen.

Omdat bleek dat de suspensie met oöcysten vervuiling van het vat tot gevolg had (vervuilde wanden en stankproductie) werd besloten om de *Cryptosporidium* suspensie gekoeld te gaan doseren uit een kleiner vat. Een RVS-vat van 25 liter werd geplaatst in een koelbox die continu gevuld werd met smeltend ijs. Aan 20 liter Demi-water in dit vat werd de *Cryptosporidium* suspensie B/C toegevoegd en met een snelheid van 1,7 ml/uur aan het influent gedoseerd (Figuur 7). Beide oplossingen in het grote en kleine vat werden continu geroerd. Om een optimale dosering te waarborgen werd tevens besloten wekelijks de doseerslangen van beide doseervaten te vervangen.

Omdat er aanwijzingen waren dat de dosering in combinatie met de diatomeeën van invloed was op het aantal sporen in het aangevoerde water, werd in week 10 besloten om de sporen te doseren vanuit het kleine vat samen met de oöcysten.



Figuur 6 Het 200-liter vat voor de dosering van micro-organismen



*Figuur 7. Het kleinere gekoelde vat waaruit *Cryptosporidium* en later ook de sporen werden gedoseerd*

2.5 Monsterprogramma

Controle van de dosering.

Bij aanvang van het experiment is de dosering van micro-organismen gecontroleerd door monsters van de aangemaakte doseersuspensie te analyseren, het influent, direct bemonsterd uit de aanvoerleiding, en het bovenwater van het filter. Vanwege problemen met de analysetechniek (Chemscanresultaten ware onbetrouwbaar laag) zijn er bij aanvang van het onderzoek veel monsters geanalyseerd, meer dan vooraf gepland. Gedurende de laatste 5 weken van de dosering werden de concentraties oöcysten en sporen in het bovenwater bepaald na 1 en 7 dagen looptijd van de dosering. Dit om na te gaan of er tijdens de duur van de dosering van een suspensie een daling van de concentratie optrad.

Effluent concentratie.

Wekelijks werd tijdens de looptijd van de dosering een groot-volumemonster onderzocht op oöcysten, sporen van sulfiet-reducerende clostridia en centrische diatomeeën. Na beëindiging van de dosering werd de monsternamerequentie verlaagd, afhankelijk van de doorslag van eens per week naar eens per maand.

2.6 Deeltjestelling en fysisch/chemische waterkwaliteit

Er zijn in het onderzoek twee deeltjestellers gebruikt op basis van het meetprincipe van lichtblokkade. Beide instrumenten zijn vooraf gekalibreerd.

Deelmonsters

Met de Water Grab Sampler (model WGS-267) met geïntegreerde pomp zijn deelmonsters genomen van influent en effluent van het filter. Het aantal deeltjes werd geteld in een volume van 50 ml en onderverdeeld in de grootteklassen 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-30 en >30 μm . De ondergrens van deze meter is 1 μm .

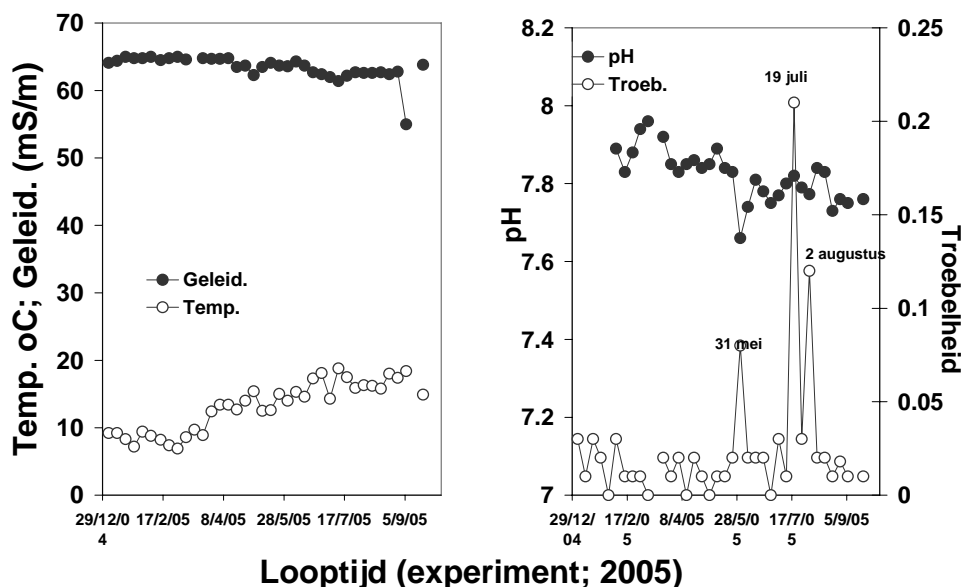
On-line monitoring

Daarnaast is een on-line deeltjesteller geplaatst op het effluent, de Met-one PCX-10. Deze telde elke minuut het aantal deeltjes in een volume van 50 ml

onderverdeeld in de grootteklassen <2, 2-3, 3-5, 5-7, 7-10 en >10 μm . De ondergrens van deze meter is 1,2 μm .

Temperatuur, elektrisch geleidingsvermogen, pH en troebelheid

Tijdens het onderzoek zijn een aantal fysisch/chemische parameters van het aangevoerde water bepaald. De gegevens zijn vermeld in Bijlage 5 en de resultaten zijn weergegeven in figuur 8.



Figuur 8 Fysisch-chemische waterkwaliteit tijdens het onderzoek

2.7 Profielmeting; monsternamen en analyses

Monsternamen

Het filterbed was verzadigd met water bij de monsternamen (door het water af te laten tot op het oppervlak). De bemonstering van het bedoppervlak werd uitgevoerd met een platte schep waarmee een monster van de bovenlaag van ca. 0,3 cm werd afgeschepd (figuur 9). De monsters van de diepere lagen zijn genomen met een slibsteek apparaat (figuur 9; veenboor, Eijkelkamp, Giesbeek). Er werd in eerste instantie besloten een diepte tot 50 cm te bemonsteren op twee locaties om daarna het filterbed weer gewoon in productie te nemen. Na beëindiging van de proef werden ook monsters van de diepere lagen, van het nicolondoek boven de steunlaag en van de steunlaag genomen.

Microscopische screening zandkorrels op *Cryptosporidium*.

Om een eerste indruk te krijgen van de aantallen oöcysten op de zandkorrels, zijn van de filtersteken de zandmonsters direct onder de schmutzdecke microscopisch beoordeeld (eerste en tweede profielmeting). Hiertoe is een dun laagje nagellak in het welletje van een dynal glaasje aangebracht waarop een zandmonster m.b.v. een objectglaasje is gefixeerd. Losse korrels werden daarna verwijderd. Het zand is gekleurd met 100 μl conjugaat en vervolgens geïncubeerd gedurende 2 uur bij 37°C in een vochtige omgeving. Het overtollige conjugaat is van het monster verwijderd en er werd 10 μl mouting

fluid aangebracht. Het behandelde monster werd met een objectglaasje en nagellak gefixeerd voor verdere microscopische beoordeling (fluorescentiemicroscop). Het aantal zandkorrels dat per preparaat is gescreend wordt geschat op ca. 500.



Figuur 9. Monsternamen van het filterbed (links het schraapmonster en rechts de filtersteek)

(Micro)biologische analyses

Een hoeveelheid zand van het mengmonster werd in 100 ml steriel (drink)water gebracht en gedurende 2 minuten behandeld met ultrasonische trilling (laag energetisch Branson sonicator unit 5050). 50 ml van deze suspensie werd gebruikt voor de bepaling van het aantal oöcysten en in de rest 50 ml werd ATP en het aantal sporen en centrische diatomeeën bepaald.

- ***Cryptosporidium***. Een beperkt aantal monsters (4) is ook onderzocht in 100 ml laureth-buffer (elutie-vloeistof gebruikt bij de *Cryptosporidium*analyse vlgs. EPA methode 1623). Voor de recovery-bepaling van de oöcysten bepaling werd een buisje Colorseed™ aan de suspensie toegevoegd voordat dit monster werd voorgezuiverd met IMS.
- **SSRC**. Een deel van de suspensie werd onderzocht op SSRC als hiervoor beschreven.
- **Centrische diatomeeën**. Het aantal diatomeeën werd bepaald door 50 ml van de suspensie in cuvetten te laten bezinken, af te hevelen en het concentraat met de omkeermicroscop te tellen.
- **ATP-gehalte**. Van de suspensie werd tevens het gehalte adenosinetrifosfaat bepaald als maat voor de hoeveelheid levende biomassa.

- **Zoöplankton monsters.** Na het beëindigen van het onderzoek is het filterbed afgegraven om monsters van 0,5 kg te nemen van het filterbed op 0-5, 50 en 100 cm diepte en van nicolondoek en de grindlaag hieronder. In de zandmonsters werd zoöplankton geteld. 30 gram zand werd intensief in water gemengd en de organismen werden van het zand gescheiden door bezinking in MgSO₄ oplossing (49 g/l) in een Anderson glas buis. Na 15-20 minuten werd een monster van ca. 800 ml genomen uit achtereenvolgens het bovenste en onderste monsterpunt op de buis. Na zeving door gaas (30 µm) werd met een telkamer het aantal organismen geteld en geïdentificeerd.
- **Analyse nicolondoek en grind.** Hierin zijn dezelfde microbiologische analyses uitgevoerd door een bepaald doekoppervlak of gewicht aan grind in ca. 250 ml steriel water 3 maal ultrasoon te behandelen. In de verkregen suspensie werden de volgende analyses uitgevoerd: Cryptosporidium, SSRC, ATP, heterotrofe koloniegetal op R2A medium en lang incuberen (10 dagen) bij 25°C, directe microscopische celtelling en non-purgeable DOC (NPOC).

Fysisch/chemische analyses.

Van een aantal zandmonsters zijn tevens een aantal fysisch/chemische analyses uitgevoerd: Thermogravische residuen bij 105, 450, 1000°C, pH H₂O en EGV H₂O, vrij ijzer (Fe), Mangaan en Aluminium, totaal organische C, N, S d.m.v. pyrolyse, korrelgrootte-analyse en Calcium. De methoden zijn beschreven door Stuyfzand en van der Jagt (1997).

2.8 Verloop van het onderzoek

In onderstaande Tabel 1 is een chronologisch overzicht gegeven van het verloop van de doseerproef en de overige activiteiten.

Tabel 1 Overzicht van het onderzoek

Week	datum 2005	Dosering			Opmerkingen
		Crypto	C. perf.	Steph.	
1	14/02	+	+	+	Cryptosuspensie niet goed
2	21/02	+	+	+	Cryptosuspensie niet goed
3	28/02	+	+	+	Nieuwe opgewerkte suspensie; kleiner gekoeld vat
4	7/03	+	-	-	Dinsdag: slang niet in pomp van sporen en diatomeeën
5	14/03	-	+	+	Vanwege telproblemen dosering Crypto 1 week
6	21/03	+	+	+	Dosering Crypto opnieuw gestart
7	28/03	+	+	+	
8	4/4	+	+	+	DAPI-kleuring diatomeeën
9	11/4	+	+	+	
10	18/4	+	+	+	Sporen gedoseerd aan Crypto-vat
11	25/4	+	+	+	Kleuring diatomeeën gestopt
12	2/5	+	+	+	
13	9/5	+	+	-	Geen diatomeeën dosering (geen suspensie geleverd)
14	16/5	+	+	+	
15	23/5	-	-	+	Piekdosering diatomeeën van 24 uur
16-42	-	-	-	-	Vervolgmetingen filtraat: dubbele analyse Crypto (Envirocheck en Hemoflow)
33	15/8	-	-	-	Eerste profielmeting in het filterbed

43	24/10	-	-	-	Tweede profielmeting in het filterbed
44	2/11	-	-	-	Monsternamen filterbed voor zoöplankton nicolondoek en steunlaag

3 Bespreking van de resultaten

In dit hoofdstuk worden de meetresultaten van de proef besproken. Allereerst wordt ingegaan op de meetgegevens van de dosering om een goede schatting te kunnen maken van het totale aantal gedoseerde organismen tijdens de doseerperiode. Vervolgens wordt per organisme de concentratie in influent en effluent gepresenteerd om daaruit de verwijdering te berekenen. Tot slot wordt de accumulatie in het filterbed beschreven die aan het eind van het onderzoek is bepaald.

In de Bijlage 6 zijn gedetailleerde gegevens van de concentraties micro-organismen samengevat en in Bijlagen 7, 8 en 9 zijn de ruwe meetresultaten vermeld van respectievelijk, *Cryptosporidium*, *C. parfringens* en centrische diatomeeën.

3.1 Problemen met de *Cryptosporidium* telling

Bij de aanvang van het onderzoek waren er problemen met het tellen van de oöcysten. Deze problemen werden veroorzaakt door het gebruik van de Chemsan, een image-analyzer. In het vervolg is overgestapt op handmatige tellingen. In de berekeningen zijn alleen deze tellingen meegenomen.

3.2 De continue dosering van micro-organismen

Gemiddelde concentraties in het doseervat

De concentratie sporen van *C. parfringens* en oöcysten van *Cryptosporidium* in het doseervat zijn gedurende de doseerproef een aantal malen bepaald. Omdat het hier ging om monsters met hoge concentraties en er geen concentratie nodig was voor de telling van de oöcysten, is geen recovery gemeten. Beide organismen zijn in eerste instantie gedoseerd vanuit het grote ongekoelde en later vanuit het kleine gekoelde doseervat; voor beide situaties zijn de waarden berekend (tabel 2). Om een indruk te krijgen van de variatie in concentratie is de relatieve standaardafwijking bepaald. Deze was voor de dosering van oöcysten vanuit het kleine doseervat lager dan in de periode van dosering vanuit het grotere vat (slechts 2 metingen). Voor de sporen was de spreiding in beide vaten echter even hoog. De concentratie diatomeeën in het grote doseervat is slechts eenmaal bepaald. Op 16 februari was de concentratie in het grote doseervat $7,07 \times 10^5$ per liter.

Tabel 2. Concentraties oöcysten van *Cryptosporidium* en sporen van *C. parfringens* (n/l) in het doseervat

Organismen	Periode	Gemiddeld	Rel STD%	n
<i>Cryptosporidium</i>	Groot/ongekoeld	$5,5 \times 10^5$	103,6	2
	Klein/gekoeld	$6,6 \times 10^6$	35,7	9
<i>C. parfringens</i>	Groot/ongekoeld	$5,7 \times 10^6$	122,8	13
	Klein/gekoeld	$8,1 \times 10^6$	116	8

Bij aanvang van het onderzoek is een enkele keer gemeten wat het effect van de doseerslang was op de concentratie sporen en oöcysten was (tabel 3). De resultaten gaven geen aanleiding te veronderstellen dat de doseerslang een verlaging van de concentratie in het influent zou veroorzaken. Voor een goed beeld van de hoeveelheid gedoseerde organismen worden in dit rapport alleen de gemeten concentraties in influent en bovenwater genomen die hierna worden besproken.

Tabel 3. Concentraties sporen en oöcysten in suspensie in het vat en na de doseerslang

Dag	In vat	na doseerslang
	SSRC	
0	4,7x10 ⁵ (±1,0x10 ⁵)	6,1x10 ⁶ (±6,9x10 ⁶)
7	4,4x10 ⁵ (±6,7x10 ⁴)	2,3 ⁶ (±1,0x10 ⁶)
14	2,1x10 ⁶ (±3,3x10 ⁵)	2,6x10 ⁶ (±1,6x10 ⁶)
	<i>Cryptosporidium</i>	
21	6,7x10 ⁶ (±1,2x10 ⁶)	- ^a
23	-	6,6x10 ⁶
28	1,2x10 ⁷	-

^a niet bepaald

Gemiddelde concentratie in het influent en bovenwater

Op grond van de bedrijfsgegevens in ruw water en water na snelfiltratie, de aanvoer van de proefinstallatie (bijlage 6), kan worden aangenomen dat de concentratie natuurlijke oöcysten en SSRC in het influent van het proeffilter verwaarloosbaar is (< 1 per 1000 liter). Dat ligt anders voor de centrische diatomeeën (bijlage 6) en daarom is voor dit micro-organisme gedurende een periode van het onderzoek de concentratie kleine diatomeeën (4-7 µm) voor dosering ook bepaald.

Om een goed beeld te krijgen van de dosering is de concentratie in het aangevoerde water bepaald direct uit de aanvoerleiding (influent) maar ook in het bovenwater waar de verblijftijd van het water ca. 4 uur is. De meeste monsters zijn genomen nadat er een nieuw doseervat was aangesloten. In de laatste periode van 5 weken is de concentratie van de sporen en de oöcysten in het bovenwater bepaald 1 dag en 7 dagen na het aansluiten van een nieuw vat. Uit deze gegevens komt naar voren dat de concentratie oöcysten en sporen in het bovenwater afneemt gedurende het doseren van een suspensie (tabel 4). Voor *Cryptosporidium* is het verloop minder groot dan voor de sporen van *C. parfringens*. Een duidelijke oorzaak voor dit verloop is niet te geven. Hechting aan de doseerslang lijkt op grond van eerder gegeven resultaten niet aannemelijk maar is niet volledig uit te sluiten. Mogelijk dat de concentratie in het doseervat gedurende de 7 dagen afneemt.

Tabel 4. Verhouding tussen de concentratie oöcysten en sporen in het bovenwater na 1 en 7 dagen doseren (C₁/C₇) vanuit hetzelfde doseervat

Week	<i>Cryptosporidium</i>	<i>C. parfringens</i>
10	1,2	1,5
11	1,2	13,3
12	1,7	2,1
13	2,0	2,2

In tabel 5 zijn de gemiddelde concentraties oöcysten, sporen en diatomeeën (n/l) in influent en bovenwater vermeld. Voor de oöcysten zijn de waarnemingen die hier zijn vermeld gecorrigeerd voor de recovery van de meting van 70,6±13% (n = 25) die is bepaald met gedoseerde colorseed. De concentraties oöcysten in influent en bovenwater waren niet significant verschillend (Bijlage 5; P = 0,627). Voor de clostridiasporen was de concentratie in influent een factor 2 hoger dan in het bovenwater (Bijlage 5; t-toets, P = 0,025). Op grond hiervan is voor de oöcysten een gemiddelde aanvoerconcentratie berekend uit de waarden gemeten in het bovenwater en het influent en zijn voor de clostridia alleen de bovenwaterconcentraties genomen voor de berekening. De oorzaak van het verschil is onduidelijk. Een relatie met de hiervoor geconstateerde afname tijdens de doseerperiode van een week (tabel 4) is aannemelijk. De concentratie kleine diatomeeën (4-7 µm) is gemeten voor en na de dosering van *S. hantzschii* (alleen in het bovenwater). Uit de gegevens blijkt dat het achtergrondniveau van natuurlijke diatomeeën voor de dosering dermate hoog was (tabel 5) dat dit van invloed is geweest op de resultaten van het onderzoek (wordt later nader besproken).

Tabel 5. Gemiddelde concentraties oöcysten (gecorrigeerd), sporen en diatomeeën (n/l) in het aangevoerde water (influent en/of bovenwater)

	<i>n</i> ^a	Totaal ^b monster Vol. (l)	Totaal aantal organismen	Conc. n/l	STD	Rec. ^c %	Conc. ^d n/l
<i>Cryptosporidium</i>	33	3,3	733	222,1	113,9	70,6	314,7
SSRC/ <i>C. perfringens</i>	20	2,0	2270	1135,0	1014,8	nvt	nvt
Diatomeeën 4-7 µm ^e	21	1,51	140	92,9	889,4	nvt	nvt
Diatomeeën 4-7 µm ^f	17	0,98	274	279,6	92,8	nvt	nvt

^a n = aantal monsters; ^b totaal bemonsterd volume; ^c recovery Colorseed; ^d gecorrigeerde concentratie; ^{e,f} respectievelijk voor en na dosering van *S. hantzschii*

Totaal hoeveelheid gedoseerde organismen

Gedurende een periode van ca. 100 dagen werden aan het influent van het filter de verschillende micro-organismen gedoseerd (gecorrigeerd voor de weken dat er niet is gedoseerd). De volumestroom naar het filter was 780 l/h. Op grond van de mediaanwaarden voor de organismen is het totaal aantal gedoseerde micro-organismen berekend (tabel 6).

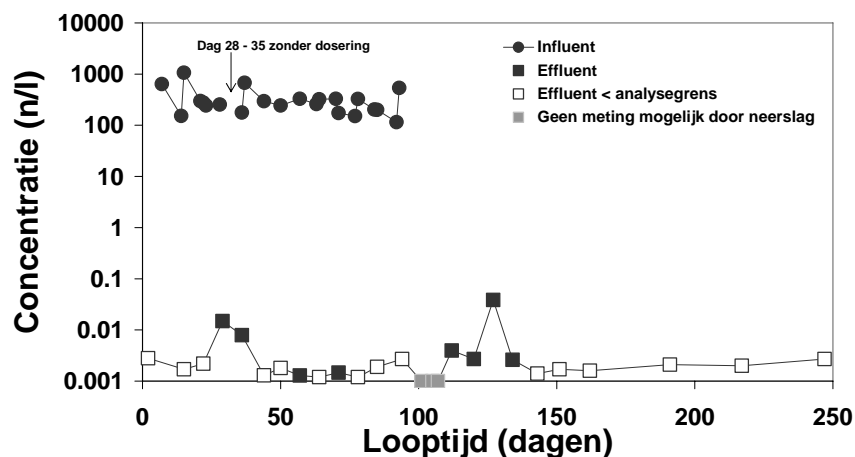
Tabel 6. De totale hoeveelheid organismen die aan het filter is gedoseerd

	Hoeveelheid gedoseerde organismen <i>M_d</i>
<i>C. parvum</i> (91 dagen)	5,4x10 ⁸
<i>C. perfringens</i> (91 dagen)	1,9x10 ⁹
<i>S. hantzschii</i> / centrische diatomeeën	
- lage dosering (86 dagen)	4,8x10 ⁸
- verhoogde dosering (1 dag)	3,4x10 ⁷

3.3 Verwijdering van *Cryptosporidium*

Verloop van de concentraties

In figuur 10 is de concentratie oöcysten in het influent en het effluent van LZF1 weergegeven tijdens de volledige onderzoeksperiode. Van het effluent is een gemiddeld volume van 1299 (929 – 2779) liter onderzocht en in 9 van de 31 monsters zijn enkele oöcysten aangetroffen. Het aantal varieerde tussen 1 en 7 oöcysten per monster. De concentraties zijn weergegeven in open symbolen indien er geen oöcysten waren geteld (<analysegrens) en gesloten symbolen wanneer dat wel het geval was. De berekende waarden zijn gecorrigeerd voor de recovery van de bepaling ($43,6 \pm 14,4\%$). In twee perioden werd doorslag van oöcysten waargenomen: ca. 30 dagen na de aanvang van de dosering en 12 dagen na beëindiging van de dosering. Door het ontbreken van de meetwaarden direct na het beëindigen van de dosering (witte neerslag in de Hemoflow concentraten) is onduidelijk of bij de tweede doorslagperiode dit niet al eerder het geval was. De hoogste effluentconcentratie van 0,0385 per liter na 127 dagen is gebaseerd op 2 oöcysten in 1312 liter met een afwijkende lage recovery van 4,04%.



Figuur 10. De concentratie oöcysten van *C. parvum* in influent en effluent van het langzame zandfilter

Analysegegevens

In tabel 7 is een overzicht gegeven van de concentratie in het effluent (gedetailleerde gegevens in bijlage 6. Na beëindiging van de dosering werd besloten het monstervolume van de Hemoflow te vergroten naar meer dan 4000 liter om de analyse gevoeliger te maken. Bij dit volume en ook later bij het oorspronkelijke volume van 1000 liter werd neerslagvorming in het filtraat waargenomen. De oorzaak hiervan is niet achterhaald. Vanwege dit probleem bij de Hemoflowmeting werd besloten om ook de standaard concentratiemethode met de Envirocheckfilters toe te passen op het effluent.

Tabel 7. Concentratie *Cryptosporidium* oöcysten in het effluent bepaald met concentratie met de Hemoflow (HF) en met de Envirocheck (EC)

	n^a	$n+^a$	Totaal ^b monster Vol. (l)	Totaal aantal organismen	Conc. n/l	Rec. ^c %	Conc. ^d n/l
Effluent HF	22	7	26613	18	0,00068	43,6	0,0016
Effluent HF+EC	29	9	36267	20	0,00057	44,0	0,0013

^a n = aantal monsters; n+ = aantal positieve monsters; ^b totaal bemonsterd volume; ^c recovery Colorseed

Ook nadat het probleem van neerslagvorming was verdwenen, werd een aantal malen doorgegaan met een dubbele analyse. In tabel 8 zijn de resultaten van de beide methoden met elkaar vergeleken. Hieruit blijkt dat met de Hemoflow het aantal positieve monsters hoger was dan met de Envirocheck, ondanks een lagere recovery van de analyse (R_a). Dit laatste is echter verklaarbaar uit het feit dat de colorseed bij de Envirocheck monsters is gedoseerd aan het concentraat dat verder zonder aanvullende voorzuivering is geteld. Bij de Hemoflow werd het concentraat met daarin de colorseeds nog opgewerkt met IMS voordat een preparaat werd gemaakt voor de telling.

De Decimale Eliminatie Capaciteit (DEC) van het filter voor de oöcysten is berekend met de volgende formule:

$$DEC = \log 10 \frac{\bar{C}_{in}}{\bar{C}_{uit}}$$

waarin \bar{C}_{in} de gemiddelde influent concentratie (mediaanwaarde) en de gemiddelde concentratie in het filtraat

$$\bar{C}_{uit} = \frac{\sum N_{s,1-n}}{\sum V_{s,1-n}} \quad (5)$$

met N en V respectievelijk het aantal organismen in en het volume (l) van sample s. Op grond hiervan werd een DEC berekend van 5,4 log.

Tabel 8. Vergelijking Envirocheck- en Hemoflowgegevens

	Envirocheck			Hemoflow		
	Volume (l)	R_a %	Oöcysten	Volume (l)	R_a %	Oöcysten
06/06/2005	500	51,5	1	nb		nb
14/06/2005	930	45,5	1	1099	35,4	1
21/06/2005	1041	6,1	0	1312	4,0	2
27/06/2005	945	38,4	0	1216	33,3	1
06/07/2005	2779	56,6	0	2077	36,4	0
14/07/2005	1290	62,6	0	1483	42,4	0
26/07/2005	1270	64,6	0	1386	46,5	0

Omdat deze DEC-waarde gebaseerd is op een relatief laag aantal positieve monsters, de negatieve monsters een waarde 0 hebben gekregen bij de berekening en de meetperiode langer was dan de doseerperiode, is de

gemiddelde concentratie mogelijk een onderschatting van de werkelijk gemiddelde concentratie. Daarom is de verwijdering berekend op basis van de massabalans. Uit figuur 10 blijkt dat er in de twee perioden van de looptijd doorslag werd geconstateerd: de eerste periode van dag 29 tot dag 71 en de tweede periode van dag 112 tot dag 134. Voor beide perioden is het totaal aantal oöcysten berekend door middel van integratie met de volgende formule:

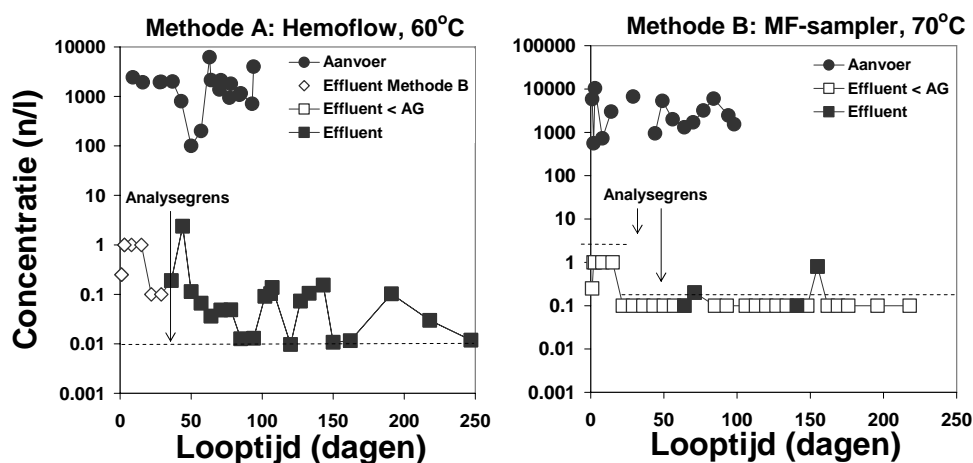
$$DEC_m = \log_{10} \left(\frac{M_d = (t_d * Q * \bar{C}_{in})}{M_e = \left(\sum (dt_{s,i} * Q * \frac{[C_{uit,1} + C_{uit,2}]}{2}) \right)} \right) \quad (6)$$

waarin DEC_m de Decimale eliminatie capaciteit op basis van de massabalans is, M_d en M_e de hoeveelheid micro-organismen, respectievelijk gedoseerd en in effluent, t_d en $dt_{s,i}$ de tijd (uren) van de dosering en het monsterinterval (uur) tussen twee opeenvolgende monsters Q de volumestroom (l/ uur) en $C_{uit,1,2}$ de effluent concentraties aan het begin en eind van het monsterinterval i .

Het totaal aantal oöcysten in het effluent van beide doorslagperioden is berekend op 3527 en 6258. Gebaseerd op dit aantal en het aantal gedoseerde oöcysten (Tabel 6) kan worden berekend dat de DEC_m van het filter 4,7 log is, 0,6 log lager dan gebaseerd op de gemiddelde concentraties.

3.4 Verwijdering van sporen van *Clostridium perfringens*

In figuur 11 zijn de concentraties sporen van sulfiet-reducerende clostridia in influent en effluent van het filter weergegeven. In het influent gaat het om sporen van *C. perfringens*. Om dat voor het filtraat ook vast te stellen, zijn een aantal petrischalen bewaard om vanuit dat materiaal door middel van moleculaire technieken de identiteit van de waargenomen sporen te bepalen.



Figuur 11. De concentratie sporen van *C. perfringens* in influent en van SSRC in effluent van LZF1; links met Hemoflow concentratie en pasteurisatie vlg. *C. perfringens* methode en rechts met MF-sampler en pasteurisatie vlg. SSRC-bepaling

Er is onderscheid gemaakt tussen de resultaten bepaald met meetmethode A en meetmethode B. Hieruit komt naar voren dat de gemiddelde concentratie in het influent geschat met beide methoden in dezelfde orde van grootte ligt.

Het rekenkundig gemiddelde en de mediaanwaarde van de influentgegevens van methode A zijn respectievelijk 1960 en 1840 per ml. Voor methode B zijn deze gegevens 4454 en 1855 per ml.

Met methode A worden in de meeste monsters van het effluent sporen aangetoond, terwijl dat bij methode B met een ondergrens van 0,1 per liter niet het geval is. Bij de verdere berekeningen zijn alleen de gegevens meegenomen verzameld met methode A.

Na 50 dagen werd een daling in de influentconcentratie waargenomen (figuur 11), die zich herstelde nadat de sporen niet meer werden gedoseerd vanuit de doseervloeistof met de diatomeeën maar vanuit de doseervloeistof met de oöcysten. Dit vormt een indicatie voor mogelijke interactie van sporen met diatomeeën, een waarneming die ook op labschaal is vastgesteld.

In de eerste 5 weken is de sporenconcentratie in het effluent niet met methode A gemeten en daarna wel. Uit de volledige gegevens (methode A en B) blijkt dat de grootste doorslag van de sporen werd geconstateerd in de periode 40-50 dagen en daarna stabiliseerde op een niveau van 0,01 – 0,1 per liter, ook na beëindiging van de dosering (figuur 11). Na 150 dagen werd een dalende trend waargenomen tot beneden de detectiegrens.

Tabel 9. Concentratie SSRC in het effluent bepaald met concentratie met de Hemoflow (HF) en de MF-sampler (MF)

	n^a	$n+^a$	Totaal ^b monster Vol. (l)	Totaal aantal org.	Conc. n/l	STD ^c
Effluent HF A	21	16	2363	336	0,142	0,509
Effluent MF B	31	4	238	12	0,050	nb

^a n = aantal monsters; $n+$ = aantal positieve monsters; ^b totaal bemonsterd volume

De DEC voor de sporen is op dezelfde manier berekend als beschreven voor *Cryptosporidium*. Op basis van de concentraties in aanvoer en effluent (tabel 9) is de DEC bepaald op 3,9 log.

De hoeveelheid sporen die in de looptijd zijn uitgespoeld is (M_e), berekend met formule (6), is $5,2 \times 10^5$ en met de totaal gedoseerde hoeveelheid sporen van $1,9 \times 10^9$ (tabel 6), is DEC_m berekend op 3,6 log.

Identificatie van de sporen

Omdat de beide bepalingen van de sporen (methoden A en B) niet selectief waren voor *C. perfringens*, is een moleculaire methode toegepast om van een deel van de waargenomen kolonies vast te stellen of het ging om *C. perfringens*. Dit werd eenmalig gedaan met petrischalen van filtraatanalyses, langdurig bewaard bij 1-2°C. Hieruit bleek het achteraf moeilijk kolonies te isoleren; een groot deel was verkleurd van zwart naar wit waardoor isolatie uit de vaste voedingsbodem niet 100% succesvol verliep. Uiteindelijk zijn 34 stammen uit influentmonsters, en 11 stammen uit filtraatmonsters getest. Het bleek in alle gevallen te gaan om *C. perfringens* (tabel 10). Verderop zal blijken dat ditzelfde gold voor de sporen die in het filterzand werden bepaald.

Tabel 10. Moleculaire test van SSRC kolonies

Monsters	Geteste levensvatbare kolonies ^a	<i>C. perfringens</i>
Influent (n = 7)	34	34
Effluent dag 64	2	2
Effluent dag 106	6	6
Effluent dag 107	3	3

^a een deel van het geïsoleerde celmateriaal bleek niet levensvatbaar bij opkweken; dit deel kwam overeen met de negatief geteste kolonies

3.5 Verwijdering van *Stephanodiscus hantzschii*

De concentraties centrische diatomeeën in het influent en effluent van LZF1 zijn weergegeven in figuur 12. De concentratie in het influent was redelijk constant. Omdat bij aanvang bleek dat de concentratie natuurlijke diatomeeën in de aanvoer relatief hoog was en er duidelijk meer doorslag van diatomeeën plaatsvond dan van de andere twee organismen, werd later besloten de concentratie natuurlijke diatomeeën in de aanvoer regelmatig te bepalen. Uit de telling zijn de aantallen genomen met een grootte tussen 4 -7 micron, de grootte overeenkomend met de gedoseerde cellen. Dit niveau lag in de periode tijdens dosering gemiddeld op 123 per liter (77 - 262; n = 7) en daarmee lager dan het aantal geteld in hetzelfde water na dosering van de suspensie met *Stephanodiscus* in dezelfde periode (260/l; n = 15). Na beëindiging van deze dosering was de concentratie natuurlijke diatomeeën in de aanvoer duidelijk minder stabiel met lagere maar ook hogere waarden (figuur 12). Dit beeld komt overeen met het beeld in het ruwe water (Bijlage 5) van dezelfde periode en is vermoedelijk gekoppeld aan de herfstbloei in de Oranjekom.

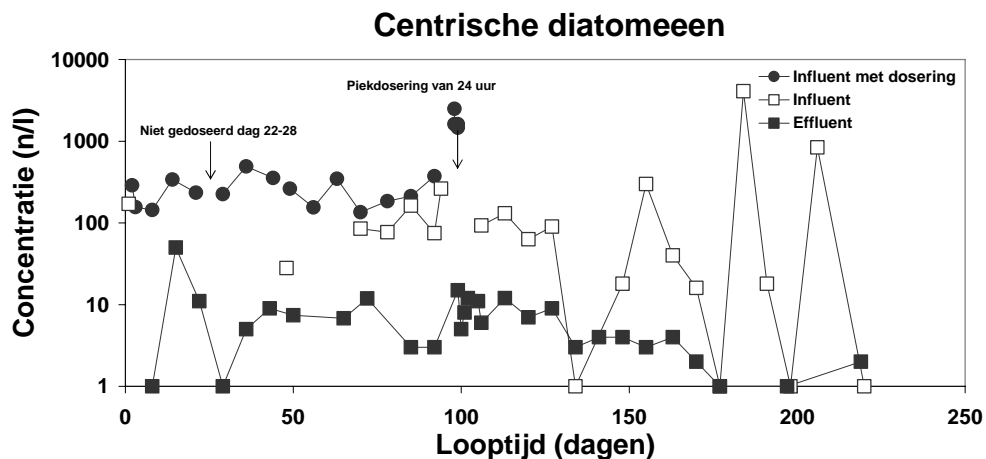
Door dit niveau aan natuurlijke diatomeeën met dezelfde grootte als die van de gedoseerde *S. hantzschii* is het niet mogelijk om net als voor de oöcysten en sporen de verwijdering van de gedoseerde diatomeeën te bepalen. In het vervolg wordt de verwijdering van deze organismen besproken als de verwijdering van centrische diatomeeën CD 4-7 met een grootte van 4-7 µm.

CD 4-7 werden door het langzame zandfilter verwijderd, maar de concentratie in het effluent was duidelijk hoger dan de concentratie oöcysten en sporen (figuren 9, 10 en 11). Na een eerste piek in het filtraat nam de concentratie in het filtraat af van ca. 10 tot 1 per liter over de looptijd. De gemiddelde concentratie in het effluent was 7,2 n/l (tabel 11). Op grond van deze gegevens kan de DEC berekend worden op 1,6 log. Het totaal aantal CD 4-7 waargenomen in het effluent (M_e) over de periode van 220 dagen (figuur 11) is bepaald op $2,7 \times 10^7$ en de DEC_m op 1,3 log.

Tabel 11. Concentratie CD 4-7 in het effluent

n^a	n^+^a	Totaal ^b monster Vol. (l)	Totaal aantal org.	Conc. n/l	STD
29	29	25,94	187	7,21	8,46

^a n = aantal monsters; n+ = aantal positieve monsters; ^b totaal bemonsterd volume



Figuur 12. Concentratie centrisc diatomeeën in het influent en effluent van LZF1

Inloed van de influent concentratie op de aantallen in het filtraat

Om te testen in welke mate de effluent concentratie afhankelijk was van de aanvoer concentratie werd aan het eind van de looptijd een korte piekdosering uitgevoerd. De concentratie werd gedurende 1 dag een factor tien werd verhoogd. In de eerste dagen na deze piek werden een aantal extra monsters genomen. De gemiddelde concentratie voor deze piekdosering in het filtraat was 5,9/l ($\pm 3,9$; gehele periode excl. de hoge waarde van 50/l) en in een periode van 4 weken na de dosering 9,4/l ($\pm 3,3$). Dit verschil is echter niet significant te noemen (t-test; $p = 0,09$). In de periode zonder dosering en een sterke fluctuerende concentratie natuurlijke diatomeeën in de aanvoer, werd een afnemende trend in de effluent concentratie waargenomen. Er lijkt net als voor de sporen en oöcysten een vertraagde invloed te zijn van de influentconcentratie op het aantal in het filtraat.

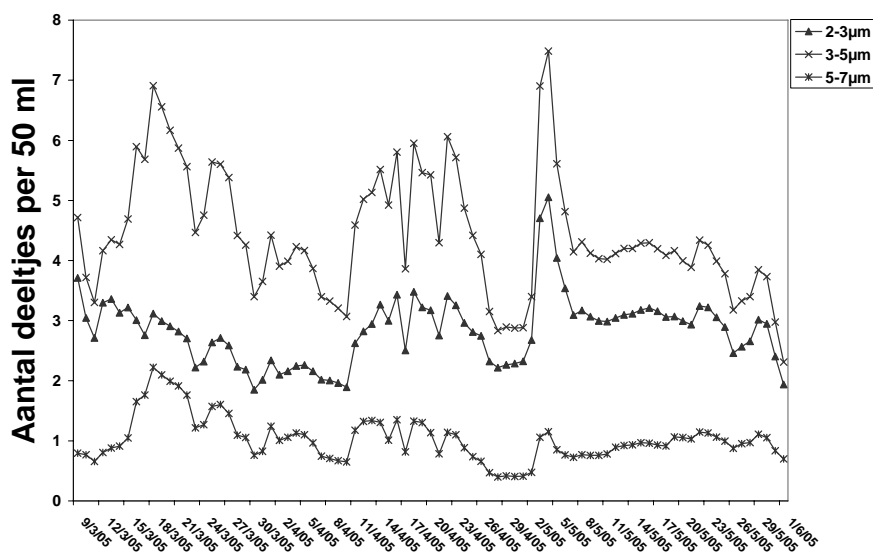
3.6 Deeltjesverwijdering

In het influent en effluent van het filter is het aantal deeltjes gemeten met een water grab-sampler (deelmonsters) en een on-line monitor (continu). In tabel 12 zijn de gegevens van de deelmonsters gepresenteerd. Uit deze waarden blijkt dat de gemiddelde deeltjesverwijdering in orde van grootte overeen komt met de verwijdering van de centrische diatomeeën zoals hierboven berekend.

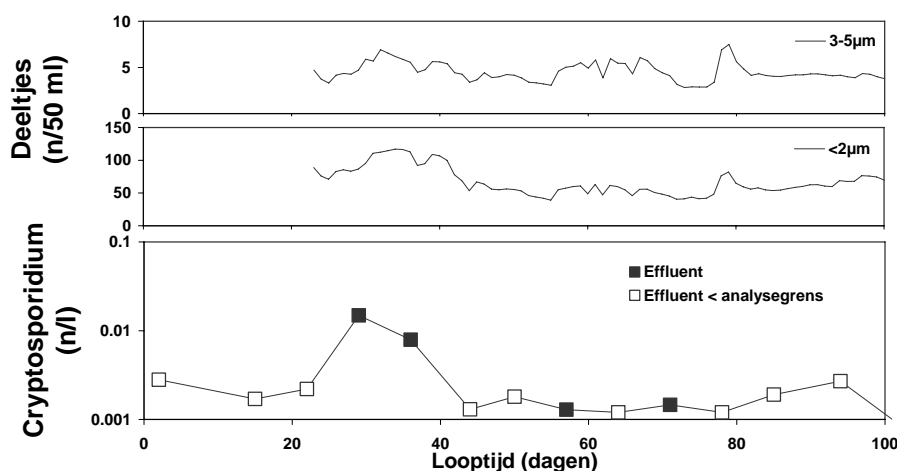
De gegevens van de meest relevante deeltjesgrootten van de on-line monitor zijn weergegeven in figuur 13 en 14. De aantallen zijn relatief laag in het filtraat (enkele deeltjes per 50 ml) en voor de drie klassen wordt een vergelijkbaar verloop in het filtraat gevonden. De pieken zijn niet te relateren aan variaties in de kwaliteit van het aangevoerde water (figuur 8). Het is weliswaar erg zwak en niet reproduceerbaar (laatste piek in deeltjes niet) maar bij de eerste twee verhoging van het aantal deeltjes wordt ook doorslag van oöcysten waargenomen (figuur 14).

Tabel 12. Gegevens van de Met-One WGS

	1-5 μm	5-10 μm	>10 μm
Koolfiltraat (n=11)	2472 (\pm 1522)	36 (\pm 8)	23 (\pm 18)
Bovenwater (n=9)	2645 (\pm 1509)	37 (\pm 6)	16 (\pm 7)
Effluent (n=13)	100 (\pm 30)	2 (\pm 0,7)	0,3 (\pm <0,10)
DEC (log)		1,4	



Figuur 13. Aantal deeltjes in effluent bepaald met de on-line monitor



Figuur 14. Aantal deeltjes bepaald met de on-line monitor en de doorslag van oöcysten

3.7 Concentratie micro-organismen in het filterbed

Na 184 en 253 dagen zijn schraapmonsters van het oppervlak en steekmonsters van het filterbed genomen. Na 184 dagen alleen van de bovenste 40-50 cm (duplo) en na 253 dagen ook van de diepere lagen. Bij de laatste bemonstering zijn ook monsters van de nicolondoek aanwezig tussen het zandbed en de steunlaag en van de steunlaag onderzocht (duplo).

3.7.1 *Cryptosporidium*

Directe microscopische beoordeling. Alle zandmonsters van de schmutzdecke en direct daaronder (0-1 cm) zijn direct microscopisch beoordeeld op de aanwezigheid van oöcysten. Er werden in **geen** van de monsters oöcysten waargenomen. Bij een diameter van het totale monsteroppervlak op het objectglasje van 9,26 mm en een gemiddeld aantal zandkorrels in 1 beeldveld (oppervlak van 0,39 mm²) van 3, zijn in totaal 518 zandkorrels op de bovenkant en zijkant gescand. De hieruit geschatte concentratie is lager dan 34 oöcysten per ml zand bij een korreldiameter van 0,3 mm (8846 korrels per ml en microscopische scanfactor van 0,6 (boven/ zijkant)).

Analyse d.m.v. extractie. Naast deze directe beoordeling zijn de in het zandbed geaccumuleerde oöcysten in een suspensie gebracht door een deel van de de monsters (ca. 3 ml; tabel 13) ultrasoon te trillen in steriel water.

Tabel 13. Aantal oöcysten van *C. parvum* die zijn geaccumuleerd in het filterbed: getelde aantallen per monster

Looptijd: Monster (ml±SA) ^a	184 dagen		253 dagen	
	steek 1 ^b	steek 2 ^b	steek 1 ^b	steek 2 ^b
Schmutzdecke	33;18 ^c ;119	12;29 ^c ;23	6;24	0;18
0-1 cm	50;37 ^c ;16	8;8 ^c	7;4	3;12
1-5 cm	16	12	1	1
5-10 cm	10	2	nb ^d	nb
10-15 cm	1	2	nb	nb
20-25 cm	1	0	nb	nb
25-30 cm	1	0	nb	nb
43-46 cm	0	0	nb	nb
60-65 cm	nb	nb	0;0 ^e	1;0 ^e
100-105 cm	nb	nb	0 ^e	0 ^e
120-125 cm	nb	nb	1;0 ^e	0;0 ^e
Nicolondoek ^f	nb	nb	0	0
Steunlaag	nb	nb	0	0

^a gemiddelde en standaard afwijking;

^b duplo of meervoudige analyse van het monster

^c met laureth-buffer;

^d nb = niet bepaald;

^e Dubbele monster hoeveelheid onderzocht 6,11(±0,25) ml;

^f 172,5 en 328 cm² van het nicolondoek en 649 en 609 gram grof grind van de steunlaag onderzocht

Een deel van deze suspensie is gebruikt om het aantal oöcysten te bepalen. De overige suspensie is gebruikt om het aantal sporen van *C. parfringens* en centrische diatomeeën te bepalen. In tabel 13 zijn de aantallen getelde oöcysten vermeld die in de monsters zijn waargenomen.

Van de schmutzdecke en de eerste centimeter zijn meerdere delen van hetzelfde monster onderzocht om een nauwkeurig beeld te krijgen van de aantallen. 4 van de deelmonsters van de eerste profielmeting na 184 dagen

zijn behandeld met laureth-buffer in plaats van steriel water om na te gaan of dit de opbrengst zou verhogen. Omdat dat niet het geval bleek (tabel 13), zijn de andere monsters niet aanvullend op deze manier onderzocht.

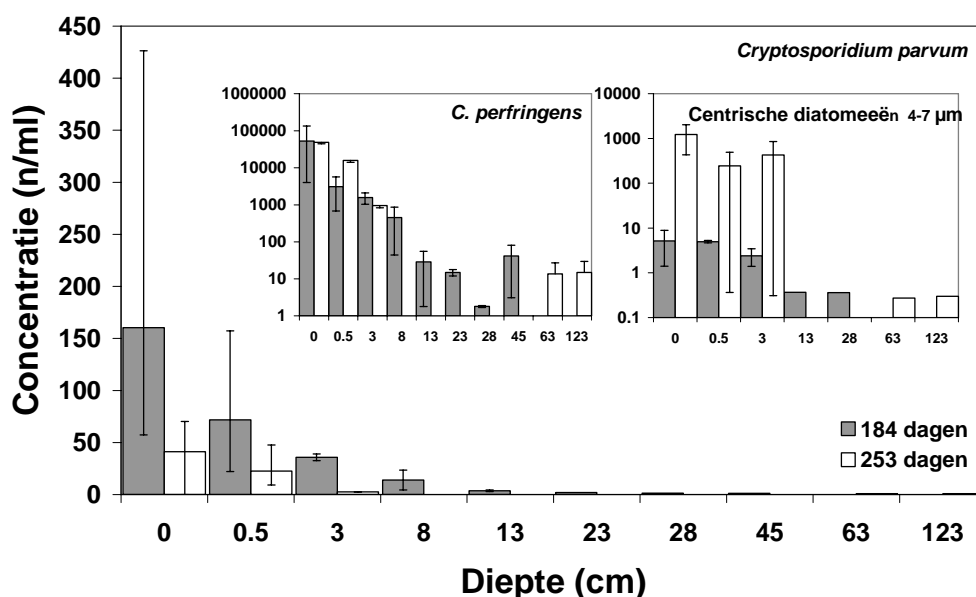
Recovery van de bepaling. De recovery van de bepaling is bepaald door bij de meeste monsters (n = 23; 60%) colorseeds te doseren aan de suspensie verkregen door ultrasonische behandeling. De gemiddelde recovery van de telling in de suspensie was 24,8(±8,1)%. Omdat

- de directe microscopische analyse een aantal opleverde van <34/ml zand
- en de concentratie oöcysten in het zand na correctie op eenzelfde niveau lag of daar iets boven (figuur 15),

wordt er van uit gegaan dat met de bepaling een goed kwantitatief beeld is verkregen van de werkelijk aanwezige aantallen oöcysten.

Concentratieprofiel over de beddiepte. In figuur 15 zijn de concentraties uitgezet als functie van de beddiepte (aantal per ml zand, oöcysten gecorrigeerd voor de recovery bepaald met colorseed).

Uit de ruwe gegevens van de monsters na 184 dagen komt naar voren dat de hoogste aantallen in de eerste centimeter van het bed zijn geaccumuleerd en dat na 10 cm het aantal nadert tot de analysegrens (tabel 13). In de monsters na 40 cm werden geen oöcysten meer waargenomen.



Figuur 15. Concentratie oöcysten, C. parfringens en centrische diatomeeën (4-7 µm) in het zand uit het langzaam zandfilter gemeten na 182 en 252 dagen van de looptijd van het onderzoek

In de monsters genomen na 253 dagen bleek het aantal in de eerste 5 cm gedaald te zijn ten opzichte van de monsters van 184 dagen (tabel 13 en figuur 15). In de dieper gelegen lagen van het filter werden na 253 dagen looptijd in 2 van de 14 monsters nog oöcysten aangetroffen. In het nicolondoek en de steunlaag werden in de onderzochte monsters geen oöcysten waargenomen (tabel 13).

Op grond van de gegevens is een schatting gemaakt van het aantal micro-organismen dat in het filterbed is geaccumuleerd. De concentraties weergegeven in de figuren zijn bepaald in mengmonsters van een bepaalde laagdikte (oppervlaktemonster ca. 3 mm en de daaronder gelegen eerste centimeter gevolgd door afzonderlijke mengmonsters van 3-5 cm). Het aantal geaccumuleerde oöcysten is berekend uit:

$$N_{l,n} = (\bar{C}_{l,n} * 1000) * (d_{l,n} * Opp * 1000) \quad (7)$$

waarin $N_{l,n}$ en $\bar{C}_{l,n}$, respectievelijk het aantal micro-organismen en de gemiddelde concentratie micro-organismen (N/ml) in laag (l) i is met een dikte van $d_{l,i}$ (m) en een vast filterbedoppervlak Opp. van 2,5 m². Van de lagen in het bed waarvan geen metingen beschikbaar waren, werd de geaccumuleerde massa N berekend aan de hand van dezelfde formule en een gemiddelde concentratie bepaald uit de concentraties bepaald in de eerst boven en eerst onder gelegen lagen. Uit figuur 15 blijkt dat in de eerste 15 cm zich verreweg het grootste deel van de in het bed geaccumuleerde oöcysten bevindt. Na 184 dagen was in de eerste 30 cm een aantal van $9,65 \times 10^6$ ($1,2 \times 10^7$; $7,3 \times 10^6$) oöcysten aanwezig, 1,8% van het gedoseerde aantal van $5,4 \times 10^8$. Dit aantal was na 253 dagen gedaald naar $1,1 \times 10^6$ ($1,3 \times 10^6$; $9,3 \times 10^5$) in de eerste 5 cm, 0,21% van het gedoseerde aantal. Deze afname in de eerste 5 cm van het filterbed was 81,2% (0,7 log) over een periode van 70 dagen (0,01 log/dag).

3.7.2 *Clostridium perfringens*

Ook van de sporen van sulfiet-reducerende clostridia is de concentratie in het filterbed bepaald d.m.v. extractie (tabel 14) na 184 en 253 dagen looptijd. Van dezelfde suspensies waarin het aantal oöcysten is bepaald, is het aantal sporen bepaald. De concentratie was na 152 dagen aan het oppervlak meer dan een factor 100 hoger dan het aantal oöcysten (figuur 15) en daalde tot de analysegrens na ca. 20 cm. Op grond van de concentraties gemeten na 253 dagen in de eerste 5 cm kan worden geconcludeerd dat het aantal in de tussentijd niet is afgenomen.

Vervuiling van onderste monsters uit de steek

In de daaronder gelegen lagen werden in 2 van de 10 zandmonsters (43-46 cm en 120-125 cm) nog een verhoogd aantal sporen gemeten. Omdat het monster van 120-125 cm in eerste instantie negatief was, is dit monster een derde maal onderzocht. Het resultaat bevestigde de tweede verhoogde concentratie SSRC in het zand. Op basis van de volgende argumenten wordt aangenomen dat de afwijkende resultaten in de duplo monsters van de diepere lagen 43-46 cm en 120-125 cm een artefact van de monsterneming is, nl. besmetting van het monster met zand van het bovenste deel van het filter:

- Het steekapparaat wordt leeg in het met water verzadigde filter geduwd waarbij een deel van de toplaag meegenomen kan worden naar onderen. Beide monsters zijn afkomstig uit het onderste deel van het steekapparaat en zijn besmet geraakt op het moment dat met de klep het lege deel van het apparaat wordt gevuld met zand uit het filterbed;

- Het resultaat van de duplo steek was in overeenstemming met de lage resultaten van de overige diepere monsters;
- Met PCR werd bevestigd dat de kolonies van het monsters 120-125 cm waren gevormd door sporen van *C. perfringens*;

Deze monsters zijn dan ook niet betrokken bij de verdere berekeningen.

Het totaal aantal sporen in het filterbed neemt in de eerste 7,5 cm toe en daarna nauwelijks meer (figuur 15) en in de periode tussen 184 en 253 dagen werd geen afname van dit aantal waargenomen. Er zijn in totaal 90 kolonies geïsoleerd van de verschillende monsters moleculair getypeerd met PCR. Alle stammen werden geïdentificeerd als *C. perfringens*. Op grond van deze gegevens is berekend dat 32,5 – 45% van het aantal gedoseerde sporen in het filterbed is geaccumuleerd.

Tabel 14. Hoeveelheid sporen (Kolonie Vormende Eenheden; KVE) van sulfet-reducerende clostridia die zijn geaccumuleerd in het filterbed: concentraties (0-5 cm) en getelde KVE per monster (< 5cm beddiepte)

Looptijd: Monster (ml±SA) ^a	184 dagen		253 dagen	
	steek 1 ^b	steek 2 ^b	steek 1 ^b	steek 2 ^b
Smutzdecke (n/ml)	6,9x10 ⁴	3,5x10 ⁴	5,3x10 ⁴	4,4x10 ⁴
0-1 cm (n/ml)	5,3x10 ³	865	1,4x10 ⁴	1,7x10 ⁴
1-5 cm (n/ml)	2,1x10 ³	1,0x10 ³	823	1,1x10 ³
5-10 cm (n)	28 ^c ;28 ^c	2 ^c ;1 ^c	nb	nb
10-15 cm (n)	1 ^d ;0 ^d	22 ^d ;8 ^d	nb	nb
20-25 cm (n)	8 ^d ;3 ^d	5 ^d ;3 ^d	nb	nb
25-30 cm (n)	1 ^d ;0 ^d	1 ^d ;0 ^d	nb	nb
43-46 cm (n)	1 ^d ;1 ^d	33 ^d ;15 ^d	nb	nb
60-65 cm (n)	nb	nb	0 ^c ;0 ^c ;1 ^{d,e} ;1 ^{d,e}	0 ^c ;0 ^c ;1 ^{d,e} ;0 ^{d,e}
100-105 cm (n)	nb	nb	1 ^{d,e} ;0 ^{d,e}	1 ^{d,e} ;1 ^{d,e}
120-125 cm (n)	nb	nb	0 ^c ;0 ^c ;27 ^{c,e} ;32 ^{c,e}	0 ^c ;0 ^c ;1 ^{c,e} ;0 ^{c,e}
Nicolondoek ^f (n)	nb	nb	0	0
Steunlaag ^f (n)	nb	nb	(108)	0

^a gemiddelde en standaard afwijking;

^b duplo of meervoudig monster

^c onderzocht volume^{verdunding}: 1,0 ml⁰;

^d 10,0 ml⁰;

^e Dubbele monster hoeveelheid onderzocht 6,11(±0,25) ml;

^f 172,5 en 328 cm² van het nicolondoek en 649 en 609 gram grof grind van de steunlaag onderzocht (108 gebaseerd op 1 kolonie in monstervolume van 1 ml⁰)

3.7.3 Centrische diatomeeën

Tot slot werden de suspensies van de zandmonsters ook onderzocht op de aanwezigheid van het aantal centrische diatomeeën. De suspensies bevatten een groot aantal verschillende deeltjes waarin het aandeel van CD klein was (geen voorzuivering mogelijk zoals toegepast bij de oöcysten). De getallen in tabel 15 geven daarom een betrouwbaar beeld van de orde van grootte van het aantal aanwezige diatomeeën (4-7 µm) waarmee de concentratie per ml zand is geschat (figuur 15). Ook voor deze organismen werden de hoogste aantallen in de bovenste 10 cm gevonden.

Omdat het aangevoerde water reeds CD 4-7 bevatte is het percentage gaccumuleerde cellen van dit organismen niet berekend.

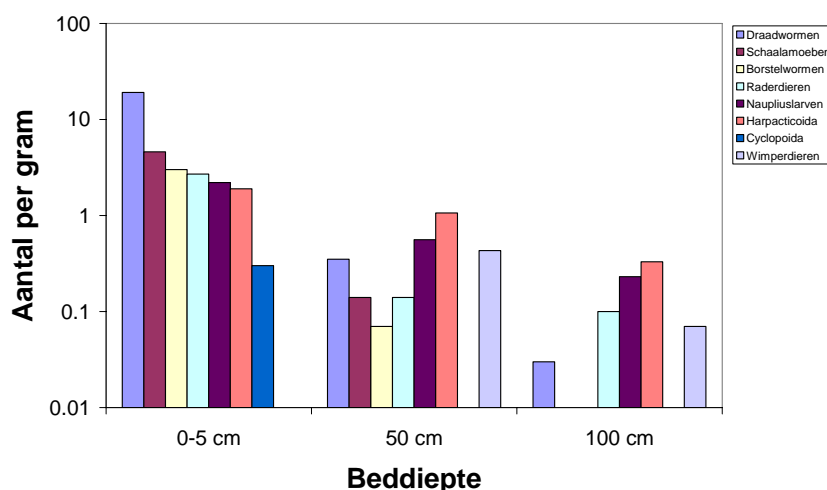
Tabel 15. *Centrische diatomeeën (n/50 ml)*

Looptijd:	183 dagen		253 dagen	
Monster (ml±SA) ^c	2,94 (±0,26)		3,13 (±0,48)	
	steek 1	steek 2	steek 1	steek 2
Schmutzdecke	0;4;0;0 ^a	5;25;5;0 ^a	0;5400;0;0	0;1300;0;0
0-1 cm	4,3;13;0;0	0;13,2;0;0	192;1448;966;0	0;0;0;0
1-5 cm	5,6;11;0;5,6	0;4;0;0	912;2738;0;0	0;0;0;0
5-10 cm	nb	nb	nb	nb
10-15 cm	3,2;0;1,6;0	0;1;0;0	nb	nb
20-25 cm	nb	nb	nb	nb
25-30 cm	0;0;0;0	0;0;0;0	nb	nb
43-46 cm	0;2,5;0;0	0;2;0;0	nb	nb
60-65 cm	nb	nb	0;0;0;0	0;0;0;0
100-105 cm	nb	nb	nb	nb
120-125 cm	nb	nb	0;0;0;0	0;0;0;0
Nicolondoek	nb	nb	0;130;0;0	0;0;0;0
Steunlaag	nb	nb	0;0;0;0	0;0;0;0

^a respectievelijk, <4, 4-7, 7-13 en >13 µm

3.7.4 Zoöplankton

In drie monsters is de concentratie zoöplankton in het filterbed bepaald. Hieruit komt naar voren dat het filter relatief veel zoöplankton bevat (figuur 16) en de hoogste aantallen in de eerste centimeters zijn gevonden. In Tabel 16 zijn de acht verschillende taxonomische groepen gepresenteerd in aantal per 30 gram monster. Ook dieper in het bed zijn deze organismen nog te vinden. Het aantal draadwormen is het hoogst gevolgd door het aantal schaalmoeben.



Figuur 16. Het aantal zoöplankton in het filterbed geteld aan het eind van de looptijd van het onderzoek

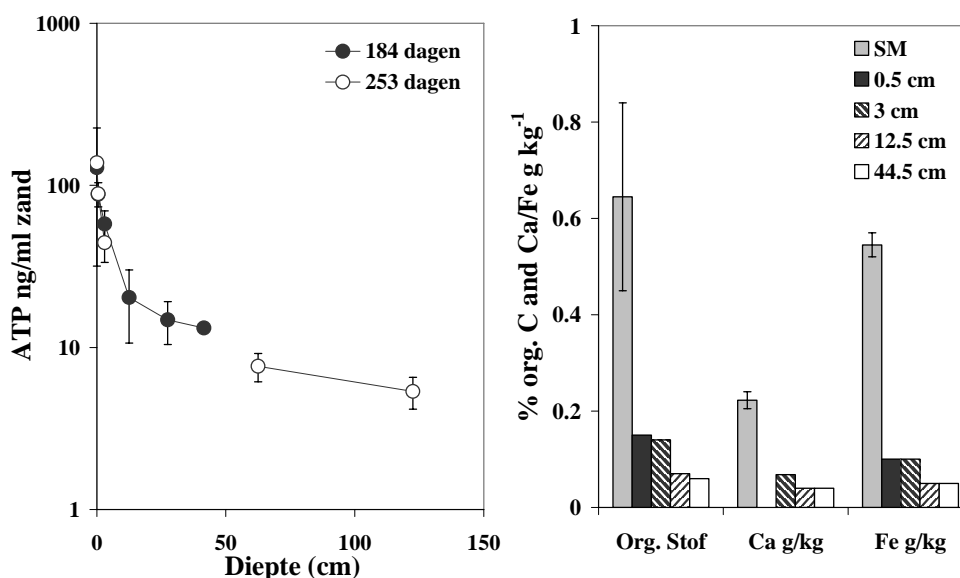
Tabel 16. Zoöplankton in het zand (aantal in 30 gram)

Soorten	Latijnse benaming	0-5 cm	50 cm	100 cm
Draadwormen	Nematoda	573	11	1
Schaalamoeben	Testacea	138	4	0
Borstelwormen	Oligochaeta	90	2	0
Raderdieren	Rotatoria	81	4	3
Naupliuslarven	Nauplii	66	17	7
Harpacticoida	Harpacticoida	57	32	10
Cyclopoida	Cyclopoida	9	0	0
Wimperdieren	Ciliata	0	13	2

3.7.5 Biochemische en fysisch-chemische samenstelling van het zand en de steunlaag

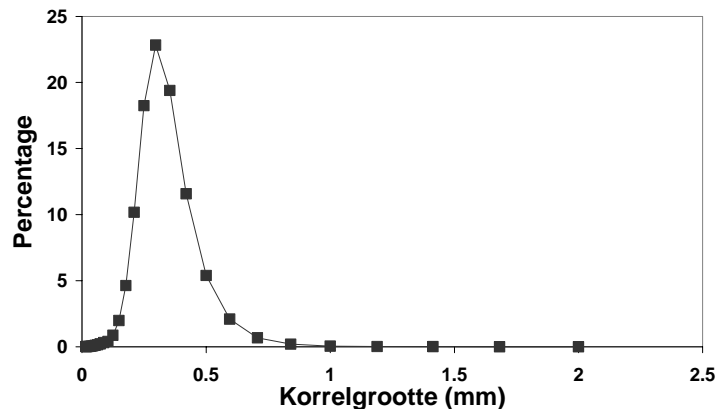
Om een indruk te krijgen van de samenstelling van het filterzand in het filterbed zijn een aantal biochemische en fysisch-chemische parameters bepaald in het zand van het filter.

Het ATP-gehalte, een maat voor de aanwezigheid van biomassa in het zand, vertoonde een vergelijkbaar profiel (figuur 17) als waargenomen voor de geaccumuleerde micro-organismen (zie voorgaande figuren). Het gehalte na 184 en 253 dagen in de eerste centimeters was ongeveer even hoog. De belangrijkste fysisch-chemische analyseresultaten zijn ook gepresenteerd in figuur 17. Ook deze parameters hebben de hoogste waarden in de eerste centimeters van het filterbed. Vanaf 12,5 cm daalt de concentratie niet verder.



Figuur 17. ATP-gehalte (links) en (rechts) organische stof (%), Ca en Fe (g/kg) op verschillende diepten in het onderzoeksfilter

Van het zand is ook de korrelgrootteverdeling bepaald. De korrelgrootte van het zand van het onderzoeksfilter varieerde tussen 0,1 en 0,6 mm met het hoogste percentage bij 3 mm (figuur 18).



Figuur 18 Korrelgrootteverdeling van het zand uit het onderzochte filter

In het onderzochte filter LZF1 LEI-PI was tussen de steunlaag en het zandbed een nicolondoek geplaatst. Van dit doek en van het grind van de steunlaag zijn een aantal parameters bepaald die mate van biofouling (vervuiling met biomassa) aangeven (tabel 17).

De ATP-gegevens van het nicolondoek vallen binnen de range van waarnemingen aan membraanelementen met enigszins verhoogde weerstand. Wanneer de gegevens worden vergeleken met waarnemingen aan PVC-leidingsegmenten dan zijn de ATP-concentraties vergelijkbaar met de hogere meetwaarden van de segmenten (Vrouwenvelder *et al*, 2006, in voorbereiding). Er vindt dus duidelijk accumulatie van biomassa plaats in het doek en dit wordt bevestigd met de NPOC-waarden die qua orde van grootte overeenkomen met de hoge waarden waargenomen in membraansystemen. Er zijn geen aanwijzingen dat deze vervuiling heeft geleid tot problemen met de weerstand of met de waterkwaliteit.

Tabel 17. Vervuiling van de nicolondoek en het grind in de steunlaag

Parameter ^a	Eenheid doek of grind	Nicolondoek		Grind	
		Steek 1	Steek 2	Steek 1	Steek 2
ATP LES	pg/cm ² of gram	1800	1500	160	230
ATP HES	pg/cm ² of gram	2800	2600	280	390
HPC	KVE/cm ² of gram	2x10 ⁶	3x10 ⁴	7x10 ³	8x10 ⁴
TDC	n/cm ² of gram	8x10 ⁶	5x10 ⁶	1x10 ⁶	6x10 ⁵
NPOC	mg/m ² of %	116	93	<0,001	<0,001

^a ATP LES en HES = ATP bepaald met lage en hoge energetische ultrasone sonificatie; HPC = heterotrophic plate count; TDC = total direct cell count en NDOC = non-purgeable organisch Carbon.

4 Algemene discussie en conclusies

4.1 Verwijdering en massabalans

De resultaten van het onderzoek bevestigen eerdere gegevens gevonden in de literatuur dat langzame zandfilters oöcysten van *Cryptosporidium* over het algemeen effectief verwijderen (tabel 18). Op basis van de gemiddelde concentratie voor en na het filter werd een verwijdering van 5,4 log berekend en op basis van de massa balans van 4,7 log. De sporen van *C. perfringens* werden in mindere mate verwijderd; 3,9 log op basis van de concentraties en 3.6 log berekend uit de massabalans. Laag was de verwijdering van centrische diatomeeën en *Stephanodiscus hantzschii*, die werd berekend op 1,6 en 1,3 log gebaseerd op respectievelijk de concentratie en balans.

Uit het overzicht blijkt dat een dergelijk hoge DEC voor de oöcysten in ongeveer de helft van de andere studies met zandkolommen of filters ook werd vastgesteld. De lage DEC-waarden werden waargenomen bij kleine kolommen met nieuw zand en een korte contacttijd. Verder was de hoogte van de DEC niet gerelateerd aan één van de andere in table 18 gerapporteerde condities.

4.1.1 Voorbelading en nalevering

Voor de lage verwijdering beschreven door Fogel *et al.* (1993) en Hijnen *et al.* (2004) voor respectievelijk natuurlijke oöcysten en SSRC werd ophoping en vertraagde doorslag als mogelijke verklaring voorgesteld. Uit de waarneming van de huidige studie dat de doorslag van de drie persistente organismen voortduurde nadat de dosering was gestaakt en de afname van de effluent concentratie traag verliep, kan worden geconcludeerd dat er inderdaad sprake is van accumulatie en vertraagd transport. De continue dosering van oöcysten en sporen was echter onvoldoende om een stijging van de effluent concentratie te realiseren zoals was opgetreden in een kolomexperiment beschreven door Schijven *et al.* (2003; figuur 19).

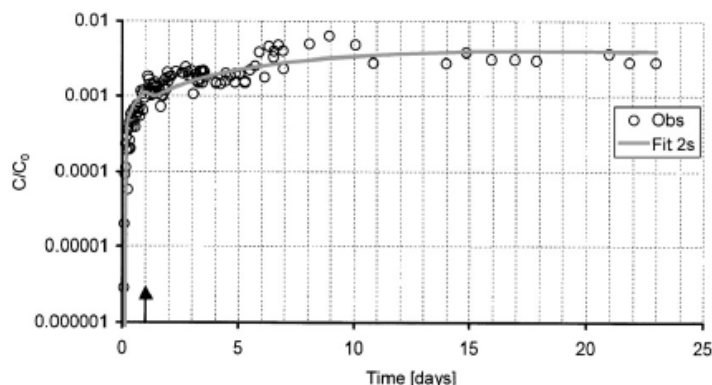


Figure 19. Doorbraakcurve van sporen van *Clostridium perfringens* D10 in een kolom studie (open cirkels = waarneming; lijn = Fit van two-site kinetic model met Hydrus). Sporen zijn gedoseerd gedurende de eerste dag. Uit: Schijven *et al.* (2003)

Table 18. Overzicht van de verwijderingscapaciteit van zandfilters voor de *Cryptosporidium* bepaald onder verschillende condities

Literatuur	Oöcyst behandeling ^a	Test ^b	DEC Crypto	DEC SSRC	lengte (m)	Contact tijd hrs	korrel (mm)	org.C % dw	zand pH	Fe g/kg
Fogel <i>et al.</i> . 1993	geen/Environmental	L/V	0,3	nd	1,05	3,5	0,25	ni	ni	ni
Chung <i>et al.</i> 2006	centri.	K/L	0,3	0,1	0,14	0,14	0,48	0,2	6,5-7,1	1,8-2,1
Chung <i>et al.</i> 2006	ether/ethanol	K/L	1,9	0,1	0,14	0,14	0,48	0,2	6,5-7,1	1,8-2,1
Chung <i>et al.</i> 2006	centri.	K/L	0,5	0,1	0,14	0,14	0,48	0,2	6	3
Davies <i>et al.</i> 2005	ether/centri	K/L	3,2	1,2	0,4	9,6	1,15	0,1	5,5-6,5	0,3
Hijnen <i>et al.</i> 2005	centri.	K/L	3,2	>3,7	0,5	12	0,18	0,6	8,7	0,58
Hijnen <i>et al.</i> 2005	centri.	K/L	3,6	>4,3	0,5	24	0,18	0,6	8,7	0,58
Schuler <i>et al.</i> 1991	Formaline	K/P	3,9	nb ^c	0,9	3	0,27	ni	ni	ni
Timms <i>et al.</i> 1995	centri./pasteurisatie	K/V	>4,5	nb	0,5	1,7	ni ^c	ni	ni	ni
Deze studie	water gewassen/UV	L/P	4,7	3,6	1,5	5	0,3	0,6	7,5	0,5
Davies <i>et al.</i> 2005	ether/centri	K/L	>4,8	>2,7	0,4	9,6	0,05	0,8-6,4	5,3-7,7	1,6-5,2
Schijven <i>et al.</i> 2006	centri.	K/L	>5,3	2,3	0,4	1,3	0,29	0,002	ni	0,027
Davies <i>et al.</i> 2005	ether/centri	K/L	>5,6	0,7	0,4	9,6	0,03	17-32	4-4,7	10-25
Davies <i>et al.</i> 2005	ether/centri	K/L	5,7	3,3	0,4	9,6	0,21	0,1-0,4	8,5-8,6	1
Davies <i>et al.</i> 2005	ether/centri	K/L	>5,8	2,7	0,4	9,6	0,23	0,2	6,8	0,88
Schuler <i>et al.</i> 1991	Formaline	K/P	6	nd	0,9	3	0,27	ni	ni	ni
Schijven <i>et al.</i> 2006	centri.	K/L	>6,5	3,2	0,4	1,3	0,58	0,055	ni	0,696
Hijnen <i>et al.</i> 2005	centri.	K/L	>6,7	>2,5	0,5	4,8	0,5	2,7	8	5,1
Hijnen <i>et al.</i> 2005	centri.	K/L	>7,2	>2,5	0,5	12	0,5	2,7	8	5,1

^a voorbehandeling met ontvetting met ether, dichtheidsgradiënt centrifuge (centri.), ethanol, formaline, pasteurisatie of UV-inactivatie;

^b L of K = lang of kort; V,P of L = veld, pilot plant of laboratorium;

^c nb = niet bepaald; ni = geen informatie

Op grond van de gegevens van het ruwe water en het snelfiltraat van het bedrijf (tabel 19) blijkt dat van een significante voorbelading van het proeffilter (drie jaar in gebruik) met natuurlijke oöcysten en sporen geen sprake is geweest. Snelfiltraat is de voeding van de proefinstallatie en dit water is vooraf nog behandeld met ozonisatie en actieve-koolfiltratie. Uit de gegevens van de CD 4-7 in ruw water en snelfiltraat (tabel 19) en ook van het aangevoerde water van het proeffilter (figuur 12) blijkt echter dat het filter in hogere mate is voorbeladen met centrische diatomeeën. Vermoedelijk is dit de oorzaak geweest van de lage verwijdering die voor dit micro-organisme is waargenomen.

Tabel 19. Aantal oöcysten, SSRC en centrische diatomeeën in het ruwe water en het snelfiltraat (aanvoer van de proefinstallatie) van de zuivering te Leiduin (2004-2005)

Org./monster	n ^a	n ^{+a}	Totaal Vol. (L)	Totaal aantal org.	Conc. n/l	STD	Rec. ^b %	Conc. n/l
Oöcysten								
Ruw water	12	10	840	33	0,039	0,033	5,6	0,696
Snelfiltraat	11	5	1583	14	0,009	0,011	5,6	0,161
SSRC								
Ruw water	52	50	5,2	2076	399,2	38,4	nvt ^c	nvt
Snelfiltraat	52	49	52	710	13,7	1,5	nvt	nvt
CD 4-7 µm								
Ruw water	28	24	0,175	2392	1,1x10 ⁵	1,5x10 ⁵	nvt	nvt
Snelfiltraat	23	18	0,702	581	4,7x10 ³	1,4x10 ⁴	nvt	nvt

^a n en n⁺ = aantal (positieve) monsters; ^b Recovery bepaling; ^c nvt = niet van toepassing

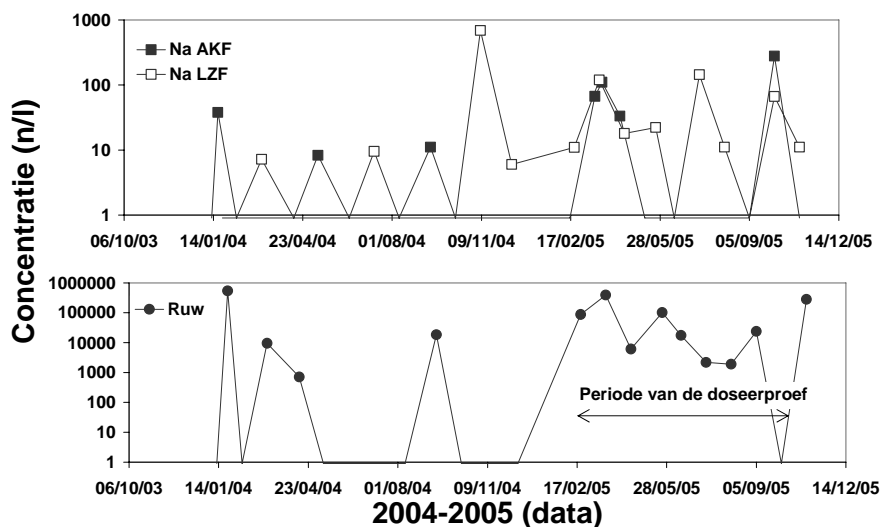
In vergelijking tot 2004 was de belasting van de zuivering met CD 4-7 tijdens de doseerproef in 2005 hoog. Na de koolfilters in het bedrijf werd in deze periode een gemiddeld aantal van 54,2 (±SD = 92; n=9; <1 -277) gemeten, een niveau vergelijkbaar met het aantal na de actieve-koolfilters in de proefinstallatie. Tevens bleek het aantal diatomeeën na de langzame zandfilters uit het bedrijf (40 per liter; SD = 52; n = 10) een factor 5 hoger dan na het filter waarmee de proef is uitgevoerd (7,5 per liter).

4.1.2 Massabalans

Op basis van de concentraties waargenomen in het influent, effluent en het zand na 184 en 253 dagen is de massabalans berekend (tabel 20; op basis van aantallen). Hieruit is het recovery R_m bepaald met

$$R_m = \frac{M_e + M_b}{M_d} \times 100\% \quad (8)$$

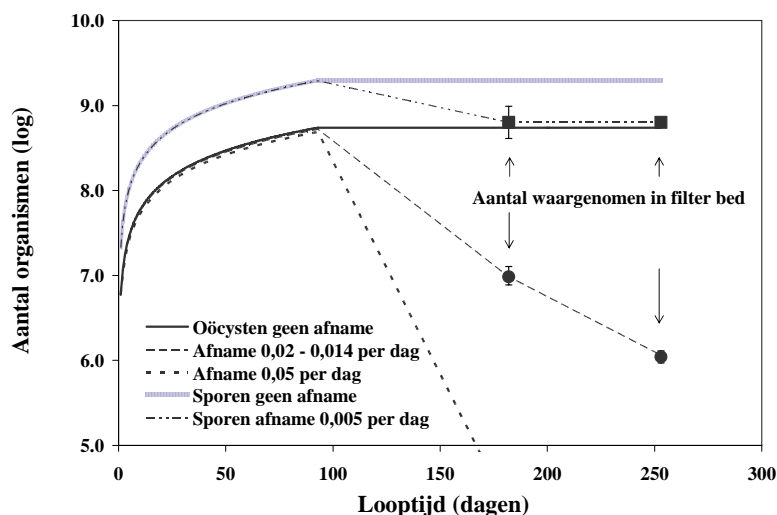
waarin M_e , M_b en M_d het totale aantal organismen is in respectievelijk effluent, filterbed en de aanvoer.



Figuur 20. Aantal centrische diatomeeën in het ruwe water (onder) en na AKF en LZF (boven) in het bedrijf tijdens de periode 2004-2005

Cryptosporidium

Slechts een kleine fractie (1,8%) van het totaal gedoseerde aantal oöcysten werd na 184 dagen teruggevonden, voornamelijk in het filterbed (tabel 20). Na 253 dagen was deze fractie gedaald tot 0,21%. De berekeningen berusten op concentraties die zijn gecorrigeerd voor de recovery van de bepaling waarvan eerder werd geconcludeerd dat deze een kwantitatief betrouwbaar beeld geeft van de werkelijke aantallen. Bij een vergelijkbare doseerproef vond Nobel *et al.* (2005) een fractie van 99% terug in een zandpakket belast met oöcysten met dezelfde analysetechniek na een periode van ca. 30 dagen. Ook Schijven *et al.* (2006) toonde een hoge recovery van oöcysten (>100%) in een zandkolom direct na belading.



Figuur 21. Aantal oöcysten en sporen in het filterbed gebaseerd op aanvoer in de proef, verwijdering en aantal gemeten in het filterbed na 184 en 253 dagen

De lage recovery in het huidige langzame zandfilteronderzoek wijst op een daling van het aantal oöcysten in het filterbed. Uit de gegevens van de

belasting van het filter met oöcysten, de mate waarin deze werden verwijderd en de hoeveelheid oöcysten waargenomen in het filterbed na 184 en 253 dagen is met behulp van een simpele modellering van de accumulatie in het bed, een afnamesnelheid van 0,02-0,014 log/d geschat (figuur 21).

In figuur 21 is tevens de lijn weergegeven met een afnamesnelheid van 0,05 per dag waaruit blijkt dat het aantal oöcysten onder die omstandigheden na beëindiging van de dosering niet veel lager zou zijn geweest, maar wel tijdens de voortgaande looptijd zonder dosering.

Sporen van *C. perfringens*

Op dezelfde wijze als voor de oöcysten is de massabalans berekend voor de sporen van *C. perfringens*. Uit deze gegevens komt naar voren dat de recovery van de sporen meer dan een factor 10 hoger was, ca. 37-45% (tabel 20). Nobel *et al.* (2005) vond voor zijn proeven een recovery van 68% van de gedoseerde sporen van *C. perfringens* en Schijven *et al.* (2006) >95%. Van een afname van het aantal sporen in het filterbed tussen de twee monsterdata van de profielen was geen sprake. Gebaseerd op de afname van het aantal sporen in het filterbed van ca. 2×10^9 naar 8×10^8 (tabel 20) in ca. 80 dagen tussen beëindiging van de dosering en de eerste profielmeting kan een afnamesnelheid van 0,005 log/d worden berekend (figuur 21). Deze afnamesnelheid komt qua orde van grootte overeen met waarden die eerder voor natuurlijke sporen van *C. perfringens* zijn bepaald in oppervlaktewater door Medema *et al.* (1997).

Tabel 20. Aantal oöcysten en sporen in aanvoer M_d , effluent M_e en filterbed M_b

	M_d	M_e	M_b^a	R_m^a (%)
<i>C. parvum</i>	$5,4 \times 10^8$	$9,8 \times 10^3$	$9,7 \times 10^6$; $1,1 \times 10^6$	1,8; 0,21
<i>C. perfringens</i>	$1,9 \times 10^9$	$5,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^8$; $8,6 \times 10^8$	36,9; 45,3

^a na 184 en 253 dagen

Centrische diatomeeën

Door de aanwezigheid van hoge aantallen natuurlijke CD 4-7 in het aangevoerde water is voor deze organismen geen recovery-berekening uitgevoerd. Opvallend zijn wel de lage concentraties van de organismen in het filterbed (tabel 15). Het lijkt er op dat het filter maar een geringe capaciteit heeft om deze organismen te verwijderen.

4.1.3 Conclusies

De DEC van langzame zandfiltratie voor *Cryptosporidium*, die in dit onderzoek is bepaald, komt overeen met de hoge waarden bepaald in andere studies. Er zijn studies waarin lagere waarden zijn bepaald voor zandkolommen of zandfilters met een relatief korte contacttijd. Een systematische invloed van andere eigenschappen van micro-organismen en/of filter bed op de mate van verwijdering werd niet gevonden.

Uit de gegevens van het huidige onderzoek komt naar voren dat accumulatie en vertraagd transport van persistente micro-organismen als *Cryptosporidium* en clostridia sporen optreedt, maar dat een langere continue dosering nodig is om een langzame afname van de verwijderingscapaciteit van het filter te kunnen waarnemen. De berekende recoveries voor de oöcysten en de sporen

zijn lager dan 100%. De twee belangrijkste factoren die hier in meer of mindere mate voor verantwoordelijk zijn, zijn

- de opbrengst van de verschillende analysemethoden toegepast bij de bepaling van de concentraties in water en zand;
- afname van het aantal in het filter door natuurlijke processen als afsterving, predatie en uiteenvallen. Op dit laatste aspect wordt in de volgende paragraaf nader ingegaan.

4.2 Afname van het aantal geaccumuleerde micro-organismen in het filterbed

Voor de beoordeling van dit aspect is het van belang te definiëren wat onder "afname van het aantal" wordt verstaan.

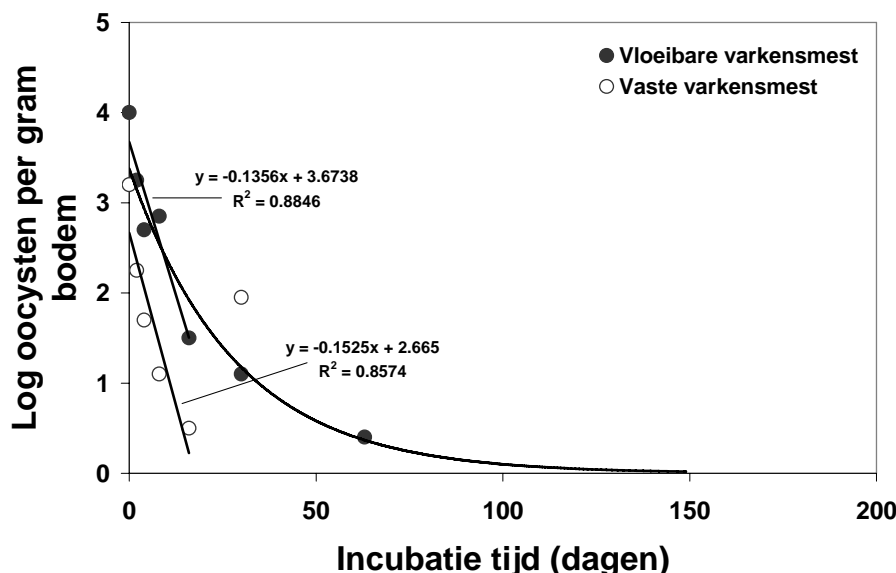
- Bij de oöcysten en centrische diatomeeën gaat het om de afname van de microscopisch getelde organismen. Er wordt hierbij niet bedoeld op de afname van de levensvatbaarheid en zeker niet op de afname van de mate waarin de levensvatbare organismen infectieus zijn. Beide eigenschappen zijn niet bepaald van de gedoseerde oöcysten. Omdat er een groot belang werd gehecht aan de veiligheid, werden de gedoseerde oöcysten vooraf geïnactiveerd m.b.v. UV-straling.
- Bij de sporen gaat het om de afname van de levensvatbare sporen omdat het aantal werd bepaald met behulp van een kweekmethode.

4.2.1 De afnamesnelheid

Uit de resultaten van de meting van het aantal organismen in het filterbed bleek dat het aantal oöcysten beduidend lager was, een factor ≥ 100 , dan het aantal sporen (figuur 15). Dit ondanks een gering verschil in dosering tussen beide organismen en een lagere verwijdering van de sporen. In een doseerexperiment uitgevoerd door Timms *et al.* (1995) werd het aantal geaccumuleerde oöcysten direct na afloop gemeten. Ook hier bleek het grootste aantal in de eerste centimeters van het bed te zijn geaccumuleerd. De recovery R_m was echter veel hoger (80%). Het lijkt er dan ook op dat er in het filterbed van het huidige onderzoek een snelle afname van oöcysten heeft plaatsgevonden, een afname die voortduurde tussen de twee afzonderlijke profielmetingen na respectievelijk 184 en 253 dagen. Voor de sporen werd geen verdere daling van het aantal meer waargenomen in deze periode (figuur 15).

Hutchison *et al.* (2005) presenteerde een studie naar het lot van oöcysten en (pathogene) bacteriën in de bodem van een grasland direct onder een oppervlak dat werd belast met diverse mestsoorten verrijkt met diverse pathogenen waaronder ook oöcysten (5-15°C). De recovery-percentages van de huidige studie zijn hoog vergeleken met die gepresenteerd door Hutchison *et al.* (2005) in bodem belast met diverse mestsoorten verrijkt met oöcysten (0,005%). Uit de resultaten bleek dat de oöcysten fysiek langer aanwezig blijven (microscopische telling) dan pathogene bacteriën (kweekmethoden). Genoemde publicatie gaat net als het onderhavige onderzoek niet in op de mate waarin de teruggevonden oöcysten infectieus zijn (de viability bleef 100%). De studie berekende op grond van de aantallen oöcysten een D-waarde (tijd voor 1 decimale reductie) die varieerde tussen 8 en 31 dagen (uitgaande van een eerste-orde-afnamesnelheid). In figuur 21 wordt als

voorbeeld de afnamesnelheid getoond van het aantal oöcysten in de bodem belast met vloeibare en vaste varkensmest. Op grond van deze gegevens werd voor de eerste 20-40 dagen een afnamesnelheid van respectievelijk 0,136 ($r^2 = 0,88$; $n = 5$) en 0,153 log/d ($r^2 = 0,87$; $n = 5$) berekend (figuur 21).



Figuur 21. Afname van het aantal oöcysten in een bodem 15 cm onder een oppervlak belast met mest verrijkt met oöcysten (uit Hutchison et al. 2005)

King et al (2005) beschrijft een studie naar de afsterving van *Cryptosporidium* in water bepaald met telling van het aantal oöcysten en meten van de mate waarin de overleefde oöcysten infectieus zijn m.b.v. ATP en de TaqMan celkweek assay. De afsterving werd gemeten in MilliQ water (met chloor behandeling) en oppervlaktewater uit een reservoir met en zonder autoclaveren. 5×10^5 oöcysten werden in 10 ml geïncubeerd gedurende 12 weken. In het MilliQ water en het geautoclaveerde oppervlaktewater werd geen afname van aantal oöcysten waargenomen, in het onbehandelde oppervlaktewater wel. Uit de figuren gepresenteerd in de studie is de afnamesnelheid (log/dag) berekend en vermeld in tabel 21.

Tabel 21. De afnamesnelheid k van het aantal oöcysten in onbehandeld oppervlaktewater bij 3 temperaturen waargenomen door King et (2005)

	k (dag ⁻¹)	n ; r^2 ; P^a
15°C	-0.0027	5; 0.87; 0.02
20°C	-0.0069	5; 0.74; 0.06
25°C	-0.0076	4; 0.70; 0.16

^a n = aantal waarnemingen; regressie coëfficiënt en significantie niveau P

De afnamesnelheid die is geschat uit de gegevens van de huidige studie van 0,02-0,014 is duidelijk hoger dan die bepaald voor de oöcysten afname waargenomen door King et al. (2005) maar duidelijk lager dan de waarden van 0,136 en 0,153 log/d berekend uit de gegevens van Hutchison et al (2005). Dat de waarden van de huidige studie tussen beide studies in valt, is aannemelijk op grond van de matrixverschillen: oppervlaktewater bij King en met mest belaste bodem in de studie van Hutchison.

4.2.2 Desintegratie of predatie

De afname van het aantal oöcysten kan zijn opgetreden door desintegratie of predatie. Voor desintegratie werden geen aanwijzingen gevonden; de getelde oöcysten in het zand waren nog intact. Er werd alleen enige afname van antilichaamopname door de in de schmutzdecke aanwezige oöcysten gevonden. King *et al.* (2005) namen clustering, verminderde antilichaamopname en celwanddeformatie van de oöcysten in het oppervlaktewater waar, waarnemingen die eerder in de literatuur waren beschreven onder invloed van predatie van oöcysten. Hieruit concludeerde King *et al.* (2005) dat de afname het gevolg moet zijn geweest van predatie. De aanwezigheid van zoöplankton in langzame zandfilters, waaronder protozoa en rotiferen, is eerder uitvoerig beschreven door Lloyd (1973) en de rol van deze organismen als predatoren in filter bedden is beschreven in diverse studies (Lloyd, 1996; Weber-Shirk en Dick, 1997; Bomo *et al.*, 2004). De eerste studie die opname van oöcysten door rotiferen aantoonde was die van Fayer *et al.* (2000). Ze zagen uitscheiding van oöcysten door rotiferen in de fecale pellets, maar ze konden geen afbraak van de oöcysten aantonen. Opname van oöcysten door rotiferen, protozoa (*Stylonychia mytilus*, *Paramecium caudatum*) en *Acanthamoeba culbertsoni* werd aangetoond door Scott *et al.* (2001; 2003) in laboratorium experimenten. De predatie-activiteit verschilde per organisme en werd waargenomen voor zowel hoge als lage concentraties oöcysten (9 – 9000 oöcysten). De hoogste snelheid werd gemeten voor de ciliaat *P. caudatum* en varieerde van 0,01 (9 oöcysten) tot 0,05 en 1,11 oöcysten per ciliaat per minuut (respectievelijk 90 en 9000 oöcysten). Recent is een studie gepresenteerd waarin de beweeglijkheid van protozoa door nauwe kanalen is bestudeerd (Wang *et al.*, 2005). Aangetoond werd dat protozoa in staat zijn zich door nauwe kanalen te bewegen die even groot of kleiner zijn dan de eigen diameter van het organisme.

De gegevens van de zoöplanktonmeting van het huidige onderzoek maken het aannemelijk dat predatie een belangrijke rol heeft gespeeld bij de afname van het aantal oöcysten in het filter bed. Er zijn 8 verschillende soorten zoöplankton in het filterbed waargenomen (tabel 16) waarvan twee soorten, *Testacae* and *Rotatoria*, familie zijn van zoöplanktonsoorten waarvan predatie van oöcysten is beschreven (Fayer, 2000; Scott *et al.*, 2001; 2003). De andere soorten kunnen indirect ook bijdragen aan predatie door opname van de predatoren.

Wanneer de waargenomen oöcystenafname in het filterbed is veroorzaakt door predatie en hetzelfde geldt voor de afname van oöcysten gevonden door Hutchison *et al.* (2005) en King *et al.* (2005), dan komen de orde van grootte van de afnamesnelheden van deze studies en die van de huidige studie overeen met de aangenomen dichtheid van predatoren (geen gegevens van de literatuurstudies voor handen): Hutchison *et al.* feacaal belaste grond > huidige studie van opgelost feacaal materiaal op filterbed > King *et al.* oöcysten gesuspenseerd in reservoir water.

Uit de gegevens van de sporen (figuur 21) blijkt dat de sporen duidelijk minder gevoelig zijn voor predatie. Gelet op de geringe watersnelheid in het filterbed en een hoge predatiesnelheid van 1,11 oöcyst per organisme (Scott *et*

al., 2003), is het aannemelijk dat predatie een significante rol heeft gespeeld bij de hoge verwijdering van 5 log. In een predatiestudie met *Aeromonas hydrophila* in een filterbed werd aangetoond dat de verwijderingscapaciteit van het filter significant ($p = 0,005$) gecorreleerd was met het aantal protozoa in het bed (Bomo *et al.* (2004).

4.2.3 Inactivatie

Zonder predatie is inactivatie is het enige proces dat van belang is om het gezondheidsrisico van reversibel gehechte oöcysten in het filterbed te verminderen. Fayer *et al.* 1998a toonde aan dat *C. parvum* oöcysten infectieus blijven (muis-infectiviteitstest) na 168 dagen in demiwater bij 5 and 15°C en ook na meer dan 84 dagen bij 10 en 20°C (Fayer *et al.* 1998b). Davies *et al.* (2004) presenteerden inactivatieexperimenten met *Cryptosporidium* oöcysten geënt in 0,5 gram lucht-gedroogd en gezeefd (1200 µm) bodemmateriaal uit waterwingebieden in Australië. De inactivatiesnelheid van 0,0135 – 0,0151 log/d bij 20°C was gebaseerd op levensvatbaarheid bepaald met fluorescentie in situ hybridisatie (FISH). Ze beargumenteerden dat de overeenkomst van de levensvatbaarheidsgegevens met de infectiviteit van de oöcysten verder onderzocht moet worden. De aantallen oöcysten in de monsters bleven constant gedurende de 180 dagen incubatie bij 20°C en dit laat zien dat desintegratie en predatie onder deze condities niet optrad.

In de study van King *et al.* (2005) werd de afname van infectiviteit van de oöcysten tijdens de incubatie bepaald met de cultuur-Taqman PCR assay en met ATP. Een inactivatie snelheid van 0,01 per dag ($n = 5$; $r_2 = 0,93$; $P = 0,007$), 0,045 ($n = 5$; $r_2 = 0,96$; $P = 0,004$) en 0,049 ($n = 5$; $r_2 = 0,79$; $P = 0,04$) bij respectievelijk 15, 20 en 25°C in onbehandeld reservoirwater werd berekend. Deze snelheden zijn in dezelfde orde van grootte als waargenomen in een geautoclaveerd reservoir en MilliQ water. De snelheid van 0,01 per dag ligt in dezelfde orde van grootte als de afnamesnelheid van de aantallen bepaald in de huidige studie. Dit duidt erop dat ook de afname van infectiviteit van de opgehoopte oöcysten bijdraagt aan de afname van het risico van remobilisatie en vertraagde doorbraak.

4.2.4 Conclusies

Het aantal oöcysten opgehoopt in langzame zandfilters zal, vermoedelijk onder invloed van predatie, afnemen. De snelheid hangt af van de temperatuur en is afhankelijk van de concentratie, samenstelling en activiteit van de predatoren. Bij de temperatuur van het water te Leiduin en de lage belasting ligt de afname op ca. 0,01 dag⁻¹. Een dergelijke snelheid is ook gemeten voor de afname van het aantal infectieuze oöcysten. De sporen daarentegen zullen, op grond van de afstervingsgegevens, zeer lang overleven in het filterbed en er zijn geen aanwijzingen gevonden op een sterke invloed van predatie op het aantal sporen.

Op grond van deze resultaten kan worden gesteld dat SSRC geen goede surrogaatparameter is voor de verwijdering van oöcysten door langzame zandfilters. Het gevaar van accumulatie, overleving en doorslag van oöcysten voor de microbiologische veiligheid van drinkwater is waarschijnlijk afwezig

of zeer klein. Deze conclusie zal met modelsimulaties nader worden onderzocht.

4.3 Vertaling naar *Giardia* cysten en onzekerheden

Op grond van de gegevens van het onderhavige onderzoek en ook gegevens gevonden in andere onderzoeken, heeft langzame zandfiltratie een hoge capaciteit om *Cryptosporidium* oöcysten te verwijderen van ca. 5 log. Gelet op het grootteverschil met de cysten van *Giardia*, de andere pathogene protozoa genoemd in het nieuwe Waterleidingbesluit, (*Giardia* > *Cryptosporidium*), wordt aangenomen dat deze conclusie ook voor deze indexpathogeen geldt.

De proef is uitgevoerd met een goed ingelopen filter met een Schmutzdecke van ca. 3 jaar in het voorjaar en de zomerperiode met stijgende temperatuur. De positieve invloed van de een hoge biologische activiteit in het filterbed op de verwijdering van (oö)cysten van *Giardia* en *Cryptosporidium* is eerder beschreven door Bellamy *et al.* (1985), Schuler *et al.* (1991) en Fogel *et al.* (1993) en is gebaseerd op de lagere verwijdering gevonden bij aanvang van het proces en ook bij lagere temperaturen. De eerste twee genoemde studies toonden ook aan dat de hoge verwijdering onafhankelijk was van de schmutzdecke. Dit zou betekenen dat schrapen geen effect heeft op de verwijdering, maar dat in de winterperiode deze enigszins verlaagd zou kunnen zijn. Het is de vraag of dit een grote invloed heeft op de DEC.

5 Eindconclusies en aanbeveling

Op grond van dit onderzoek kan worden geconcludeerd dat zowel de (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* effectief worden verwijderd door langzame zandfiltratie. De Decimale Eliminatie Capaciteit van het filter bedreven onder de bedrijfscondities van het zuiveringsproces Leiduin voor oöcysten is minimaal 4,7 log en zal voor de cysten van *Giardia* minimaal vergelijkbaar zijn.

Tevens is gebleken dat, waarschijnlijk door het optreden van predatie in het filterbed, er geen sprake is van ophoping en een vertraagde doorbraak van infectieuze oöcysten, die van invloed zou kunnen zijn op het infectierisico niveau op langere termijn.

Dit proces is echter wel van invloed op de verwijdering van beide surrogaatparameters, de sporen van sulfiet-reducerende clostridia (SSRC) en centrische diatomeeën. Deze parameters zijn dan ook ongeschikt om de DEC van de langzame zandfilters voor de pathogene protozoa te bepalen onder praktijkcondities, zoals voorgesteld in de Inspectierichtlijn VROM (2005).

Het strekt tot de aanbeveling om de hypothese van predatie van oöcysten en ook andere micro-organismen nader te onderzoeken. Doel is om vast te stellen in welke mate dit proces bijdraagt aan de verwijdering van deze organismen in langzame zandfilters en welke factoren dit proces beïnvloeden.

6 Literatuur

- Bellamy, W.D., G.P. Silverman, D.W. Hendricks and G.S. Logsdon (1985) Removing *Giardia* cysts with slow sand filtration. Jour. Am. Wat. Works Assoc. 77(2):52-60.
- Bomo, A., T. K. Stevik, I. Hovi and J.F. Hanssen (2004) Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters. J. Environ. Qual. 33:1041-1047.
- Chung, J., W.A.M. Hijnen, G. Vesey and N.J. Ashbolt (2004) Potential *Cryptosporidium* oöcyst surrogates for sand filtration and the importance of their surface properties. In Proc. Int. *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference, Amsterdam, 20-24 September, 2004.
- Chung, J., W.A.M. Hijnen, G. Vesey and N.J. Ashbolt (2006) Potential *Cryptosporidium* oöcyst surrogates for sand filtration and the importance of their surface properties. Dissertation in preparation.
- Davies, C.M., C. Kaucner, N. Altavilla, N.J. Ashbolt, C.M. Ferguson, M. Krogh, W.A.M. Hijnen, G.J. Medema and D.A. Deere (2005) Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. AWWARF, Denver, US.
- Davies, C.M., N. Altavilla, M. Krogh, C.M. Ferguson, D.A. Deere and N.J. Ashbolt (2004) Environmental inactivation of *Cryptosporidium* oöcysts in catchment soils. Jour. Appl. Microbiol.
- Dullemon, Y.J. (2002) Risicoanalyse *Cryptosporidium* en *Giardia* en de aantoonbare verwijdering van SSRC in het zuiveringsproces te Weesperkarspel. WLB rapport.
- Dullemon, Y.J. en P.W. Scholte (2004) Voorlopige risicoanalyse *Cryptosporidium* en *Giardia* in de voorzuivering te Nieuwegein en het zuiveringsproces Leiduin. WLB rapport.
- Fayer, R., J.M. Trout and M.C. Jenkins (1998a) Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oöcysts stored in water at Environmental temperatures. J. Parasitol. 84: 1165-1169.
- Fayer, R., T.K. Graczyk, E.J. Lewis, J.M. Trout and C.A. Farley (1998b) Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oöcysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake bay. Appl. Environ. Microbiol. 64(3): 1070-1074.
- Fayer, R., J.M. Trout, E. Walsh and R. Cole (2000) Rotifers ingest oöcysts of *Cryptosporidium parvum*. J. Eukaryot. Microbiol. 47(2): 161-163.

Fogel, D., J. Isaac-Renton, R. Guasparini, W. Moorehead and J. Ongerth (1993) Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by Slow Sand Filtration. Jour. Am. Wat. Work Assoc. 85(11):77-84.

Hijnen, W.A.M, D. Veenendaal, W.M.H. van der Speld, A. Visser, W. Hoogenboezem and D. van der Kooij (2000) Enumeration of faecal indicator bacteria in large water volumes using on site membrane filtration to assess water treatment efficiency. Water Res. 34:1659-1665.

Hijnen, W.A.M., A.J. Van der Veer, J. Van Beveren and G.J. Medema (2002) Spores of sulphite-reducing clostridia (SSRC) as surrogate for verification inactivation capacity of full-scale ozonation for *Cryptosporidium*. Wat. Sci. Tech.: Wat. Sup. 2:163-170.

Hijnen, W.A.M. en J.F. Schijven (2003) De eliminatiecapaciteit van langzame zandfiltratie voor micro-organismen. Proefinstallatie- en laboratoriumonderzoek. BTO rapport 2002.133.

Hijnen, W.A.M., J.F. Schijven, P. Bonné, A. Visser and G.J. Medema (2004) Elimination of viruses, bacteria and protozoan oöcysts by slow sand filtration. Water Sci. Technol. 50:147-154.

Hijnen, W.A.M., A.J. Brouwer-Hanzens, K. Charles and G.J. Medema (2005) Transport of MS2 phage, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in a gravel and a sandy soil. Environ. Sci. Technol. 40:1371.

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, T., Thomas, D.J.I. and Avery, S.M. (2005) Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. Appl. Environ. Microbiol. 71(2): 691-696.

King, B.J., A.R. Keegan, P.T., Monis and C.P. Saint (2005) Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oöcyst metabolic rate and associated retention of infectivity. Appl. Environ. Microbiol. 71 (7): 3848-3857.

Lloyd, B. (1973) The construction of a sand profile sampler: its use in the study of the *Vorticella* populations and the general interstitial microfauna of slow sand filters. Water Res. 7:963-973.

Lloyd, B.J. (1996) The significance of protozoan predation and adsorption for the removal of bacteria by slow sand filtration. In N. Graham and r. Collins (ed.) Advances in slow sand filtration and alternative biological filtration, John Wiley & Sons, West Sussex, England.

Medema, G.J., M. Bahar and F.M. Schets (1997) Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water. Wat. Sci. Tech. 35(11-12):249-252.

- Nobel, P.J. en J.Th. Groenou (2001) Verwijdering van surrogaatparameters voor protozoën bij WBE. Kiwa rapport, BTO 2001.142.
- Nobel, P.J. en D.G. Cirkel (2005) Effecten van begrazing en recreatie op de microbiologische waterkwaliteit. Kiwa rapport, BTO 2005.006
- Schijven, J.F., H.A.M. de Bruin, S.M. Hassanizadeh and A.M. de Roda Husman (2003) Bacteriophages and clostridium spores as indicator organisms for removal of pathogens by passage through saturated dune sand. Water Research 37, 2186-2194.
- Schijven, J.F., W.A.M. Hijnen, M. Colin, A. Visser and S. Bradford (2006) Removal of microorganisms by slow sand filtration. Submitted to Jour. Cont. Hydrol.
- Schuler, P.F., M.M. Ghosh and P. Gopalan (1991) Slow sand and diatomaceous earth filtration of cysts and other particulates. Water Res. 25:995-1005.
- Scott, R., E. Matsushita and A. Warren (2001) Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oöcysts from wastewaters in constructed wetlands. Wat. Sci. Tech. 44(11-12); 194-198.
- Scott, R., E. May, E. Ramirez and A. Warren (2003) Predation of *Cryptosporidium* oöcysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. Wat. Sci. Techn. 47(3): 77-83.
- Simmons, O.D., M.D. Sobsey, C.D. Heaney, F.W. Schaefer and D.S. Francy (2001) Concentration and detection of *Cryptosporidium* oöcysts in surface water samples by method 1622 using Ultrafiltration and capsule filtration. Appl. Environ. Microbiol. 67(3), 1123-1127.
- Stuyfzand, P.J. en H. van der Jagt (1997) Toelichting op de anorganisch-chemische analysemethoden voor grond in het LAM van Kiwa. Kiwa rapport KOA 96.116, Nieuwegein.
- Timms, S., J.S. Slade and C.R. Fricker (1995) Removal of *Cryptosporidium* by Slow Sand Filtration. Wat. Sci. and Technol. 31(5-6):81-84.
- Vrouwenvelder, J.S., S.A. Manolarakis, J.C. Kruithof, J.P. Van der Hoek, J.A.M. Van Paassen, H.D.M. Rummel and D. Van der Kooij (2006) Quantitative relationship between active biomass and pressure drop increase in nanofiltration and reverse osmosis membranes.
- VROM, 2004. Inspectierichtlijn: analyse microbiologische veiligheid drinkwater. Artikelcode: 5318.

Wang, W., L.M. Shor, E.J. LeBoeuf, J.P. Wikswo and D.S. Kosson (2005) Mobility of protozoa through narrow chanel. Appl. Environ. Microbiol. **71**:4628-4637.

Weber-Shirk, M.L., and R.I. Dick (1997) Biological mechanisms in slow sand filters. J. Am. Water Works Assoc. 89:72-83.

Yoo, H.S., S.U. Lee, K.Y. Park and Y.H. Park (1997) Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *C.perfringens* types by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol 35: 228-232.

Bijlage 1 Lijst van afkortingen

ATP	= adenosine trifosfaat
BTO	= bedrijfstakonderzoek
CD	= centrische diatomeeën
DAPI	= Fluorescerend label 4-6-diamidino-2-phenylindol (DNA)
DEC	= decimale eliminatie capaciteit
DEC _m	= decimale eliminatie capaciteit gebaseerd op massa balans
DR	= directe celtelling
DZH	= Duinwaterbedrijf Zuid-Holland
EGV	= elektrisch geleidingsvermogen
EPA	= Environmental protection agency
FITC	= Fluorescerend isothiocyanaat
HES	= hoge energetische sonification
HPC	= heterotrophic plate count
KVE	= kolonievormende eenheden
LDN	= Leiduin
LES	= lage energetische sonification
LZF	= langzame zandfiltratie
MF	= membraan filtratie
NPOC	= non-purgeable organic carbon
PI	= proefinstallatie
R	= recovery
RIVM	= Rijksinstituut voor volksgezondheid en Milieu
S	= sign (<)
SSRC	= sporen van sulfiet-reducerende clostridia
STD	= standard deviatie
TDC	- total direct cell count
WGS	= water grab sampler
WLB	= Waterleidingbedrijf Amsterdam
WPK	= Weesperkarspel

Bijlage 2 Literatuur overzicht eliminatiecapaciteit langzame zandfiltratie

<i>Auteur</i>	<i>Proefcondities en organismen</i>	<i>Filterbed: zand / dikte / snelheid</i>	<i>Verwijdering (log)</i>	
			<i>Giardia</i>	<i>Crypto</i>
Bellamy <i>et al</i> 1985	Kolomproeven/ni	0.15-0.35 / 0.6-1.2/ 0.04-0.4	3.7 - 4.2	-
Logsdon <i>et al</i> 1984	Kolomproeven/ni	0.28 / 0.96 / 0.04-0.4	1.2 - 4	-
Schuler <i>et al</i> 1988;1991	Kolomproeven/formaline geïnactiveerde (oo)cysts	0.27 / 0.9 / 0.15-0.4	2.8-3.8	3.9-5.4
			5.5->6.5	4.7->6
Fogel <i>et al</i> 1993	Praktijkfilters/milieu organismen	0.2-0.3 / 1.05 / 0.3	1.2	0.3
Timms <i>et al</i> 1995	Proeffilter/gepasteuriseerde en gezuiverde oöcysten	ni / 0.5 / 0.3	-	>4.5
Hijnen <i>et al</i> 2003	Kolomproeven/gezuiverde organismen	0.3-0.6 / 0.4 / 0.3	-	>6.5

Bijlage 3 Technische gegevens van de opstelling

Filter	Langzame zandfilter 1: PI Leiduin
In bedrijf bij start	3 jaar
Debiet	780 l/h
Oppervlak	2,56 m ²
Bovenwater en bedhoogte	1,2 en 1,5 m
Volume bovenwater	3,072 m ³
Zand (d50)	0.28 mm
Nicolondoek (maaswijdte)	0.7 mm
Steunlaag grind	0.4 m
Doseerflow groot doseervat	0,78 l/h
Doseerflow klein doseervat	0,1 l/h

Bijlage 4 Recovery kiezelwieren bepaling

Recovery proef: BEPALEN VAN KIEZELWIJEREN IN REINWATER IN VOLUMINA TOT 100 LITER, WAARBIJ BEMONSTERING IS UITGEVOERD MET EEN GROVOL APPARAAT (MF-sampler).

Filter: grote polycarbonaatfilters, poriegrootte: 2 µm

Ent: chemisch gereinigde centrales ong. 6-7 µm doorsnede; **1.400.000**

Opstelling: filterhouder met grote filters gevoed met demiwater. D.m.v. injectienaald ent in aanvoerslang gebracht, daarna nog enkele liters water door het filter.

Analyse: zie voorschrift

	stroomsnelheid Tijd/liter	Vol. (l)		Aantal	aantal/ml (afger.)	% recovery
1	45"	18	Ent 1/2 ml	502		
			spoelwater 1	208		
			spoelwater 2	23		
			Totaal	733	825000	59
2*	44"	23	Ent 1/2 ml	464		
			spoelwater**	200		
			Totaal	664	748000	53
3	46"	34	Ent 1/2 ml	531		
			spoelwater 1	240		
			spoelwater 2	70		
			Totaal	841	947000	68
5	42"	16	Ent 1/4 ml	254		
			spoelwater 1	111		
			spoelwater 2	19		
			Totaal	384	865000	62
4	1'33"	20	Ent 1/4 ml	575		
			spoelwater 1	266		
			spoelwater 2	13		
			Totaal	854	1923000	(137)= 100
6	1'34"	12	Ent 1/4 ml	665		
			spoelwater 1	161		
			spoelwater 2	37		
			Totaal	863	1943000	(139)= 100

* iets materiaal verloren gegaan, injectiespuit schoot los. ** er is wel 2x gespoeld, het water is echter gelijk samengevoegd voor de bezinking.

Conclusie: gemiddelde recovery is 74%. De beste recovery bij lage stroomsnelheid, recovery ligt dan op 100%, het teveel wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door het tellen van celhelften t.o.v. hele cellen. Stroomsnelheid praktijksituatie is: 1liter/1'12" , dit is dus een vrij lage stroomsnelheid.

Martine Rosiëlle, HWL

Bijlage 5 Fysisch/chemische waterkwaliteit

Datum	Influent			pH	Effluent	
	Geleid. mS/m	Temp. oC	Troeb. NTU		Temp. oC	Troeb. NTU
03/01/2005	64.1	9.2	0.03		9.4	0.02
10/01/2005	64.4	9.2	0.01		10.1	0
17/01/2005	65	8.3	0.03		8.6	0.01
24/01/2005	64.8	7.2	0.02		7.4	0.08
31/01/2005	64.8	9.4	0		9.5	0.02
07/02/2005	65	8.8	0.03	7.89	10	0.03
15/02/2005	64.5	8.2	0.01	7.83	9.1	0.03
22/02/2005	64.8	7.4	0.01	7.88	9.4	0
01/03/2005	65	6.9	0.01	7.94	7.3	0.08
08/03/2005	64.6	8.6	0	7.96	10.1	0
15/03/2005		9.7			9.3	
22/03/2005	64.8	8.9	0.02	7.92	10.55	0.02
29/03/2005	64.7	12.4	0.01	7.85	13.6	0.03
05/04/2005	64.7	13.4	0.02	7.83	14.6	0
12/04/2005	64.8	13.4	0	7.85	13.8	0
19/04/2005	63.5	12.7	0.02	7.86	14	0
26/04/2005	63.7	14	0.01	7.84	14	0
03/05/2005	62.3	15.4	0	7.85	16	0
10/05/2005	63.5	12.5	0.01	7.89	13	0
17/05/2005	64.1	12.6	0.01	7.84	12.6	0
24/05/2005	63.7	15	0.02	7.83	15.6	0
31/05/2005	63.6	14	0.08	7.66	14.5	0.08
07/06/2005	64.3	15.3	0.02	7.74	15	0.01
14/06/2005	63.7	14.6	0.02	7.81	16	0.01
21/06/2005	62.7	17.3	0.02	7.78		
28/06/2005	62.4	18.1	0	7.75	18.9	0
05/07/2005	62	14.3	0.03	7.77	15.7	0.03
12/07/2005	61.4	18.8	0.01	7.8	19.3	0
19/07/2005	62.2	17.5	0.21	7.82	17.2	0.225
26/07/2005	62.7	15.9	0.03	7.79	16.2	0.02
02/08/2005	62.6	16.3	0.12	7.773	16.2	0.048
09/08/2005	62.6	16.2	0.02	7.84	16.7	0
16/08/2005	62.7	15.8	0.02	7.83	16.9	0.08
23/08/2005	62.4	18	0.01	7.73	18.4	0.02
30/08/2005	62.8	17.4	0.018	7.76	17.6	0.013
06/09/2005	55	18.4	0.01	7.75	19	0.61
13/09/2005					17.8	0.184
20/09/2005	63.8	14.9	0.01	7.76	15.3	0

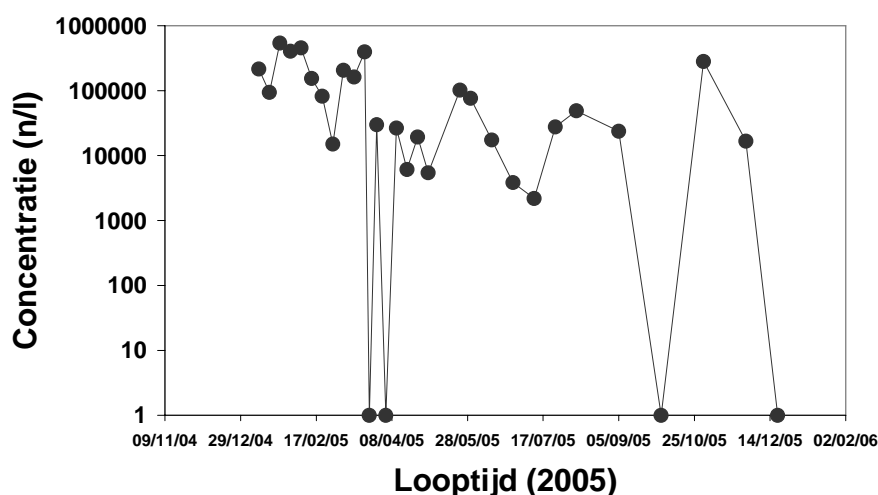
Bijlage 6 Concentraties micro-organismen

Bedrijfsgegevens ruw, snelfiltraat SF (aanvoer proefinstallatie) en actief koolfiltraat: periode 2005

	Punten ^a	n ^b	n+ ^b	Sampled Vol. (L)	Detected oöcysts	Conc. n/l	STD	Rec. ^c %	Conc. n/l
Oöcysten	Ruw	12	10	840	33	0,039	0,033	5,6	0,696
	Na SF	11	5	1583	14	0,009	0,011	5,6	0,161
SSRC	Ruw	52	50	5,2	2076	399,2	38,4	nvt	nvt
	Na SF	52	49	52	710	13,7	1,5	nvt	nvt
	Na AK	45	1	225	1	0,004	nb ^d	nvt	nvt
Diatom. 4-7 µm	Ruw	28	24	0,175	2392	1,1x10 ⁵ ,e	1,5x10 ⁵	nvt	nvt
	Na SF	23	18	0,702	581	4,7x10 ³ ,e	1,4x10 ⁴	nvt	nvt
	Na AK	9	4	nb	nb	54	92	nvt	nvt

^a bedrijfsgegevens 2005; ^b aantal monsters en aantal positieve monsters; ^c recovery Colorseed; ^d nb = niet bepaald; ^e gewogen gemiddelde (groot verschil in grootte monstervolumes)

Diatomeeen (4-7 µm) in ruw water L0601



Gedetailleerde gegevens doseringen organismen

<i>Organisme</i>	<i>periode</i>	<i>Water</i>	<i>Gem.(P50)</i>	<i>Rel STD%</i>	<i>n</i>
<i>C. parvum</i>	Klein/gekoeld	Influent	256,7 (249)	25	12
	Klein/gekoeld	Bovenwater	315,5 (259)	57	15
<i>C. perfringens</i> ^a	Groot/ongekoeld	Influent	2043 (2210)	49	11
	Groot/ongekoeld	Bovenwater	989 (800)	76	7
	Klein/gekoeld	Influent	3127 (1820)	113	9
	Klein/gekoeld	Bovenwater	1504 (1205)	78	10
Diatomeeen ^b	Volledige periode	Bovenwater	289 (290)	33,3	18
	piekdosering mei	Bovenwater	1797	26,1	4

Toetsresultaten verschil influent /bovenwater

	95%-betr.	95%-betr.	(eenzijdige)	95%-betr.
	Gelijke varianties?	Resultaat t-toets	Resultaat Wilc.-toets	p-waarde
Sporen	ja	Verschil	Verschil	0.025
Oöcysten	ja	Geen verschil	Geen verschil	0.627

Gegevens oöcysten in effluent:

	<i>Waarden</i>
Gem. Rec. effluent; Hemoflow (±STD; n; range)	43,6 (±14,4; 23; 4-67,7)
Recovery effluent; Envirocheck (±STD; n; range)	45,6 (±21,9; 6; 6,1-64,7)
Aantal monsters (n)	29
Percentage positieve monsters (n)	31 (9)
Totaal hoeveelheid bemonsterd volume in liters (n)	37.818 (29) ^b
Totaal volume gecorr. voor <i>C.perfringens</i> deel	36.267
Gemiddeld monstervolume in liters (range)	1304 (500 - 2779) ^b
Aantal oöcysten (n dosering; n na stop dosering)	20 (14; 6)
Concentratie effluent (formule 5)	0,0013

^a n = aantal monsters; STD = standaard afwijking; range = min - max); ^b monsters van eind mei/begin juni niet meegenomen vanwege neerslagvorming

Bijlage 7 Analyseresultaten van *Cryptosporidium*

Doseervat en slang

monster datum	omschrijving	Monster volume ul	cryptosporidium resultaat (n)	Concentratie n/l	Vat	Opmerking
21/02/2005	vat nieuw	1000	951	9.51E+05	Groot	handmatig geteld
21/02/2005	vat oud	100	14	1.40E+05	Groot	handmatig geteld
01/03/2005	vat	10	41	4.10E+06	Klein	handmatig geteld
02/03/2005	vat	100	478	4.78E+06	Klein	handmatig geteld
07/03/2005	vat 2	50	338	6.76E+06	Klein	handmatig geteld
07/03/2005	vat 2	50	340	6.80E+06	Klein	handmatig geteld
09/03/2005	slang	50	331	6.62E+06	Klein	handmatig geteld
14/03/2005	vat (7/3)	50	614	1.23E+07	Klein	handmatig geteld
21/03/2005	vat	50	357	7.14E+06	Klein	handmatig geteld op Dynal
22/03/2005	vat	50	349	6.98E+06	Klein	handmatig geteld op Dynal
29/03/2005	vat	50	270	5.40E+06	Klein	handmatig geteld op Dynal
30/03/2005	vat	50	274	5.48E+06	Klein	handmatig geteld op Dynal
15/02/2005	vat	100	114	1.14E+06	Groot	chemscan
21/02/2005	vat nieuw	100	1	1.00E+04	Groot	chemscan
21/02/2005	vat nieuw	1000	± 1520	1.52E+06	Groot	chemscan
21/02/2005	vat oud	100	1	1.00E+04	Groot	chemscan
21/02/2005	vat oud	1000	336	3.36E+05	Groot	chemscan
21/02/2005	slang	100	0	<1e4	Groot	chemscan
21/02/2005	slang	1000	± 1200	1.20E+06	Groot	chemscan
21/02/2005	slang	100	68	6.80E+05	Groot	chemscan
21/02/2005	slang	1000	77	7.70E+04	Groot	chemscan
28/02/2005	vat 1	100	73	7.30E+05	Klein	chemscan

Doseervat en slang	omschrijving	Monster	cryptosporidium	Concentratie	Vat	
		volume	resultaat	n/l	Opmerking	
		ul	(n)			
28/02/2005	vat 2	100	± 500	5.00E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 3	100	244	2.44E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 1	10	2	2.00E+05	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 2	10 ul	0	<1e5	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 3	10	8	8.00E+05	Klein	chemscan
02/03/2005	vat	10	89	8.90E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 3	1000		0.00E+00	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 1	50	56	1.12E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 1	50	44	8.80E+05	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 1	50	223	4.46E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 2	50	366	7.32E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 2	50	378	7.56E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 2	50		0.00E+00	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 3	50	355	7.10E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 3	50	336	6.72E+06	Klein	chemscan
28/02/2005	vat 3	50		0.00E+00	Klein	chemscan
07/03/2005	vat 1	50	251	5.02E+06	Klein	chemscan
07/03/2005	vat 2	50	339	6.78E+06	Klein	chemscan
07/03/2005	vat 3	50	415	8.30E+06	Klein	chemscan

Influent en bovenwater

Monster Datum	Omschrijving	Oöcysten in onderzocht 100 ml	Colorseed/100 ml	Concentratie n/l	Concentratie n/l Gecorrigeerd	Opmerking	Vat
15/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	Groot
16/02/2005	influent	1		10		Chemscan	Groot
16/02/2005	influent	38		38		Chemscan	Groot
17/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	Groot
17/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	Groot
21/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	Groot
21/02/2005	influent	50		500	761	hand	Groot
21/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	Groot
21/02/2005	influent	3		30	46	hand	Groot
28/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	klein
28/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	klein
28/02/2005	influent	0		<10		Chemscan	klein
01/03/2005	influent	0		<10		Chemscan	klein
28/02/2005	influent	5		50		Chemscan	klein
28/02/2005	influent	8		80		Chemscan	klein
01/03/2005	influent	37		370	563	Chemscan	klein
07/03/2005	influent	5		50		Chemscan	klein
07/03/2005	influent	3		30		Chemscan	klein
08/03/2005	influent	2	2	20		hand	klein
07/03/2005	influent	21	79	210	263	hand	klein
07/03/2005	influent	14	30	140	462	hand	klein
28/02/2005	influent	10		100	152	hand	klein
01/03/2005	influent	70		700	1066	hand	klein
07/03/2005	influent	11		110	167	hand	klein
08/03/2005	influent	24		240	365	hand	klein
09/03/2005	influent	15	61	150	243	hand	klein

Influent bovenwater	Omschrijving	Oöcysten in onderzocht 100 ml	Colorseed /100 ml	Concentratie n/l	Concentratie n/l Gecorrigeerd	Opmerking	Vat
14/03/2005	influent	18	70	180	255	hand	klein
22/03/2005	influent	15	84	150	177	hand	klein
30/03/2005	influent	20	67	200	296	hand	klein
05/04/2005	influent	12	52	120	228	hand	klein
12/04/2005	influent	22	70	220	311	hand	klein
19/04/2005	influent	24	98	240	242	hand	klein
26/04/2005	influent	11	65	110	168	hand	klein
03/05/2005	influent	19	61	190	308	hand	klein
10/05/2005	influent	13	75	130	172	hand	klein
18/05/2005	influent	20	60	200	330	hand	klein
21/02/2005	bovenwater	0		<10		Chemscan	Groot
21/02/2005	bovenwater	46		460	700	hand	Groot
21/02/2005	bovenwater	0		<10		Chemscan	Groot
07/03/2005	bovenwater	6		60		Chemscan	klein
07/03/2005	bovenwater	7		70		Chemscan	klein
08/03/2005	bovenwater	0		0		Chemscan	klein
07/03/2005	bovenwater	0	56			hand	klein
07/03/2005	bovenwater	0	26			hand	klein
08/03/2005	bovenwater	14		140	213	hand	klein
23/03/2005	bovenwater	43	63	430	676	hand	klein
30/03/2005	bovenwater	23	77	230	296	hand	klein
05/04/2005	bovenwater	14	54	140	257	hand	klein
12/04/2005	bovenwater	20	57	200	347	hand	klein
18/04/2005	bovenwater	17	65	170	259	hand	klein
19/04/2005 dag 1	bovenwater	28	69	280	402	hand	klein
25/04/2005 dag 7	bovenwater	16	48	160	330	hand	klein

Influent bovenwater	Omschrijving	Oöcysten in onderzocht 100 ml	Colorseed /100 ml	Concentratie n/l	Concentratie n/l Gecorrigeerd	Opmerking	Vat
26/04/2005 dag 1	bovenwater	11	61	110	179	hand	klein
02/05/2005 dag 7	bovenwater	15	98	150	152	hand	klein
03/05/2005 dag 1	bovenwater	26	75	260	343	hand	klein
09/05/2005 dag 7	bovenwater	15	73	150	203	hand	klein
10/05/2005 dag 1	bovenwater	18	78	180	228	hand	klein
17/05/2005 dag 7	bovenwater	10	86	100	115	hand	klein
18/05/2005	bovenwater	60	80	600	743	hand	klein

Effluent

Monster datum	Kiwa code	Monster volume l	Concentraat		Cryptosporidium		Recov. %	concentratie		opmerking	Telling
			totaal gr. B1	bewerk. gr. B2	oöcysten n	C seeds n		Zonder cor. n/l	met cor.n/l		
16/02/2005	M-050497	950	10.05	9.931	0	2		< 0,0011		chemscan	
16/02/2005	M-050497	950	10.05	9.931	0	39	39.39	< 0,0011	< 0,0028	Hand	
01/03/2005	M-050666	1070	6.731	6.372	0	5		< 0,0010		chemscan	
01/03/2005	M-050666	1070	6.731	6.372	0	59	59.60	< 0,0010	< 0,0017	Hand	
08/03/2005	M-050571	929	9.45	9.298	0	47	47.47	< 0,0011		chemscan	
08/03/2005	M-050571	929	9.45	9.298	0	49	49.49	< 0,0011	< 0,0022	Hand	
15/03/2005	M-051338	990	6.468	6.343	7	48	48.48	0.0072	0.0149	Hand	
22/03/2005	M-051339	1268	8.147	7.593	5	53	53.54	0.0042	0.0079	Hand	
30/03/2005	M-051436	1141	9.997	9.748	0	67	67.68	<0,0009	< 0,0013	Hand	
05/04/2005	M-051482	1408	7.051	6.844	0	41	41.41	<0,0007	< 0,0018	Hand	
12/04/2005	M-051592	1453	7.684	7.388	1	55	55.56	0.0007	0.0013	Hand	
19/04/2005	M-051656	1322	7.299	7.06	0	63	63.64	< 0,0008	< 0,0012	Hand	
26/04/2005	M-051724	1661	5.98	5.679	1	43	43.43	0.0006	0.0015	Hand	mooie celwand goed gekleurd Celwand onderbroken

Verwijdering van *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens* en
centrische diatomeeën door langzame zandfiltratie

BTO 2006.051
september 2006

Effluent datum	Kiwa code	Monster volume l	Concentraat		Cryptosporidium		Recov. %	concentratie		opmerking	Telling
			totaal gr. B1	bewerk. gr B2	oöcysten n	C seeds n		Zonder cor. n/l	met cor.n/l		
03/05/2005	M-051896	1321	6.294	6.133	0	66	66.67	< 0,0008	< 0,0012	Hand	
10/05/2005	M-052033	1267	7.215	6.982	0	42	42.42	< 0,0008	< 0,0019	Hand	
18/05/2005	M-052089	1225	10.328	9.851	0	31	31.31	< 0,009	< 0,0027	Hand	
26/05/2005	M-052194	4615	10.215	9.856						Hand	Hemoflow wit neerslag
30/05/2005	M-052206	6670	10.332	9.802		0				Hand	Hemoflow wit neerslag
01/06/2005	M-052207	1399	9.105	8.793		0				Hand	Hemoflow wit neerslag
06/06/2005	M-052224	500	10.136	9.935	1	51		0.0020	0.00396	Hand	Envirocheck
14/06/2005	M-052303	1099	7.314	7.092	1	35	35.35	0.0009	0.0027	Hand	Hemoflow
14/06/2005	M-052304	930	8.456	8.262	1	45	45.45	0.0011	0.002421	Hand	Envirocheck
21/06/2005	M-052490	1041	5.505	5.237	0	6	6.06	0.0000	0.000000	Hand	Envirocheck
21/06/2005	M-052491	1312	7.229	7.077	2	4	4.04	0.0016	0.0385	Hand	Hemoflow
27/06/2005	M-052642	945	7.727	7.388	0	38	38.38	0.0000	0.000000	Hand	Envirocheck
27/06/2005	M-052643	1216	6.551	6.257	1	33	33.33	0.0009	0.0026	Hand	Hemoflow wit neerslag
06/07/2005	M-052816	2779	7.187	6.941	0	56	56.57	0.0000	0.000000	Hand	Envirocheck
06/07/2005	M-052817	2077	7.941	7.684	0	36	36.36	0.0000	0.0000	Hand	Hemoflow wit neerslag
14/07/2005	M-052910	1290	8.992	8.612	0	62	62.63	0.0000	0.000000	Hand	Envirocheck
14/07/2005	M-052911	1483	8.713	8.344	0	42	42.42	0.0000	0.0000	Hand	Hemoflow
26/07/2005	M-053011	1270	8.738	8.486	0	64	64.65	0.0000	0.000000	Hand	Envirocheck
26/07/2005	M-053012	1386	9.43	9.16	0	46	46.46	0.0000	0.0000	Hand	Hemoflow
24/08/2005	M-053262	1727	6.708	6.363	0	29	29.29	0.0000	0.0000	Hand	Hemoflow
19/09/2005	M-053639	1408	9.987	9.901	0	36	36.36	0.0000	0.0000	Hand	Hemoflow
19/10/2005	M-054159	1350	6.133	5.98	0	28	28.28	0.0000	0.0000	Hand	Hemoflow

Bijlage 8 Analyseresultaten van *C. perfringens*

monsterdatum Kiwa	dag 1 en dag 7 van zelfde vat	Bovenwater	Influent
23/02/2005		540 1860	< 2 3000 2730 2150
02/03/2005		585	2410 2480 2210
07/03/2005			1 week niet gedoseerd
08/03/2005		170 220 390	10 < 10 < 10
14/03/2005		< 10	1940
15/03/2005		1930	2000
23/03/2005		800	3200
29/03/2005		1400	200
05/04/2005		100	< 100
12/04/2005		250	150
18/04/2005		320	12100
19/04/2005	dag 1	1990	2300
25/04/2005	dag 7	1350	1400
26/04/2005	dag 1	1060	3200
02/05/2005	dag 7	80	1820
03/05/2005	dag 1	1840	1800
09/05/2005	dag 7	860	1320
10/05/2005	dag 1	2320	< 40
17/05/2005	dag 7	1060	360
19/05/2005		4160	3840

Effluent Hemoflow gegevens								
Monster		Kiwa	monster	concentraat		Clostridia perfringens		
datum		code	volume	totaal	inbewerking	ruw		volume
Kiwa	dag		l	ml	ml	n	S	n/l
22/03/2005	36	M-051339	1268	800	50	15		0.1893
30/03/2005	44	M-051436	1141	800	50	170		2.3839
05/04/2005	50	M-051482	1408	800	50	10		0.1136
12/04/2005	57	M-051592	1453	800	50	6		0.0661
19/04/2005	64	M-051656	1322	800	50	3		0.0363
26/04/2005	71	M-051724	1661	800	50	5		0.0482
03/05/2005	79	M-051891	1321	800	50	4		0.0484
10/05/2005	86	M-052033	1267	800	50	1		0.0126
18/05/2005	94	M-052089	1225	800	50	0	<	0.0131
26/05/2005	102	M-052194	4615	800	40	21		0.0910
30/05/2005	106	M-052206	6670	800	50	43		0.1031
01/06/2005	107	M-052207	1399	800	50	12		0.1372
14/06/2005	120	M-052303	1099	800	75	1		0.0097
21/06/2005	127	M-052491	1312	800	50	6		0.0732
27/06/2005	133	M-052643	1216	800	50	8		0.1053
07/07/2005	143	M-052817	2077	800	50	20		0.1541
14/07/2005	151	M-052911	1483	800	50	0	<	0.0108
26/07/2005	162	M-053012	1386	800	50	0	<	0.0115
24/08/2005	191	M-053262	1727	800	50	11		0.1019
19/09/2005	217	M-53639	1408	630	15	0	<	0.0298
19/10/2005	247	M-054159	1350	800	50	0	<	0.0119

Gegevens HWL

SSRC (30 MIN. 70oC pasteurisatie)				
Influent		Effluent		
15/02/2005	10400	15/02/2005	kvd/1	0
15/02/2005	1280	15/02/2005	kvd/1	0
16/02/2005	560	15/02/2005	kvd/1	0
17/02/2005	1040	15/02/2005	kvd/1	0
22/02/2005	730	16/02/2005	kvd/1	0
28/02/2005	3000	17/02/2005	kvd/1	0
07/03/2005	20	22/02/2005	kvd/1	0
15/03/2005	6700	01/03/2005	kvd/1	0
22/03/2005	32000	08/03/2005	kvd/10 l	0
30/03/2005	950	15/03/2005	kvd/10 l	0
04/04/2005	5300	22/03/2005	kvd/10 l	0
11/04/2005	2000	29/03/2005	kvd/10 l	0
19/04/2005	1310	05/04/2005	kvd/10 l	0
25/04/2005	1710	12/04/2005	kvd/10 l	0
03/05/2005	3200	19/04/2005	kvd/10 l	1
09/05/2005	6000	26/04/2005	kvd/10 l	2
19/05/2005	2450	10/05/2005	kvd/10 l	0
23/05/2005	1530	17/05/2005	kvd/10 l	0
		31/05/2005	kvd/10 l	0
		07/06/2005	kvd/10 l	0
		14/06/2005	kvd/10 l	0
		21/06/2005	kvd/10 l	0
		28/06/2005	kvd/10 l	0
		05/07/2005	kvd/10 l	1
		12/07/2005	kvd/10 l	0
		19/07/2005	kvd/10 l	8
		26/07/2005	kvd/10 l	0
		02/08/2005	kvd/10 l	0
		09/08/2005	kvd/10 l	0
		29/08/2005	kvd/10 l	0
		20/09/2005	kvd/10 l	0

Bijlage 9 Analyseresultaten van de centrische diatomeeën

Concentratie in n/l

Datum	dag	Influent	Influent met dosering	Datum	Dag	Effluent
15/02/2005	1	171		22/02/2005	8	1
16/02/2005	2		289	01/03/2005	15	50
17/02/2005	3		156	08/03/2005	22	11
22/02/2005	8		144	15/03/2005	29	1
28/02/2005	14		340	22/03/2005	36	5
07/03/2005	21		235	29/03/2005	43	9
15/03/2005	29		225	05/04/2005	50	7.4
22/03/2005	36		491	20/04/2005	65	6.8
30/03/2005	44		355	27/04/2005	72	11.9
05/04/2005	48	28		10/05/2005	85	3
04/04/2005	49		263	17/05/2005	92	3
11/04/2005	56		155	24/05/2005	99	15
18/04/2005	63		348	25/05/2005	100	5
25/04/2005	70	85	135	26/05/2005	101	8
03/05/2005	78	77	185	27/05/2005	102	12
10/05/2005	85	163	212	30/05/2005	105	11
17/05/2005	92	75	374	31/05/2005	106	6
19/05/2005	94	262		07/06/2005	113	12
23/05/2005	98		2494	14/06/2005	120	7
23/05/2005	98		1614	21/06/2005	127	9
24/05/2005	99		1467	28/06/2005	134	3
24/05/2005	99		1614	05/07/2005	141	4
31/05/2005	106	93		12/07/2005	148	4
07/06/2005	113	131		19/07/2005	155	3
14/06/2005	120	63		26/07/2005	163	4
21/06/2005	127	90		02/08/2005	170	2
28/06/2005	134	< 1		09/08/2005	177	1
12/07/2005	148	18		29/08/2005	197	1
19/07/2005	155	299		20/09/2005	219	2
26/07/2005	163	40				
02/08/2005	170	16				
09/08/2005	177	< 1				
16/08/2005	184	4089				
23/08/2005	191	18				
30/08/2005	198	< 1				
06/09/2005	206	841				
20/09/2005	220	< 1				

Overzicht aantal diatomeeën in water voor dosering:

TL100 (infl. zonder ent)	5/4	25/4	3/5	10/5	17/5	24/5	31/5	7/6	14/6	21/6	28/6
< 4 µm	23	51	15	33	19	112	131	0	360	126	180
4-7 µm	28	85	77	163	75	262	93	131	63	90	0
7-13 µm	5	85	201	33	411	56	112	0	31	36	90
> 13 µm	2	135	124	163	94	0	75	0		18	18
Totaal	58	356	417	392	599	430	411	131	454	270	288
<7	51	136	92	196	94	374	224	131	423	216	180

TL100 (infl. zonder ent)		12/7	19/7	26/7	2/8	9/8	16/8	23/8	30/8		
< 4 µm		56	112	53	66	37	3972	18	72		
4-7 µm		18	299	40	16	0	4089	18	0		
7-13 µm		0	467	13	0	0	1051	0	36		
> 13 µm		0	93	0	16	0	117	0	0		
Totaal	0	74	971	106	98	37	9229	36	108	0	0
<7	0	74	411	93	82	37	8061	36	72	0	0

Bijlage 10 Microbiologische gegevens profielen

Beddipete (CM)	<i>Cryptosporidium</i> (n/ml zand)						<i>C. perfringens</i> (CFU/ml zand)					
	Steek	S	Augustus	Steek	S	Oktober	Steek	S	Augustus	Steek	S	Oktober
Opp	1		90.7	1		34.7	1		4016.9	1		53354.62
Opp	1		43.5	1		60.0	1		134602.6			
Opp	1		284.3	2		0.0	2					
Opp	2		29.4	2		70.2	2		37831.3	2		44532.57
Opp	2		61.9						32965.6			
Opp	2		52.6									
0-1	1		157.3	1		47.6	1		4959.9	1		14076
0-1	1		101.7	1		10.3	1		5675.2			
0-1	1		42.6	2		9.2	2					
0-1	2		22.1	2		23.4	2		1054.4	2		17292.34
0-1	2		18.7						677.3			
1-5	1		38.9	1		2.4	1		2089.0	1		823.4159
1-5	2		32.6	2		2.6	2		1038.6	2		1088.913
5-10	1		21.1						858.7			
5-10	2		4.0						43.8			
10-15	1		2.8						1.8			
10-15	2		5.1						55.9			
20-25	1		2.2						17.7			
20-25	2	<	2.1						12.0			
25-30	1		3.0						1.9			
25-30	2	<	2.6						1.7			
43-46	1	<	2.4						3.1			
43-46	2	<	2.3						80.2			
60-65	1			1	<	2.8					<	15.6
60-65	2			2		2.0					<	11.5
120-125	1			1		1.8					<	14
120-125	2			2	<	2.7					<	15.8

Gegevens diatomeeën in zandmonsters

steekmonsters I 12/9		3159	3160	3161	3162	3163	3164
aantal per buisje	< 4 µm	0	4.3	5.6	3.2	0	0
	4-7 µm	4	13	11	0	0	2.5
	7-13 µm	0	0	0	1.6	0	0
	> 13 µm	0	0	5.6	0	0	0
	Totaal	4	17.3	22.2	4.8	0	2.5

steekmonsters II 12/9		3165	3166	3167	3168	3169	3170
aantal per buisje	< 4 µm	5	0	0	0	0	0
	4-7 µm	25	13.2	4	1	0	2
	7-13 µm	5	0	0	0	0	0
	> 13 µm	0	0	0	0	0	0
	Totaal	35	13.2	4	1	0	2



= in de bovenste twee monsters worden de volgende organismen gevonden:

- draadvormige algen (o.a. Planktonlingbia limnetica - blauwwier)
- draadvormige schimmels/bacteriën
- schaalpjes van trachlemonas/chrysococcus/kephyrion
- wat pennale diatomeeën



= in diepere lagen blijven over:

- draadvormige algen (o.a. Planktonlingbia limnetica - blauwwier)
- draadvormige schimmels/bacteriën



= in dit monster nog naast de draden ook een zeer groene Navicula

		Opp 0-1		1-5	60-65	120-125
steekmonsters oktober 2005		4272	4273	4274	4275	4276
aantal per buisje van 50 ml	< 4 µm	0	192	912	0	0
	4-7 µm	5400	1448	2738	0	0
	7-13 µm	0	966	0	0	0
	> 13 µm	0	0	0	0	0
	Totaal	5400	2606	3650	0	0

opp	0-1	1-5	60-65	120-125				
4277	4278	4279	4280	4281	4490	4491	4492	4493
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1300	0	0	0	0	130	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1300	0	0	0	0	130	0	0	0



de aantallen hier zijn hoog doordat er slechts een klein deel van het materiaal bekeken kon worden, dit door de grote hoeveelheden detritus, daardoor een hoge vermenigvuldigingsfactor (meer detritus dan in de monsters van september)

**Resultaten steekmonsters LZF-1
zooplankton
31/10/2005**

**Aantallen organismen per gram
zand.**

1 gram direkt	Diepte in cm.		
	0-5	50	100
<i>Euglypha spec.</i>	1		
schaalamoeben tot.	1		
<i>Colurella spec.</i>	1		
raderdieren tot.	1		
draadwormen	7		
borstelwormen	5		
naupliuslarven			1
harpacticoida	4		
mijt-larven	1		
Totaal	19	0	1

**Aantallen organismen per gram
zand.**

30 gram afgefiltereerd	Diepte in cm		
	0-5	50	100
<i>Centropyxis spec.</i>	1.35		
<i>Cyphoderia spec.</i>	1.62	0.14	
<i>Euglypha spec.</i>	1.62		
schaalamoeben totaal	4.6	0.14	
wimperdieren		0.43	0.07
<i>Colurella spec.</i>	1.62		0.33
<i>Lecane spec.</i>	0.81		0.33
<i>Lepadella spec.</i>			0.33
<i>Rotatoria spec.</i>	0.27	0.14	
raderdieren totaal	2.7	0.14	0.10
draadwormen	19.1	0.35	0.03
borstelwormen	3.0	0.07	
naupliuslarven	2.2	0.56	0.23
harpacticoida	1.9	1.06	0.33
cyclopoida	0.3		
Totaal	33.8	2.75	0.76

Bijlage 11 Fysisch/(bio)chemische resultaten

Tabel 1 Gegevens fysisch/chemisch onderzoek zand (15 augustus)

		<i>Opp. I</i>	<i>Opp. II</i>	<i>0-1 cm II</i>	<i>1-5 cm I</i>	<i>10-15 cm I</i>	<i>43-46 cm I</i>
Dr. Stof (dw)	%	84.5	84.13	78.14	78.9	80.42	79.45
Gloeirest 450°C	%	99.16	99.55	99.85	99.86	99.93	99.94
Org. Stof	%dw	0.84	0.45	0.15	0.14	0.07	0.06
CaCO ₃ 1000°C	%dw	0.11	0.1	0.08	0.09	0.07	0.06
pH		7.51	7.43		7.35	7.45	7.73
EGV	µS/cm	83.2	106.5		74.7	62.1	61
Ca	mg/kg	240	205		68	40	40
Fe	mg/kg	520	570	100	100	<100	<100
Mn	mg/kg	19	21	3.2	3.5	0.33	0.14
Al	mg/kg	325	92	27	26	20	44
C	%	0.18	0.18		0.06	0.02	0.02
N	%	0.027	0.025		0.008	0.009	0

Tabel 2 ATP gehalte in het zand (ng/ml)

	<i>15 augustus</i>		<i>15 oktober</i>	
	Steek 1	Steek 2	Steek 1	Steek 2
SM	97.1	97.1	9.3	9.3
0-1cm	4.4	4.4	15.2	15.2
1-5cm	11.8	11.8	10.8	10.8
10-15cm	9.7	9.7	1.5	
25-30cm	4.4	4.4	1.2	
43-46cm	0.7	0.7		
60-65 cm			1.5	1.5
120-125 cm			1.2	1.2

Tabel 3 Fysisch/chemische samenstelling van het zand

	<i>SM</i>	<i>0-1 cm</i>	<i>1-5 cm</i>	<i>10-15 cm</i>	<i>43-46 cm</i>
Gloeirest (% dw)	0,65	0,15	0,14	0,07	0,06
C (%dw)	0,18	nb	0,06	0,02	0,02
N (%)	0,026	nb	0,008	0,009	0
CaCO ₃ (%dw)	0,105	0,08	0,09	0,07	0,06
Ca (mg/kg)	222,5	nb	68	40	40
Fe (mg/kg)	545	100	100	<100	<100
Mn (mg/kg)	20	3.2	3,5	0,33	0,14
Al (mg/kg)	208,5	27	26	20	44
pH	7,47	nb	7,3 5	7,45	7,73
EGV (µS/cm)	94,9	nb	74,7	62,1	61