

Onderzoek naar de aanwezigheid van humane 'enteric' virussen en virussen van colibacteriën (colifagen) in oppervlaktewater en naar het gedrag van beide bij de drinkwaterbereiding

Voordracht gepresenteerd op het vijfde KIWA/VWN-colloquium, Methodenontwikkeling II

Inleiding

Routinematig onderzoek van drinkwater op het voorkomen van humane virussen van faecale herkomst is vooralsnog niet zinvol. Door beperkingen van de methodieken is een negatieve uitslag geen garantie voor de afwezigheid van deze virussen in de onderzochte monsters.

Om toch na te kunnen gaan of drinkwater bereid uit met virussen besmet oppervlaktewater 'virusvrij' is, is het gewenst, dat kennis wordt verkregen over het virusverwijderend vermogen van de diverse zuiveringsprocessen.



IR. M. VAN OLPHEN
KIWA NV

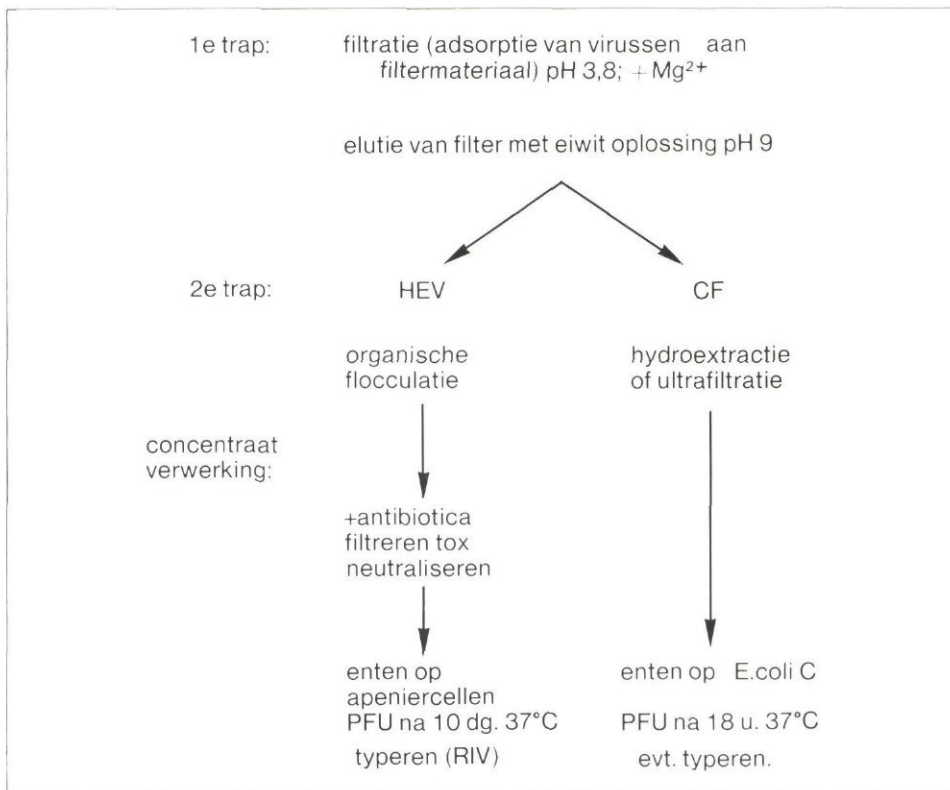


E. VAN DE BAAN
KIWA NV

De gedachtengang hierbij is, dat bij eliminatie van een grote verscheidenheid aan virus-typen, die met de beschikbare technieken uit water kunnen worden geïsoleerd en geïdentificeerd, de kans groot is, dat ook niet te detecteren virussen worden verwijderd.

Het virologisch onderzoek, dat in het kader van het speurwerkprogramma van de VEWIN wordt uitgevoerd, richt zich de laatste jaren dan ook op de invloed van diverse waterbehandelingen op het virusgehalte onder praktijkomstandigheden. Sinds het najaar van 1981 wordt naast het onderzoek naar het voorkomen van humane 'enteric' virussen in water tevens het gehalte aan virussen van de bacteriesoort *Escherichia coli* (colifagen) bepaald. *E. coli* zelf wordt gebruikt als indicator voor faecale verontreiniging van water, maar kan geen dienst doen als indicator voor humane virussen. Antwoord op de vraag of colifagen wel als zodanig kunnen worden gebruikt, is gewenst, omdat onderzoek naar de aanwezigheid van colifagen in water in vergelijking met dat van humane virussen eenvoudig, snel en goedkoop is.

Om vast te stellen welke betekenis moet worden toegekend aan de isolatie van colifagen in relatie tot het voorkomen van humane 'enteric' virussen wordt onder praktijkomstandigheden nagegaan welke overeenkomsten en verschillen in het gedrag van de verschillende virussen optreden bij de zuiveringsprocessen, die worden toegepast



Afb. 1 - Concentratiemethoden van humane 'enteric' virussen (HEV) en colifagen (CF) in water.

bij de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater. De resultaten van dergelijk onderzoek moeten uitwijzen of voor het bepalen van de virus-reductiecapaciteit van de diverse waterbehandelingen kan worden volstaan met het bepalen van colifagen, of dat daarvoor informatie over het gehalte van zowel humane 'enteric' virussen als colifagen nodig is. Dit alles met het doel het vaststellen of drinkwater, dat een bepaalde zuivering heeft ondergaan virologisch betrouwbaar is.

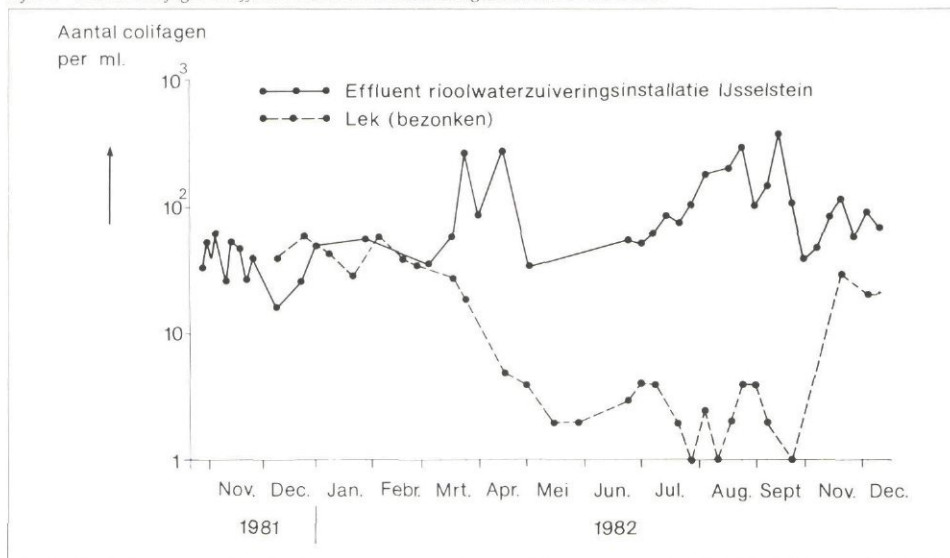
Bij virologische controle van drinkwater zelf

moet onderzoek naar het voorkomen van humane 'enteric' virussen altijd deel uitmaken van een dergelijke controle, daar een negatieve colifagen-test in verband met verschillen in resistentie tussen de verschillende virustypen geen garantie is voor de afwezigheid van humane virussen.

Methodiek

Omdat virussen in kleine aantallen in water voorkomen, moeten concentratiemethoden worden toegepast. In afb. 1 zijn de verschillende fasen van de methoden, die bij het

Afb. 2 - Aantal colifagen in effluent van rioolwaterzuiveringsinstallatie en Lekwater.

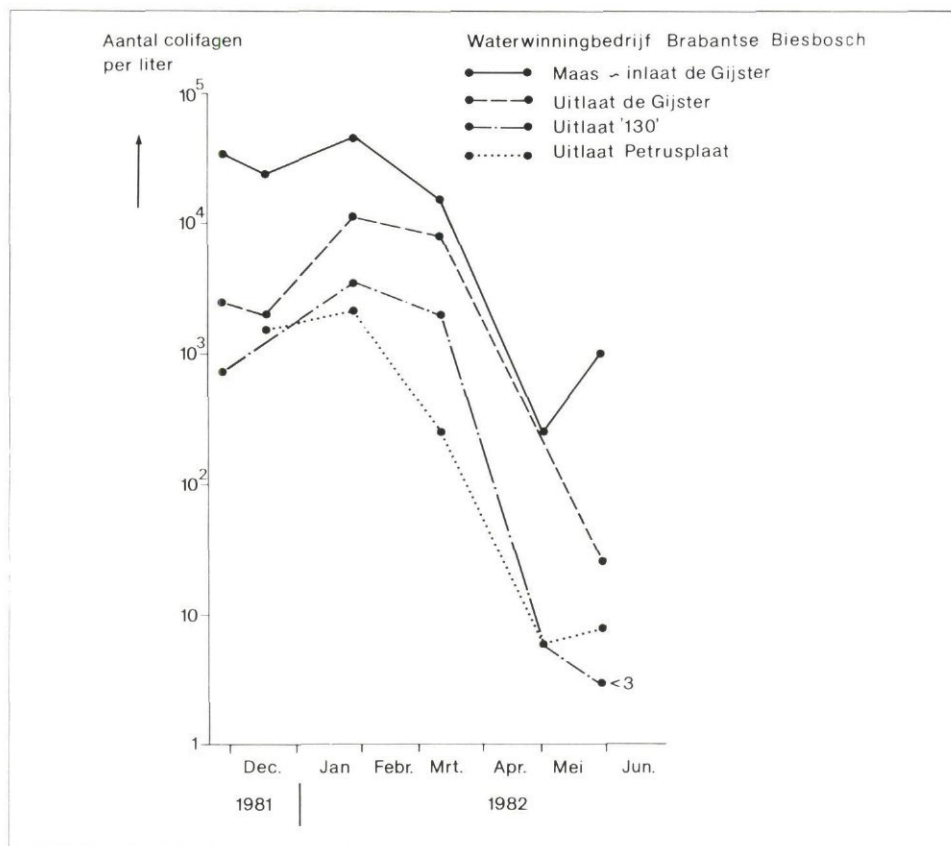


KIWA in gebruik zijn, schematisch weer-gegeven.

De grootte van het monstervolume is afhankelijk van de verwachte besmettingsgraad van het water. Het volume bepaalt, of het monster in één of twee stappen moet worden geconcentreerd tot een eind-volume van ten hoogste 30 ml.

De eerste trap bestaat uit filtreren van het water, waarvan de pH is teruggebracht tot 3,8 en waaraan magnesiumchloride is toegevoegd. Onder dergelijke omstandigheden is adsorptie van virussen aan filtermateriaal mogelijk. Met behulp van een eiwit-oplossing (bijvoorbeeld vleesextract) wordt het filter geëlueerd, waardoor de geadsorbeerde virussen weer van het filter loskomen. Het te verwerken volume en de waterkwaliteit, in het bijzonder de troebelingsgraad, bepalen de keuze van het filtertype.

Als tweede concentratietrap wordt organische flocculatie toegepast voor de bepaling van humane 'enteric' virussen en hydro-extractie of ultrafiltratie voor de fagenbepaling. Monsters van enkele liters worden via de eentraps-techniek op het laboratorium behandeld. Grotere volumina worden daarentegen in het veld geconcentreerd. In dergelijke gevallen wordt de laatste fase van de 2e trap alsook de verdere concentraat-verwerking op het laboratorium uitgevoerd. De relatief lage belasting met humane virussen maakt, dat voor deze virusbepaling het volume bijna altijd in twee trappen moet worden teruggebracht. Hierbij wordt een concentratie-factor van 4.000 - 40.000 bereikt. De besmettingsgraad van water met colifagen is zodanig, dat uitsluitend voor de bemonstering van filtraten van langzame zandfilters, water na duinpassage, gedesinfecteerd water en drinkwater honderden liters moeten worden verwerkt. Van



Afb. 3 - Aantal colifagen in Maaswater voor en na verblijf in spaarbekkens.

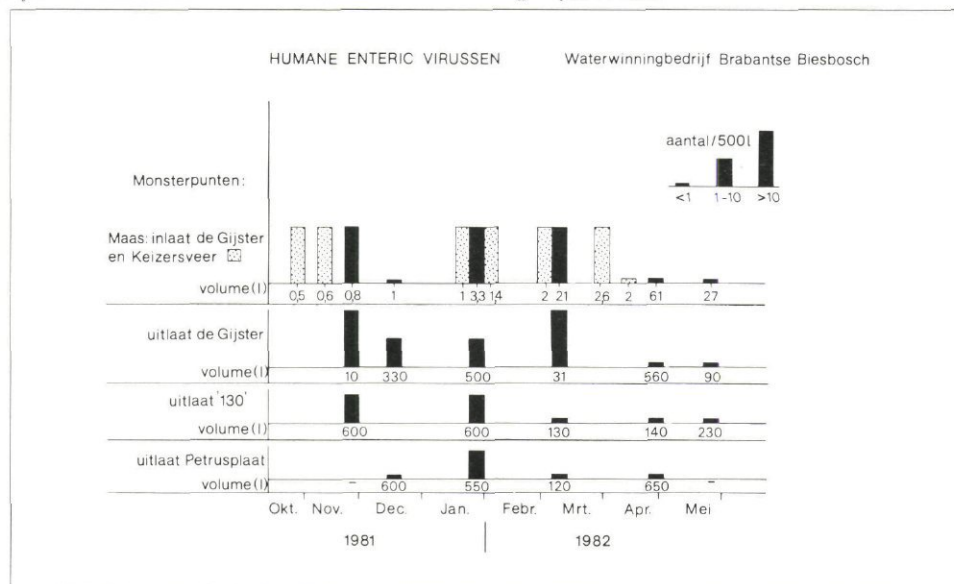
opervlaktewater (in de zomer) en water in de begin-stadia van de zuivering kunnen enkele liters worden onderzocht op het voorkomen van colifagen. In de winter wordt oppervlaktewater direct geënt, omdat in die periode 30 tot 50 fagen per millimeter worden geteld.

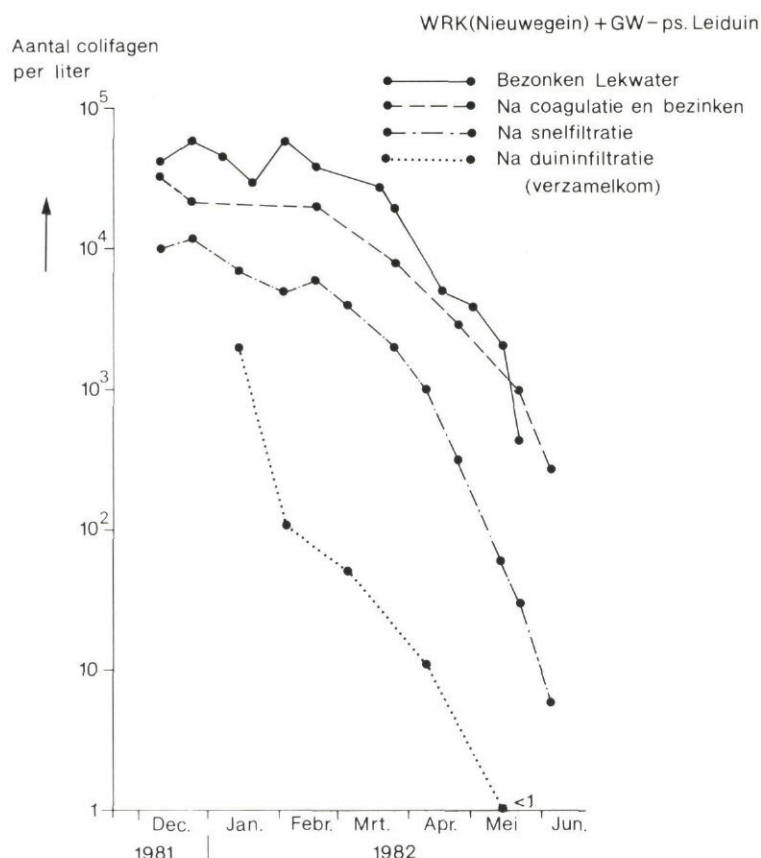
De bovengenoemde technieken zijn in de praktijk goed bruikbaar gebleken, maar één probleem is duidelijk naar voren gekomen bij

het onderzoek van het afgelopen jaar naar de virusverwijdering bij de zuivering.

Omdat filtratietechnieken worden toegepast, heeft de waterkwaliteit grote invloed op het uiteindelijk rendement van de methode. Wanneer grote volumina troebel water worden verwerkt, zal filterverstopping optreden, voordat het gewenste volume is gefiltreerd. Het effect van de elutie zal daardoor verslechteren. Een lager rendement is daarvan het gevolg. Omdat de rendementen van de methodieken voor de verschillende monsters daardoor niet gelijk zijn, is het berekenen van de virusreductiepercentages van de diverse zuiveringsprocessen onnauwkeurig. Daarom wordt in dit stadium van het onderzoek volstaan met het aangeven van het gehalte aan humane virussen in klassen (kleiner dan 1; 1-10 en groter dan 10). De colifagen worden wel logaritmisch uitgezet, omdat de fagenbelasting van het water het niet nodig maakt meer dan enkele liters in bewerking te nemen, waarbij het stadium van filterverstopping niet wordt bereikt. Naar aanleiding van bovengenoemde beperking van de techniek zijn de laatste maanden andere filtertypen met succes uitgetest. In de nabije toekomst zal dan ook het kwantificeren van humane virussen met een grotere betrouwbaarheid kunnen worden uitgevoerd. Het geselecteerde filtertype is een geplooid kaarsfilter met een poriegrootte van 3 μ . Niet alleen is de

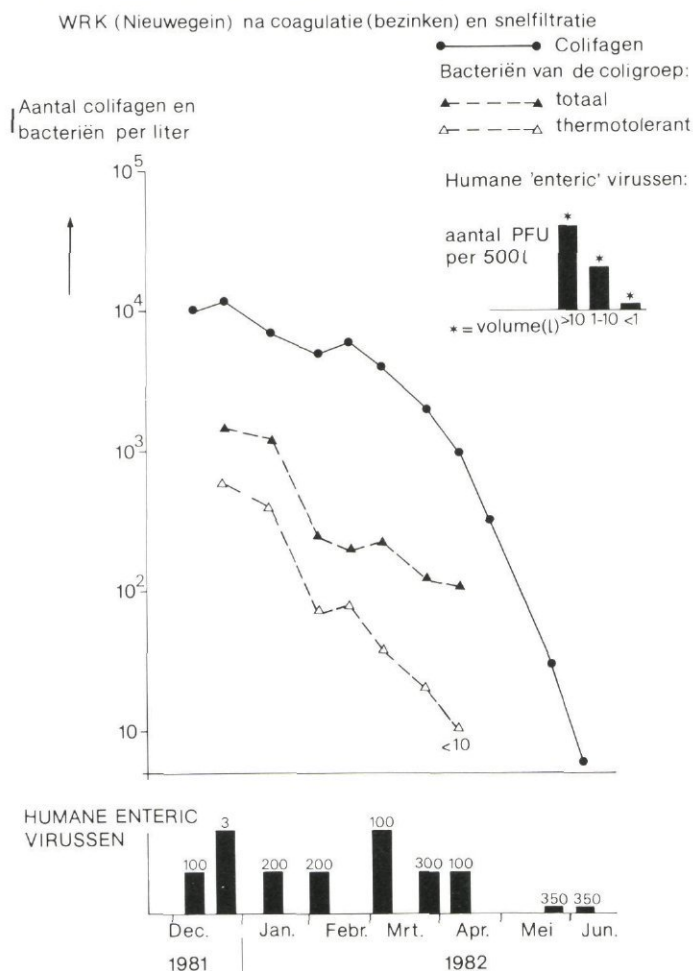
Afb. 4 - Humane enteric virussen in Maaswater voor en na verblijf in spaarbekkens.





Afb. 5 - Gehalten aan colifagen in Lekwater, voorgezuiverd Lekwater en in water na duinpassage (open verzamelkom).

Afb. 6 - Virussen (humane 'enteric' virussen en colifagen) en colibacteriën in Lekwater na coagulatatie, vlokverwijdering en snelfiltratie.



filtercapaciteit voldoende groot voor het verwerken van de gewenste hoeveelheid water, maar tevens is een verdubbeling van het rendement verkregen ten opzichte van dat met de nu in gebruik zijnde filterkaars (poriegrootte van 8μ). Een derde positief punt is, dat bij de verdere concentratieverwerking voor het verwijderen van voor apeniercellen toxische stoffen in de concentraten na filtratie door een 3μ filter een eenvoudiger behandeling toereikend is dan wanneer een 8μ filter voor de virusadsorptie van de eerste trap van de concentratietechniek wordt toegepast. Zoals reeds elders werd beschreven [lit. 1 en 2] is de detectie van virussen in water afhankelijk van het feit, of het betreffende virus in de toegepaste gastheer tot vermeerdering kan komen. Voor de bepaling van humane 'enteric' virussen wordt een apeniercellijn (BGM) gebruikt en de vermeerdering van colifagen vindt in de bacterie *E. coli* C plaats.

Resultaten

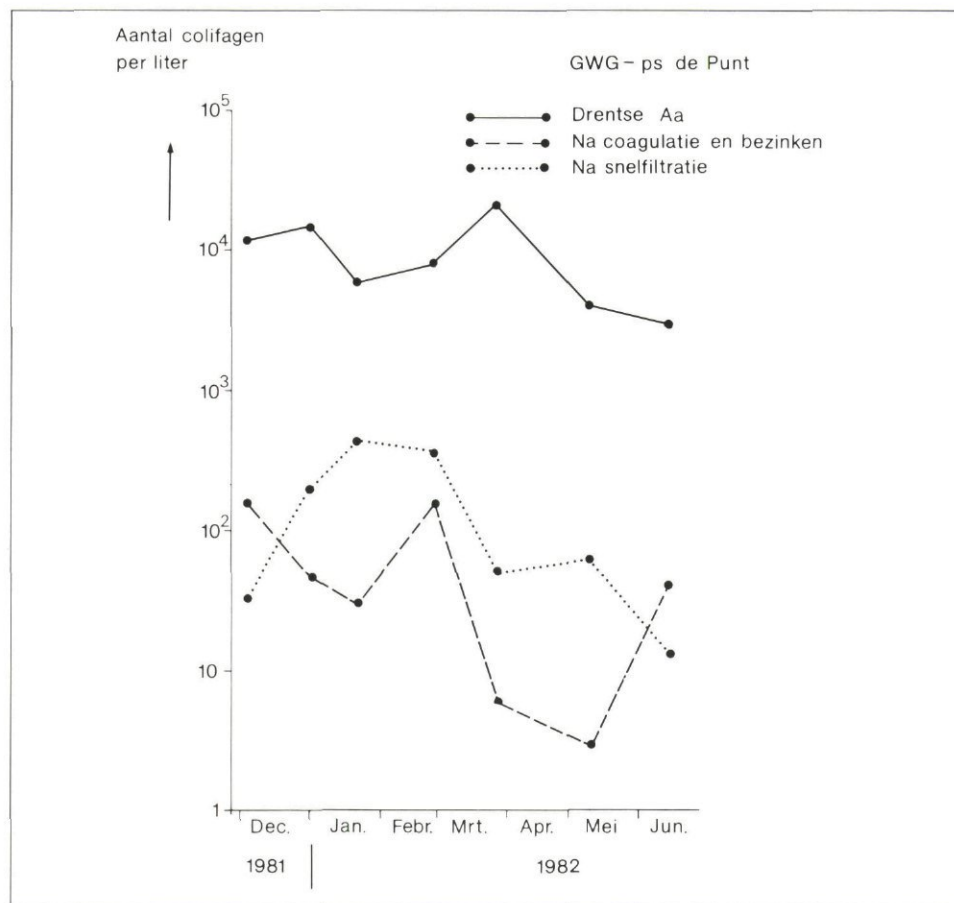
De mogelijkheden van de eerder beschreven methodieken worden geïllustreerd aan de hand van enige resultaten van het praktijkonderzoek van het afgelopen jaar.

Het gehalte aan colifagen in het effluent van een rioolwaterzuiveringsinstallatie is in afb. 2 weergegeven naast het aantal fagen, dat in Lekwater werd aangetroffen. In tegenstelling tot een min of meer continue belasting van rioolwater met colifagen is het aantal humane 'enteric' virussen in faeces afhankelijk van de besmettingsgraad van de bevolking en de tijd van het jaar. Uit de grafiek is af te lezen, dat het seizoen van invloed is op de overlevingstijd van virussen in water. Deze wordt in de zomermaanden negatief beïnvloed.

Open voorraadvorming in spaarbekkens zoals door het Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch wordt toegepast, resulteert in een reductie van het aantal virussen, aanwezig in het inlaat-water (Maas) (afb. 3 en 4).

Naarmate de verblijftijd van het water in de bekkens langer is, neemt het virusgehalte af. Ook hier werd geconstateerd, dat in de zomer het laagste niveau van virussen wordt bereikt. Het moment, waarop de aantallen virussen kleiner worden, valt samen met de stijging van de watertemperatuur. In het gemeten traject (2 tot 18°C) heeft deze factor vermoedelijk geen direct effect op de overlevingstijd van virussen in water, maar indirect via de invloed van de temperatuur op allerlei processen in het milieu.

De beperking van de concentratietechniek als gevolg van filterverstopping voordat het gewenste volume is verwerkt, is af te lezen uit afb. 4. Hierin is niet alleen de belasting van het water met humane virussen opgenomen maar ook het aantal liters, dat kon worden



Afb. 7 - Gehalten aan colifagen in water van de Drentse Aa voor en na coagulatatie (+ vlokverwijdering) en na snelfiltratie.

gefiltreerd. Gezien de frequentie van het voorkomen van filterverstopping en de daarmee samenhangende rendementsverslechtering, mogen uit deze resultaten geen reductiepercentages per spaarbekken (of verblijftijd) worden afgeleid. Bij ondergrondse voorraadvorming door duinfiltratie van voorgezuiverd Lekwater (Gemeentewaterleidingen Amsterdam, pompstation Leiduin) is het gehalte aan humane virussen en colifagen door de bodempassage teruggebracht tot onaantoonbare niveau's. De open kanalen en verzamelkom maken herbesmetting met colifagen, vermoedelijk afkomstig van vogels, weer mogelijk (afb. 5).

Voorzuivering van het Lekwater door de Watertransportmaatschappij Rijn-Kennemerland (WRK-Nieuwegein) door middel van coagulatatie, vlokverwijdering en snelfiltratie resulteert in een beperkte virusreductie (afb. 5).

In de afb. 5 en 6 volgen de virusniveau's hetzelfde seizoenspatroon als in de afb. 3 en 4.

De belasting met colifagen van het voor duinfiltratie bestemde water bleek steeds groter te zijn dan die met colibacteriën. In water dat geen thermotolerante bacteriën van de coligroep in 100 ml bevatte, werden behalve 10³ colifagen per liter ook humane

'enteric' virussen (2 PFU/100 l) aangetoond (afb. 6).

Een voorbeeld van een waterleidingbedrijf, dat zonder vorm van voorraadvorming oppervlaktewater als grondstof voor de bereiding van drinkwater gebruikt, is het pompstation 'De Punt' van het Gemeentelijk Waterbedrijf Groningen (GWG).

De virusbelasting van de Drentse Aa is kleiner dan die van de Lek en de Maas. In afb. 7 is het aantal colifagen in water van de verschillende stadia van de zuivering grafisch weergegeven. Een sterke reductie van colifagen en humane virussen werd door coaguleren bewerkstelligd. Humane virussen waren in water na coagulatatie en vlokverwijdering niet meer aantoonbaar in volumina van 65 tot 800 liter. Door het frequent optreden van filterverstopping bij het onderzoek van dit watertype is een betrouwbare uitspraak over het verwijderingspercentage niet mogelijk. Het feit, dat het gehalte aan colifagen na snelfiltratie hoger was dan ervoor, dient nader te worden onderzocht. Detectie van humane virussen was na snelfiltratie niet mogelijk bij onderzoek van volumina van 320 tot 1.000 liter.

Opmerkelijk is, dat de virusverwijdering door coaguleren bij GWG groter is dan bij WRK. Vermoedelijk is de relatief hoge pH (groter

dan 8), waarbij de coagulatatie bij laatstgenoemd bedrijf plaatsvindt, hier debet aan. Bij deze pH zal de virusadsorptie aan de coagulatievlok minder goed verlopen dan bij een pH, die kleiner is dan 7 zoals bij GWG het geval is.

Toekomstig virologisch onderzoek

Het virologisch onderzoek, dat in het kader van het VEWIN-speurwerkprogramma door het KIWA wordt uitgevoerd, zal in de komende jaren gericht zijn op de volgende onderwerpen:

1. Bepalen van het virusverwijderend vermogen van verschillende zuiveringsprocessen in de praktijk.
2. Onderzoek van drinkwater in gevallen, waarin er twijfel bestaat over de hygiënische betrouwbaarheid ervan.
3. Verbeteren van de methodieken naar aanleiding van ervaring in de praktijk en aan de hand van literatuurgegevens.

Dankbetuiging

De auteurs zijn dank verschuldigd aan de betrokken waterleidingbedrijven voor de medewerking aan het onderzoek, aan ir. A. H. Havelaar voor het beschikbaar stellen van gegevens en materiaal ten behoeve van de fagentelling en de colicultuur en aan C. Koning voor haar bijdrage aan de werkzaamheden op het virologisch laboratorium van het KIWA.

Literatuur

1. Olphen, M. van. *Virussen in water*. H₂O 15 (1982), p. 622-625.
2. Olphen, M. van en Baan, E. van de. *Virologisch onderzoek van drinkwater en oppervlaktewater in Nederland in de periode 1978-1980*. H₂O 15 (1982), p. 626-631.

• • •