A network diagram consisting of various sized light blue circles (nodes) connected by thin white lines, set against a solid blue background. The nodes are scattered across the page, with some larger nodes and some smaller ones, creating a complex web of connections.

KWR 2024.039 | Maart 2024

**Natuurlijke virussen  
voor bewaking  
integriteit  
membraanfiltratie  
systemen**

## Samenwerkingspartners



# Colofon

## Natuurlijke virussen voor bewaking integriteit membraanfiltratie systemen

**KWR 2024.039 | Maart 2024**

### Opdrachtnummer

403019

### Projectmanager

Erwin Beerendonk

### Opdrachtgever

TKI Watertechnologie

### Auteur(s)

Danny Harmsen, Aleida Hommes, Leo Heijnen, Emile Cornelissen

### Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

### Verzonden naar

John Boogaard (PWN), Leonie Marang (Evides), Han Vervaeren, Ben Cools, Peter Cauwenberg (De Watergroep), Morez Jafari (Oasen), Stefan Koel, Leo Vredenburg (Pentair)

Deze activiteit is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het Ministerie van Economische Zaken en Klimaat en de resultaten zijn openbaar.

Werkwijzen, rekenmodellen, technieken, ontwerpen van proefinstallaties, prototypen en door KWR gedane voorstellen en ideeën alsmede instrumenten, waaronder software, die in het onderzoeksresultaat zijn opgenomen, zijn en blijven het eigendom van KWR. Ook alle rechten die voortvloeien uit intellectuele- en industriële eigendom, alsmede de auteursrechten, blijven bij KWR berusten en derhalve eigendom van KWR.

### Keywords

Membraanfiltratie, natuurlijke virussen, drinkwaterzuivering

[Jaar van publicatie](#)  
2024

### Meer informatie

Emile Cornelissen  
T 030-6069538  
E [emile.cornelissen@kwrwater.nl](mailto:emile.cornelissen@kwrwater.nl)

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)



Februari 2024 ©

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - 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.

# Samenvatting

Membranen worden steeds vaker en op grotere schaal toegepast bij drinkwaterbereiding en voor de productie van hoge kwaliteit proceswater. Een belangrijke doelstelling van (hoge druk) membraanfiltratie is het verwijderen van schadelijke virussen. Veroudering en beschadigingen aan onderdelen van de membraansystemen veroorzaken echter kleine lekkages waardoor virussen toch in het behandelde water (permeaat) terecht kunnen komen. Het is daarom van belang de integriteit van membraansystemen nauwkeurig te monitoren (indien mogelijk continu) zodat kan worden vastgesteld of het membraansysteem nog aan de gestelde eisen voldoet.

Verschillende methoden worden gebruikt om de integriteit van membraansystemen of -onderdelen te monitoren, zoals geleidbaarheidsmetingen. Door de analyses in het voedingswater uit te voeren en in het behandelde water (permeaat) wordt de verwijdering (Log Removal Value (LRV)) bepaald. De huidige toegepaste integriteitsmethoden kunnen maximaal 3 LRV bepalen, wat betekent dat 1.000 keer lagere concentraties in het permeaat worden gemeten ten opzichte van het voedingswater. Dit is echter te laag om de verwijderingscapaciteit van membranen voor virussen accuraat te controleren in praktijkinstallaties. Om een hogere LRV te bepalen is dosering van hoge concentraties tracers of (virus)surrogaten op praktijkschaal een optie. Dit is echter niet altijd wenselijk vanwege hogere kosten, mogelijke vervuiling van de membranen en mogelijk negatieve effecten op de drinkwaterkwaliteit.

In eerder onderzoek heeft KWR een procedure ontwikkeld om natuurlijke virussen, die van nature in hoge concentraties in water aanwezig zijn, te gebruiken als integriteitsmethode voor membraansystemen (Hornstra, Silva et al. 2019). Met deze methode kan in principe een LRV van 7 worden bepaald (wat betekent 10.000.000 keer lagere concentraties in het permeaat ten opzichte het te behandelen water) of zelfs meer. In het huidige project is onderzocht of de nieuwe NV-methode kan worden geïmplementeerd als verbeterde methode om de integriteit van membraansystemen te bewaken, met name van UF en van RO membranen. Hieronder volgt een beknopte samenvatting van de voornaamste conclusies, bevindingen en aanbevelingen.

## NV-merkers

Uit het onderzoek blijkt dat twee NV-merkers voor oppervlaktewater meest geschikt zijn voor toepassing in de praktijk (NV2310 en NV2247). Beide NV-merkers komen in hoge concentraties voor in oppervlaktewater (gemiddeld rond  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  kopieën/L), al kunnen de concentraties in het voedingswater in tijd en ruimte variëren en moet dit altijd op voorhand worden bepaald. De analyses voor deze NV-merkers (tot 1L) zijn gevoelig en robuust gebleken. Nader onderzoek is nodig om te bepalen hoe robuust de analyse is in grootvolume monsters (tot 100L) die nodig kunnen zijn om de detectielimiet nog verder te verlagen. Nadere karakterisering van de NV-merkers is uitgevoerd ten aanzien van de grootte (50-80 nm) en de lading in oppervlaktewater (overwegend positief geladen bij pH 4-7). Onderzocht is of een variant van elektronenmicroscopie kan worden toegepast om de natuurlijke virussen te visualiseren. Dit vergt echter nog nadere optimalisatie om de NV-merkers te kunnen onderscheiden van andere aanwezige virussen (labelling van de virussen met DNA-probes).

Nieuwe NV-merkers zijn ontwikkeld voor de alternatieve waterbronnen zeewater, rioolwater en grondwater (2x). De nieuwe NV-merkers moeten nader worden geoptimaliseerd, gekarakteriseerd en getest om te bepalen of, en voor welke toepassingen, ze in de praktijk geschikt zijn (zoals bijvoorbeeld voor ontziltingsinstallaties).

Een eerste verkenning is uitgevoerd naar de mogelijkheden om de NV-methode voor monitoring van membraanintegriteit hoogfrequent op locatie uit te voeren in plaats van in een laboratorium. Een aantal technieken is commercieel beschikbaar die de analyses op locatie (handmatig of geautomatiseerd) uit kunnen voeren. Doorontwikkeling is echter nodig om de benodigde lage detectielimieten en gebruiksgemak te realiseren.

### NV-methode voor Ultrafiltratie (UF)

De NV-merkers voor oppervlaktewater zijn gebruikt voor testen met ultrafiltratie op lab-, pilot- en praktijkschaal. Hieruit is gebleken dat de NV-methode een uitstekende methode is om de integriteit van UF-membranen te bepalen en te bewaken.

Op hoofdlijnen is te concluderen dat intacte UF-modules een LRV van 5,0 - 5,8 hebben op basis van de NV-methode. De maximale aantoonbare LRV is seizoens- en NV-merker afhankelijk. De werkelijke LRV van UF is op praktijkschaal lager (1,8 tot 4,3) dan in lab/proefinstallaties, met uitzondering van de installaties met nieuwe membranen (LRV tot 5,8 bepaald).

De methode is met name geschikt om vezelbreuk in UF-modules te monitoren. Vezelbreuk in een UF-module of UF-installatie resulteert in een significante daling van de LRV. Een daling van 1 LRV (tot LRV 4,0) is gemeten voor één vezelbreuk in een praktijkschaal UF-module (met 18.360 vezels). Er bestaat verband tussen de vezelbreukfractie en de daling van de LRV waarmee het aantal gebroken vezels kan worden bepaald op basis van de LRV-daling. Op basis van dit aantal beschadigde vezels kan worden besloten of de module(s) gerepareerd of vervangen moeten worden. De NV-methode is echter minder geschikt om membraanveroudering te monitoren (bv. door tijd, chemicaliën of slijtage).

Twee bestaande methoden om de integriteit van membranen te monitoren is vergeleken met de NV-methode, directe cel telling (DCT) en troebelheidsmeting. In beide gevallen zijn hogere LRV-waarden gevonden met de NV-methode.

### NV-methode voor omgekeerde osmose (RO)

De NV-merkers voor oppervlaktewater zijn gebruikt voor testen met omgekeerde osmose op lab-, pilot- en praktijkschaal. Hieruit is gebleken dat de NV-methode een uitstekende methode is om de integriteit van RO-modules te bepalen en te bewaken, echter niet voor RO-membranen.

Op hoofdlijnen is te concluderen dat intacte RO-membranen een hoge LRV (ca. 5,0) hebben voor verschillende typen RO-membranen op basis van de NV-methode. Deze hoge LRV konden niet worden gemeten op praktijkschaal. Dit komt met name doordat de concentratie NV-merkers in de RO-voeding na UF-voorbehandeling te laag is om in het RO-permeaat terug te kunnen meten. Binnen één pilot zijn zowel NF- en RO-modules onderzocht. Hieruit blijkt dat de LRV van de NF-modules hoger waren dan die van de RO-modules (respectievelijk 3,5 en 3,0). Dit heeft mogelijk te maken met de pakkingen/O-ringen dan met het membraantype zelf.

Aangebrachte mechanische schade aan de RO-module (O-ring en/of permeaatbuis schade) kan leiden tot een daling van 1-5 LRV. Aangebrachte schade aan de toplaag van het RO-membraan (chlooroxidatie of schuring door scherpe SiC-deeltjes) resulteert niet in een vermindering van de LRV. Dergelijke verouderingsverschijnselen konden niet bestudeerd worden op praktijkschaal. Het is te verwachten dat verouderingsverschijnselen aan de toplaag niet te bepalen is met NV-metingen, omdat de UF-support laag nog voldoende virussen verwijdert.

Een vergelijking tussen verschillende RO-membraantypen geeft geen verschil in LRV met de NV-methode. RO-membranen worden gekarakteriseerd met opgeloste stoffen, en niet door methoden gebaseerd op deeltjes zoals de NV-methode. De NV-methode heeft hierdoor weinig meerwaarde voor de karakterisering van RO-membranen.

Een aantal alternatieve integriteitsmethoden op lab-, pilot- en praktijkschaal vergeleken met de nieuwe NV-methode, zoals directe cel tellingen, geleidbaarheid-, sulfaat- en fluorescentiemetingen. In alle gevallen werden hogere LRV-waarden gevonden met de NV-methode. De NV-methode is een uitstekende methode om de integriteit van RO-modules te bepalen en te bewaken, echter niet voor RO-membranen.

### Overige bevindingen en aanbevelingen voor vervolgonderzoek

Er is een seizoenafhankelijke LRV gevonden voor UF-modules op praktijkschaal. Bij twee locaties zijn hogere LRV gevonden in de winterperiode (december) dan in de zomerperiode (juni/juli). Deze variatie is mogelijk gelinkt aan de viruskarakteristieken die afhankelijk zijn van de periode, of van membraaneigenschappen die variëren in de periode, mogelijk gerelateerd aan eigenschappen (temperatuur, pH,...) van het voedingswater. Een sluitende verklaring hiervoor hebben we echter niet kunnen geven. Dit is een interessant en zinvol onderwerp voor verdere studie. Immers vezelbreuk kan alleen nauwkeurig in kaart worden gebracht als de basis LRV-waarde min of meer constant blijft.

Dit project is sterk gefocust op (de integriteit van) membraaninstallaties, vooral ultrafiltratie en omgekeerde osmose. Interessant is om te beoordelen of de NV-merker methode ook bruikbaar is voor monitoring van andere zuiveringsprocessen die worden gebruikt in de verwijdering van virussen, te denken valt aan actiefkoolfiltratie, zandfiltratie, coagulatie-flocculatie-sedimentatie processen. Mogelijk ook inactivatie processen (zoals UV, peroxide, ozon...), al is de verwachting dat de qPCR methode hiervoor minder geschikt is. Onderbelichte membraanprocessen zijn microfiltratie en nanofiltratie, vooral dat laatste proces is de laatste jaren sterk in opkomst en heeft nog weinig aandacht gekregen in het huidige project.

Het is waardevol om langdurig en hoogfrequent één of meerdere praktijkinstallatie te monitoren om te onderzoeken of de NV-methode daadwerkelijk kan worden gebruikt voor integriteitsmonitoring. Hoe vaak een proces/zuivering moet worden doormeten om de integriteit te kunnen waarborgen is gebaseerd op een risicobeoordeling die afhangt van de kans op falen, het test interval en de monitoringsfrequentie. Deze zaken zullen moeten worden bestudeerd om een degelijke risicobeoordeling te kunnen opstellen. Hiervoor is het bovendien ook waardevol om een NV-methode op basis van qPCR door te ontwikkelen dat op locatie kan worden gebruikt voor (hoog)frequente/bijna continue monitoring van de integriteit van zuiveringsprocessen (in plaats van labanalyses).

# Inhoudsopgave

<b>Samenwerkingspartners</b>	<b>1</b>
<b>Colofon</b>	<b>2</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
<b>Inhoudsopgave</b>	<b>6</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>9</b>
1.1 Achtergrondinformatie	9
1.2 Doel	10
1.3 Aanpak	10
1.4 Leeswijzer	11
<b>2 Optimaliseren qPCR detectiemethode en ontwikkeling nieuwe natuurlijke virus merkers</b>	<b>13</b>
2.1 Optimaliseren reeds ontwikkelde analyses voor NV-merkers in oppervlaktewater	13
2.1.1 Ontwikkelen van probe gebaseerde qPCR analyse	13
2.1.2 IJklijnen voor kwantificatie met qPCR	13
2.1.3 Kort protocol voor detectie natuurlijke virussen	14
2.1.4 Bepalen limiet van detectie (LOD) en kwantificatie (LOQ) onder praktijkcondities	16
2.1.5 Effect van concentratie en DNA-isolatiemethode op LOD en LOQ	18
2.1.6 Samenvatting en conclusies	20
2.2 Ontwikkelen nieuwe NV-merkers voor andere drinkwaterbronnen	21
2.2.1 Voorbehandeling watermonsters	22
2.2.2 Data-analyse metagenoom resultaten	22
2.2.3 Ontwikkeling qPCR analyses voor nieuwe NV merkers	23
2.2.4 Samenvatting en conclusies	27
2.3 Karakteriseren NV-merkers in oppervlaktewater	28
2.3.1 Analyse van genetische code	28
2.3.2 Laboratoriumtesten	28
2.3.3 Samenvatting en conclusies	34
<b>3 Verkenning mogelijkheden om NV-methode op locatie uit te voeren</b>	<b>36</b>
3.1 Beschikbare lab-onafhankelijke qPCR-methoden	36
3.2 Verkennende testen met twee online qPCR methoden	36
3.2.1 Genecount® van Luminultra	36
3.2.2 Udetect® van Orvion	38
3.3 Samenvatting en conclusies	41

<b>4</b>	<b>Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van UF-membranen op lab-, pilot- en praktijschaal</b>	<b>42</b>
4.1	Algemene informatie NV-methode	42
4.2	Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van UF-membranen op lab- en pilotschaal	42
4.2.1	Invloed vezelbreuk op integriteit UF-membraan op labschaal	43
4.2.2	Invloed beschadigde vezels 9" UF-modules	46
4.3	Bepalen membraanintegriteit van UF-praktijkinstallaties met behulp van de NV methode	49
4.3.1	WPC De Gavers (De Watergroep): bepalen membraanintegriteit UF-installatie met behulp van de NV-methode	49
4.3.2	Bepalen membraanintegriteit UF-installatie PS Ouddorp (Evides) met behulp van de NV methode	54
4.3.3	Bepalen membraanintegriteit UF-installatie WPB Heemskerk (PWN) met behulp van de NV-methode	62
<b>5</b>	<b>Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van NF/RO-membranen op lab-, pilot- en praktijschaal</b>	<b>68</b>
5.1	Onderzoek toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van NF/RO-membranen op lab- en pilotschaal	68
5.1.1	Introductie	68
5.1.2	Invloed testcel op resultaten bepalen integriteit RO-membranen	68
5.1.3	Invloed membraanbeschadiging op integriteit 2,5" spiraalgewonden RO-membranen bepaald met behulp van de NV-methode	71
5.1.4	Invloed membraanbeschadiging op integriteit 4" spiraalgewonden RO-membranen bepaald met behulp van de NV-methode	76
5.1.5	Baanhoek pilot Evides	79
5.2	Bepalen membraanintegriteit van RO-praktijkinstallaties met behulp van de NV methode	79
5.2.1	Bepalen membraanintegriteit (LRV) RO-installatie WPB Heemskerk (PWN)	80
5.2.2	Bepalen membraanintegriteit (LRV) RO installatie ZS Schuwacht (Oasen)	83
<b>6</b>	<b>Vertaling onderzoeksresultaten naar de praktijk</b>	<b>86</b>
6.1	NV-merkers voor toepassing in de praktijk	86
6.2	Ultrafiltratie	87
6.2.1	LRV van lab naar praktijschaal (UF)	87
6.2.2	Vertaling naar indicatie van vezelbreuk in de praktijk	88
6.3	RO/Omgekeerde osmose	90
<b>7</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>93</b>
7.1	Conclusies	93
7.1.1	NV-merkers	93



7.1.2	Verkenning van de mogelijkheden om de NV-methode op locatie uit te voeren	95
7.1.3	Ultrafiltratie	95
7.1.4	RO/omgekeerde osmose	95
7.2	Aanbevelingen	96
7.3	Project output	97
	<b>Literatuur</b>	<b>98</b>
<b>Bijlage 1.</b>	<b>Bepalen limiet van detectie (LOD) en kwantificatie (LOQ) onder praktijkcondities</b>	<b>99</b>
<b>Bijlage 2.</b>	<b>Grafieken met resultaten invloed vezelbreuk op integriteit UF-membraan op lab- en pilotschaal</b>	<b>101</b>
<b>Bijlage 3.</b>	<b>Memo Invloed membraanbeschadiging en reiniging op integriteit 4'' spiraalgewonden RO-membranen (onderzoek Oasen)</b>	<b>102</b>
<b>Bijlage 4.</b>	<b>Grafieken met NV resultaten monstercampagne UF-praktijkinstallaties</b>	<b>117</b>
<b>Bijlage 5.</b>	<b>Memo Evides: Natuurlijke virussen voor integriteitsbewaking NF/RO</b>	<b>119</b>

# 1 Inleiding

## 1.1 Achtergrondinformatie

Membranen worden steeds vaker en op grotere schaal toegepast bij drinkwaterbereiding en voor de productie van hoge kwaliteit proceswater. Een belangrijke doelstelling van (hoge druk) membraanfiltratie is het verwijderen van schadelijke micro-organismen, zoals bacteriën en virussen (Tang, Yang et al. 2018). RO-membranen zijn in theorie een volledige barrière voor virussen, omdat deze op basis van grootte het membraan niet kunnen passeren. Echter variatie in doorlaatbaarheid, veroudering en de aanwezigheid van membraanbeschadigingen (zoals vezelbreuk, beschadigde lijmranden, beschadigd membraanoppervlak), aangetaste afdichtingen en O-ringen kunnen kleine lekkages veroorzaken waardoor virussen toch in het permeaat terechtkomen (Ostarcevic, Jacangelo et al. 2018). Dit heeft als gevolg dat de integriteit van de membranen voor virusverwijdering afneemt, deze virusverwijdering wordt vaak uitgedrukt als Log Removal Value (LRV). Het is van belang om de membraanintegriteit vaak of indien mogelijk continu te monitoren, waardoor te allen tijde kan worden vastgesteld of het membraansysteem nog aan de gestelde eisen voldoet. De huidige toegepaste integriteitsmethoden (zoals geleidbaarheidsmetingen) kunnen een maximale LRV van 3 bepalen, wat betekent 1.000 keer lager in het permeaat na een zuiveringsstap dan in het ruwe water/voedingswater. De verwijderingscapaciteit van membranen voor virussen kan hierdoor niet accuraat worden geverifieerd in praktijkinstallaties (Kumar, Adham and DeCarolis 2007). Dosering van hoge concentraties tracers of (virus)surrogaten is op praktijkschaal mogelijk, maar is ongewenst vanwege kosten, mogelijke vervuiling van het membraan en omdat deze mogelijk de drinkwaterkwaliteit negatief kunnen beïnvloeden.

Virussen komen overal ter wereld voor waar hun gastheer ook te vinden is en zijn de meest voorkomende levensvorm op aarde (Krishnamurthy and Wang 2017). Gastheren kunnen bijvoorbeeld humane cellen zijn, plantencellen of bacteriën, in dit laatste geval worden ze bacteriofagen genoemd. Bekend is dat virussen in zeer hoge concentraties voorkomen in het milieu, bijvoorbeeld in oppervlaktewater waar concentraties van  $1 \times 10^8$  tot  $1 \times 10^{10}$  virussen per liter (10 tot 100 keer meer dan bacteriën) zijn gemeten (Krishnamurthy and Wang 2017) (Santiago-Rodriguez and Hollister 2022). Wanneer virussen van nature in het milieu voorkomen noemen we ze in dit rapport 'natuurlijke virussen', afgekort als NV. Aangenomen wordt dat een belangrijk deel van deze natuurlijke virussen in water bacteriofagen zijn.

In eerder onderzoek heeft KWR een procedure ontwikkeld om natuurlijke virussen die in hoge concentraties in water zitten te identificeren op basis van hun DNA. Vervolgens kunnen deze natuurlijke virussen gebruikt worden als indicatoren (NV-merkers) voor virusverwijdering door waterzuiveringsprocessen (Hornstra, Silva et al. 2019) door ze met qPCR te kwantificeren in het voedingswater en in het behandelde water. Met deze methode kan de virusverwijdering worden bepaald met een LRV van 7 (wat betekent 10.000.000 keer lager in het behandelde water dan in het voedingswater) of zelfs meer. Dit kan in relatief kleine monstervolumes en zonder surrogaten of tracers aan het voedingswater toe te voegen.

De vraag is of de nieuwe NV-methode kan worden geïmplementeerd bij praktijkinstallaties als verbeterde methode om membraaninstallaties te bewaken. De methode heeft de potentie om snel en gevoelig de integriteit van een membraansysteem (pilot en praktijkschaal) vast te stellen. In 2019 is daarom gestart met het TKI-project 'Natuurlijke virussen voor verificatie desinfectiecapaciteit membraanfiltratie processen'. Deelnemende partijen zijn Oasen, Evides, PWN, De Watergroep, Pentair en KWR. In dit project is de NV-methode verder geoptimaliseerd en doorontwikkeld en in praktijktesten toegepast om integriteit te bepalen van intacte en beschadigde UF- en RO-membranen op laboratorium-, pilot- en praktijkschaal.

Het is van belang te benadrukken dat de NV-methode geen directe uitspraak doet over de drinkwaterkwaliteit, zelfs niet als er een vermoeden is van integriteitsverlies, aangezien de geteste zuiveringsstappen slechts een onderdeel zijn van de gehele zuiveringsketen. De NV-methode kan echter wel ondersteunend zijn bij operationele beslissingen, bijvoorbeeld over het al dan niet vervangen van membraanmodules.

## 1.2 Doel

Het TKI project heeft de volgende doelstellingen:

1. Verdere onderzoek naar en ontwikkeling van de NV-methode ook voor andere waterbronnen dan oppervlaktewater, zoals (oever)grond-, afval-, en eventueel zeewater en het ontwikkelen van een onderzoeksmethode voor de identificatie van nieuwe virusmarkers uit deze bronnen.
2. Onderzoek naar de mogelijkheid voor de ontwikkeling van een bio"sensor" voor natuurlijke virussen om directe online metingen in watersystemen uit te voeren.
3. Ontwikkeling van een systematische aanpak om de gevolgen van intacte en beschadigde UF- en RO-membranen op virusverwijdering te evalueren op laboratorium-, pilot- en praktijkschaal.

## 1.3 Aanpak

Het project bestaat uit vier deelonderzoeken die hieronder kort worden toegelicht.

*Deelonderzoek 1: Optimalisatie van de huidige qPCR detectiemethode, en het ontwikkelen van nieuwe virusmarkers uit andere bronnen dan oppervlaktewater.*

Om natuurlijke virussen in ruw en gezuiverd water routinematig te kunnen kwantificeren (en daarmee de LRV te kunnen bepalen), wordt gebruik gemaakt van de qPCR techniek. QPCR is een veelgebruikte techniek waarmee micro-organismen, op basis van het genetisch materiaal (DNA of RNA), worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Het doel van deze activiteit is om de huidige qPCR detectiemethode voor drie NV-merkers uit oppervlaktewater te verbeteren en te standaardiseren.

Daarnaast is fundamenteel onderzoek uitgevoerd om ook in andere waterbronnen nieuwe natuurlijke virusmarkers te identificeren, er zijn nieuwe NV-merkers geïdentificeerd in de volgende waterbronnen: grondwater (twee verschillende bronnen), zeewater en rioolwater. Voor elk van deze nieuwe NV-merkers zijn qPCR analyses ontwikkeld en getest.

Alleen de (gedeeltelijke) genetische DNA-codes zijn bekend van de natuurlijk virussen die als NV-merkers worden gebruikt. Het is echter van belang om ook informatie te hebben over de fysische eigenschappen van de natuurlijke virussen die worden geanalyseerd, zoals grootte, lading en vorm. Indien bijvoorbeeld de grootte van het virus bekend is, dan kan het specifiek worden ingezet voor integriteitmetingen van membranen met een specifieke poriëgrootte. Binnen deze activiteit is op twee manieren getracht deze informatie te verkrijgen voor natuurlijke virussen uit oppervlaktewater:

- Op basis van de genetische code.
- Op basis van laboratoriumtesten.

Deze werkzaamheden zijn uitgevoerd voor de NV-merkers voor oppervlaktewater (nog niet voor de binnen dit project nieuw ontwikkelde NV-merkers).

*Deelonderzoek 2: Verkenning van de mogelijkheden om de NV-methode op locatie uit te voeren*

De integriteit van een waterbehandelingsstap wordt bepaald door NV-merkers voor en na de behandeling te kwantificeren. Door dit te monitoren is het mogelijk de integriteit van de zuiveringsstappen te monitoren en tijdig in te grijpen indien de verwijderingscapaciteit verminderd is. Hiervoor is het nodig regelmatig de analyses uit te voeren en tijdig de resultaten te verkrijgen zodat hier ook naar kan worden gehandeld. Op dit moment worden de analyses echter uitgevoerd in gespecialiseerde laboratoria waardoor de doorlooptijd en kosten voor de analyses hoger liggen. Binnen deze activiteit is een verkenning gemaakt van technieken waarmee (in potentie) qPCR

analyses op locatie door niet-specialisten kunnen worden uitgevoerd. Een aantal verkennende testen is uitgevoerd met twee beschikbare technieken voor mobiele/on-site qPCR analyses.

*Deelonderzoek 3: Bepalen membraanintegriteit (LRV) met behulp van de NV-methode voor toepassing bij UF op lab-, pilot- en praktijkschaal*

In dit deelonderzoek is op laboratorium- en pilotschaal de invloed van vezelbreuk onderzocht op de UF-membraanintegriteit op basis van de NV-methode. Daarnaast is ook op praktijkschaal gemeten om de invloed van membraanveroudering, reiniging en type membraan op de (membraan)integriteit van UF-installaties te bestuderen. Tijdens de monsternamen bij de praktijkinstallaties zijn verschillende integriteitsmethoden met elkaar vergeleken om toepassing van de NV-methode als integriteitsbewaking te verifiëren. Als laatste is er geprobeerd om een verband te leggen en een vertaling te maken van de gevonden resultaten tijdens de laboratorium- en pilotschaaltesten met betrekking tot vezelbreuk naar de praktijk.

*Deelonderzoek 4: Bepalen membraanintegriteit (LRV) met behulp van NV-methode voor toepassing bij NF/RO op lab-, pilot- en praktijkschaal*

In dit deelonderzoek is op laboratorium- en pilotschaal de invloed van (i) membraanmoduleschade en (ii) membraanreiniging onderzocht op de RO-membraanintegriteit op basis van de NV-methode. Ook is de toepassing van de NV-methode als integriteitsmethode voor NF/RO onderzocht op pilotschaal. Daarnaast is er ook op praktijkschaal gemeten om de invloed van membraanveroudering, reiniging, type membraan op de membraanintegriteit te bestuderen van RO-installaties. Tijdens de monsternamen bij de praktijkinstallaties zijn verschillende integriteitsmethoden met elkaar vergeleken om toepassing van de NV-methode als integriteitsbewaking te verifiëren. Als laatste is er geprobeerd om een verband te leggen en een vertaling te maken van de gevonden resultaten tijdens de laboratorium- en pilotschaaltesten met betrekking tot (i) membraanmoduleschade en (ii) membraanschade naar de praktijk.

## 1.4 Leeswijzer

Hoofdstuk 2 Optimaliseren qPCR detectiemethode en ontwikkeling nieuwe natuurlijke virus merkers

- Optimaliseren reeds ontwikkelde analyses voor NV-merkers in oppervlaktewater
- Ontwikkelen nieuwe NV-merkers voor andere drinkwaterbronnen
- Karakteriseren NV-merkers in oppervlaktewater

Hoofdstuk 3 Verkenning mogelijkheden om NV-methode op locatie uit te voeren

- Beschikbare lab-onafhankelijke qPCR-methoden
- Verkennende testen met twee online qPCR methoden

Hoofdstuk 4 Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van UF-membranen op lab-, pilot- en praktijkschaal

- Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van UF-membranen op lab- en pilotschaal
- Bepalen membraanintegriteit van UF-praktijkinstallaties met behulp van de NV methode

Hoofdstuk 5 Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van NF/RO-membranen op lab-, pilot- en praktijkschaal

- Onderzoek toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van NF/RO-membranen op lab- en pilotschaal
- Bepalen membraanintegriteit van RO-praktijkinstallaties met behulp van de NV methode

Hoofdstuk 6 Vertaling onderzoeksresultaten naar de praktijk

- NV-merkers voor toepassing in de praktijk
- Ultrafiltratie
- RO/Omgekeerde osmose

## Hoofdstuk 7 Conclusies en aanbevelingen

## 2 Optimaliseren qPCR detectiemethode en ontwikkeling nieuwe natuurlijke virus markers

Werkpakket 1 bestaat uit drie onderdelen die hieronder apart worden behandeld:

1. Optimaliseren van de reeds ontwikkelde analyses voor NV-markers in oppervlaktewater
2. Ontwikkelen van nieuwe NV-markers voor andere drinkwaterbronnen
3. Karakteriseren NV-markers in oppervlaktewater

### 2.1 Optimaliseren reeds ontwikkelde analyses voor NV-markers in oppervlaktewater

Om natuurlijke virussen in ruw en gezuiverd water routinematig te kunnen kwantificeren (en daarmee de verwijdering te kunnen bepalen), wordt gebruik gemaakt van de qPCR techniek. QPCR is een veelgebruikte techniek waarmee micro-organismen, op basis van het genetisch materiaal (DNA of RNA), worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Het doel van deze activiteit is om de huidige qPCR detectiemethode voor vier NV-markers in oppervlaktewater te verbeteren en te standaardiseren.

Vier NV-markers voor oppervlaktewater (NV2247, NV2310, NV2314 en NV2303) waren reeds voor aanvang van dit project geïdentificeerd en qPCR analyses hiervoor ontwikkeld (Hornstra, Silva et al. 2019). Om de qPCR analysemethode ook routinematig op andere locaties (buiten KWR) in te kunnen zetten is het van belang dat de analyses robuust en gestandaardiseerd zijn. Om dit te bereiken zijn een aantal optimalisatiestappen uitgevoerd:

- Ontwikkelen van probe gebaseerde qPCR assays
- Ontwikkelen van ijklijnen voor nauwkeurige kwantificatie
- Opstellen van een (kort) protocol voor kwantificatie natuurlijke virussen met qPCR
- Bepalen van de Limit of Detection (LOD) en Limit of Quantification (LOQ) voor de ontwikkelde qPCR methoden

Een aantal andere NV-markers (bv. NV2303 en NV2306) zijn incidenteel in de eerste praktijkmeetronde geanalyseerd (behandeld in Hoofdstukken 4 en 5). Deze NV-markers bleken in een vroeg stadium van het onderzoek minder geschikt te zijn daarom veelal niet verder meegenomen in het onderzoek.

#### 2.1.1 Ontwikkelen van probe gebaseerde qPCR analyse

Bij de opstart van het project waren qPCR analyses reeds ontwikkeld voor vier NV-markers uit oppervlaktewater (NV2310, NV2247, NV2314 en NV2303). Bij deze qPCR analyses werd gebruik gemaakt van primers (synthetische DNA-moleculen) waarmee DNA-fragmenten van deze vier virussen selectief worden vermenigvuldigd en een kleurstof (SYBR-green) die bindt aan het gevormde DNA en daarmee de vorming van fluorescentielicht induceert. De meting van fluorescentielicht wordt vervolgens toegepast voor het aantonen en kwantificeren van het, tijdens de qPCR, gevormde DNA-fragment. Binnen dit project zijn voor de NV-markers de analyses doorontwikkeld naar op probe gebaseerde qPCR analyses (in plaats van op SYBR Green gebaseerd). Bij de probe gebaseerde qPCR analyse vormt de specifieke binding van de synthetische DNA-probe voor de vorming van fluorescentielicht. Het gebruik van een probe geeft een hogere specificiteit en maakt de kwantificatie in het algemeen meer robuust en accuraat. Deze aangepaste analyses worden nu als standaard gebruikt voor kwantificatie van de NV markers uit oppervlaktewater.

#### 2.1.2 Ijklijnen voor kwantificatie met qPCR

Om de NV-markers nauwkeurig met qPCR te kwantificeren en om de detectiegrens van elke qPCR analyse te bepalen zijn ijklijnen gemaakt. Voor de ijklijnen is gebruik gemaakt van suspensies met opgezuiverd synthetisch

DNA. De suspensies met synthetisch DNA bevatten van elk van de natuurlijke virussen het stukje DNA dat met de qPCR analyse wordt gemeten. Ook bevatten ze een stukje DNA dat als interne controle (IC) wordt gebruikt. Voor het kwantificeren van natuurlijke virussen worden twee verschillende suspensies met synthetische DNA-fragmenten gebruikt (Tabel 2-1).

Tabel 2-1. Synthetische DNA-suspensies gebruikt als ijklijn voor de volgende natuurlijke virussen en de interne controle

	Bevat DNA van NV-merker
IJKlijn 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NV2314</li> <li>• NV2247</li> <li>• NV2306*</li> <li>• NV2307*</li> <li>• NV2303</li> <li>• Interne Controle (IC)</li> </ul>
IJKlijn 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NV2310</li> <li>• NV2038*</li> <li>• Interne Controle (IC)</li> </ul>

\* In het voorgaande onderzoek zijn in eerste instantie ook qPCR analyses ontwikkeld voor andere NV-merkers, deze zijn niet in de verdere ontwikkeling of toepassing van de methode meegenomen omdat de concentraties lager en/of de qPCR analyses minder robuust zijn gebleken.

Om kwantificatie van NV-merkers in onbekende monsters mogelijk te maken is het nodig de concentratie van de synthetische DNA-suspensie nauwkeurig te bepalen en vervolgens verdunningsreeksen met bekende concentraties samen te stellen. Hiervoor is in eerste instantie middels qPCR het IC-fragment gekwantificeerd en is een redelijk betrouwbaar beeld verkregen van de concentraties van de twee suspensies. Binnen dit onderzoek is vervolgens ddPCR gebruikt om absolute kwantificatie van de ijklijnen uit te voeren, deze kwantificatie met ddPCR is zeer nauwkeurig en niet afhankelijk van een externe ijklijn. De concentratie van de suspensie die worden gebruikt om deze ijklijnen te maken worden bepaald door de leveranciers en zijn minder nauwkeurig gebleken. Er zijn drie punten van de ijklijn met ddPCR in duplo gemeten op het IC, de resultaten van de metingen zijn weergegeven in Tabel 2-2. De resultaten laten zien dat er kleine verschillen zijn tussen de concentratiebepalingen met qPCR a.d.h.v. externe ijklijnen en de concentratiebepaling met ddPCR. Voor de kwantificatie van natuurlijke virussen met qPCR is vervolgens de kwantificatie steeds gecorrigeerd voor de met ddPCR gemeten concentraties.

Tabel 2-2. Resultaten van metingen met ddPCR van ijklijnsuspensies.

	IJKLIJN 1	IJKLIJN 2
qPCR concentratie (DNA-kopieen/ $\mu$ l)	Gemiddelde ddPCR meting (DNA-kopieen/ $\mu$ l)	Gemiddelde ddPCR meting (DNA-kopieen/ $\mu$ l)
2,5E+03	1,8E+03	2,2E+03
2,5E+02	2,1E+02	1,4E+02
2,5E+01	1,3E+01	2,8E+01
blanco	0	0

Vanwege de mogelijkheid voor het uitvoeren van absolute kwantificatie en verminderde gevoeligheid voor remming door verontreinigingen heeft het gebruik van ddPCR voordelen ten opzichte van de qPCR methode. Echter, vanwege de arbeidsintensieve uitvoering en duurdere reagentia, zijn de kosten voor uitvoering van analyses met ddPCR flink hoger dan de kosten voor qPCR en daardoor minder geschikt voor routinematige analyses. Bovendien zijn de mogelijkheden om qPCR op locatie (geautomatiseerd) uit te voeren beschikbaar. Daarom is binnen het onderzoek gekozen om qPCR als standaard analysetechniek te hanteren.

### 2.1.3 Kort protocol voor detectie natuurlijke virussen

Methode voor detectie van natuurlijke virussen in drinkwater voor monsters tot 1L.

### *Bemonstering en transport naar lab*

- Schone fles
- Monstername punt schoonmaken en doorspoelen
- Monster nemen (1L)
- Gekoeld binnen 24 uur naar lab
- Bij lab binnen 24 uur opwerken

### *Concentratiestap*

- Een Centricon® (Merck, Millipore) centrifugatie ultrafilter met 100 kDa poriegrootte wordt gebruikt voor het concentreren van virussen uit een volume van (maximaal) 1 liter water tot een concentraat van ca. 300 µl.

### *DNA isolatie*

- 300 µl van het geconcentreerde monster wordt gebruikt voor isolatie van het DNA (Power Biofilm Kit van Qiagen volgens protocol van de leverancier).
- Voor DNA isolatie wordt de Interne Controle (IC) DNA aan het geconcentreerde monster toegevoegd om de relatieve DNA-opbrengst te kunnen bepalen.
- Een blanco monster wordt meegenomen om te controleren op eventuele contaminatie gedurende het opwerkingsproces
- Na zuivering van het DNA vindt elutie plaats in 150 µl elutiebuffer (=DNA extract van het monster).
- Alle verkregen DNA-extracten worden bewaard bij -20°C totdat ze worden gebruikt voor een qPCR analyse (blijven meerdere jaren stabiel). Doordat de DNA-extracten behouden blijven is het altijd nog mogelijk retrospectief additionele analyses hierop uit te voeren.

### *qPCR analyse*

- qPCR reagentia:
  - Master Mix (MM, iQ Supermix, BioRad)
  - primers en probes zijn afkomstig van IDT DNA technologies
- Bij elke PCR-reactie wordt een volume van 10 µl DNA extract onderzocht, op elk monster worden qPCR reacties in duplo uitgevoerd. Het gemiddelde van deze duplo-metingen wordt als meetwaarde gebruikt.
- Controles
  - No Template Control (NTC): qPCR op alleen PCR-reagentia
  - Blanco monster: qPCR op DNA-extract van Ultrafiltratie op gedestilleerd PCR-grade DNA-vrij water
  - Positieve controle: qPCR op DNA-extract uit oppervlaktewater (Lekkanaal)
  - DNA opbrengst: relatieve verschil tussen directe IC-meting (op IC-DNA) en IC-meting van IC-DNA toegevoegd aan monsterconcentraat.
- Voor kwantificatie worden analyses uitgevoerd op verschillende verdunningen van synthetische DNA-suspensies (gBlock), waarin de virusfragmenten die gebruikt worden voor de verschillende qPCR methoden, aanwezig zijn. Voor kwantificatie en het bepalen van de LOD en LOQ is het gebruik van nauwkeurig gekwantificeerde kallibratiesuspensies is een vereiste (zie hierboven)
- Thermocycler programma  
De volgende thermocycler (CFX, Biorad) programma wordt toegepast voor alle in dit onderzoek gebruikte virussen: 3 min. 95°C (activatie Taq polymerase), gevolgd door 40 cycli met wisseling van de temperatuur van 95°C (10 sec.) naar 54°C (45 sec.)

### *Beoordeling controles*

- NTC en Blanco monster: bij signaal in deze monsters wordt aangenomen dat er verontreiniging van de monsters heeft plaats gevonden waardoor de analysesserie als niet betrouwbaar wordt beschouwd.
- De relatieve opbrengst van IC wordt gebruikt om:



- De meetwaarde te corrigeren van deze opbrengst
- Te bepalen of er remming van de qPCR reactie heeft plaats gevonden waarbij de volgende criteria worden gehanteerd:  
Opbrengst >20%: betrouwbare kwantitatieve waarde rapporteren  
Opbrengst <10%: remming, geen betrouwbare kwantitatieve waarde te rapporteren  
Opbrengst tussen 10 en 20%: indicatieve kwantitatieve waarde te rapporteren

Tabel 2-3. Primers en probes gebruikt voor analyse van de NV-merkers in oppervlaktewater.

NV-merker	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Probe (dit onderzoek) (5'→3')	Fragment lengte (bp)
NV2247	AAGCCTGAACGTGTTCCGAT	CTGCCCGCAGGATTGTTAGA	ACGCTCAACGGACTATGATTGACACGAC FAM label/Zen-lowaBlack quencher	104
NV2310	GCATCTTCGTCATGCGTCC	GAGGTCGTGGTGTGGCTATC	CACGTTCTCTGAGTTGCGGTAGAAGA FAM label/Zen-lowaBlack quencher	91
NV2314	ACCAGGGGCGGTGTATATTG	GACGCCGTTGAAATGTCAGG	CGCAATAGTCCATGCTGACCCACCT FAM label/Zen-lowaBlack quencher	102

#### Concentreren grootvolume monsters

In sommige gevallen is gebleken dat de detectiegrens van de qPCR analyses op de NV-merkers moet worden verlaagd. Een manier om dit te doen is het concentreren van grootvolume monsters (20-1000 L) in plaats van de standaard 1L met centricon filters zoals hierboven omschreven.

Hiervoor wordt de LMB-053 voorschrift van KWR gevolgd. Dit houdt in dat een grootvolume watermonster (groter of gelijk aan 20 liter en < 2000 liter) worden geconcentreerd met een crossflow ultra membraan filter (FX 80 Classix). Door middel van een pomp wordt het water door het filter geduwd waardoor er druk ontstaat over het filter. Door deze druk wordt het 'schone water' door het filter geduwd en blijven de deeltjes (waaronder micro-organismen) achter en gaan retour in een vat met het overgebleven monster. Door dit proces te herhalen concentreert het monster tot ongeveer 500 ml. Het concentraat wordt vervolgens verder opgewerkt met een centricon filter zoals hierboven omschreven.

#### Voorbehandeling ammoniumoxalaat

Het kan voorkomen dat monsters ijzer bevatten. Dit heeft een verstrend effect op de analyse en daarmee ook op de detectielimiet. Om het ijzer uit de monsters te verwijderen wordt daarom een voorbehandeling uitgevoerd met ammoniumoxalaat.

#### 2.1.4 Bepalen limiet van detectie (LOD) en kwantificatie (LOQ) onder praktijkcondities

Om het maximale verwijderingsrendement (maximale log-verwijdering) van membranen of andere zuiveringsprocessen te kunnen bepalen is het noodzakelijk om te weten welke minimale virusconcentratie in een watermonster nog betrouwbaar kan worden aangetoond (Limit of Detection: LOD) en gekwantificeerd (Limit of Quantification: LOQ) met deze qPCR methode.

De LOD en LOQ worden bepaald door:

1. Het minimum aantal DNA-kopieën dat kan worden aangetoond in een qPCR reactie.
2. Het volume water dat voor de analyse in behandeling wordt genomen.
3. De opbrengst van de concentratiemethode.
4. De opbrengst van de DNA-isolatie methode.

Voor de experimentele bepaling van de LOD en LOQ van de methoden voor detectie van natuurlijke virussen, is water uit het Lekkanaal gebruikt als bron voor natuurlijke virussen (dit aangezien geen pure suspensies van natuurlijk virussen beschikbaar zijn). De concentraties natuurlijke virussen in dit water zijn bepaald door in 4-voud analyses uit te voeren uit te voeren op DNA geïsoleerd uit klein volume water (zonder concentratiestap met centricon), de resultaten van deze metingen zijn samengevat in Tabel 2-4.

Tabel 2-4. Metingen van NV2247 en NV2310 in water uit het Lekkanaal. Resultaten van 4 metingen, het gemiddelde (Gem.) van deze metingen, de standaarddeviatie (SD) en de variatiecoëfficiënt (VC) zijn weergegeven.

Meting:	1	2	3	4	Gem.	SD	VC (%)
<b>NV2247</b>							
Conc. DNA-kopieën/L	1,3E+08	1,4E+08	1,3E+08	1,4E+08	<b>1,4E+08</b>	6,1E+06	4,5
<b>NV2310</b>							
Conc. DNA-kopieën/L	1,3E+08	1,3E+08	1,4E+08	1,5E+08	<b>1,4E+08</b>	9,4E+06	6,8

Aansluitend is dit water gebruikt voor het maken van verdunningen met bekende concentraties virussen in drinkwater met een volume van 50 ml. Deze kunstmatig besmette monsters zijn gebruikt voor het bepalen van de LOD en LOQ van de NV-merker methoden. Vanwege de grote hoeveelheid analyses die hiervoor nodig zijn was het niet praktisch haalbaar om deze analyses voor alle beschikbare natuurlijke virussen uit te voeren en is er gekozen voor de twee, meest toegepaste, natuurlijke virussen met de hoogste concentraties in oppervlaktewater (NV2247 en NV2310, zie Tabel 2-5).

Tabel 2-5. Theoretische concentratie NV-merkers in de verdunningsreeks om de LOD en LOQ van de NV-merker methode te bepalen. Daarbij is onderscheid gemaakt in de concentratie in iedere drinkwatermonster en in de qPCR reactie zelf.

nr	Concentratie NV in watermonster (DNA kopieën/L)	Concentratie NV in PCR (DNA kopieën/PCR)	Aantal replica's*
1	10.000	1.000	4
2	1.000	100	4
3	500	50	6
4	250	25	6
5	125	12,5	8
6	62,5	6,25	8
7	31,25	3,125	12
8	15,6	1,56	12
9	7,8	0,78	12
10	0	0	10

\* Het aantal replica's en verdunningsstappen zijn arbitrair gekozen en vormt een compromis tussen praktische uitvoerbaarheid en "accuracy/precision" van de LOD en LOQ bepaling.

De verkregen analysesresultaten staan uitgewerkt in Tabel 2-6. De LOD is berekend door gebruik te maken van het Excel programma POD LOD (Wilrich and Wilrich 2009). Hierbij wordt, per verdunning, het aantal positieve reacties gebruikt voor het berekenen van de LOD waarbij elk monster waarin binnen 40 PCR-cycli een signaal wordt gevormd ( $Ct < 40$ ) is geteld als positief monster, de resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 6. De LOD-bepaling laten zien dat de LOD's voor beide virussen zeer vergelijkbaar zijn en dat ze de theoretische LOD van 3 kopieën/reactie (Frootan, Sjöback et al. 2017) benaderen waardoor geconcludeerd kan worden dat de qPCR methoden optimale detectie van het DNA van deze virussen mogelijk maakt.

Tabel 2-6. De LOD van de methoden voor detectie van de natuurlijke virussen

	LOD	LOD <sub>95%</sub> (95% betrouwbaarheid)	
	kopieën/PCR (kopieën/ml drinkwater)		
		Laagste limiet	hoogste limiet
NV2247	4,2 (0,8)	2,8 (0,6)	6,6 (1,3)
NV2310	4,0 (0,8)	2,6 (0,5)	6,2 (1,2)

De LOQ wordt bepaald door de laagste concentratie waarvoor de variatiecoëfficiënt (VC) van de (kwantitatieve) metingen niet boven een maximum uitkomt. Hiervoor wordt veelal een (arbitrair) maximum van 35% gehanteerd (Frootan, Sjöback et al. 2017, Kralik and Ricchi 2017). Met deze LOQ's wordt weergegeven welk minimum aantal

DNA-kopieën met een bepaalde minimum betrouwbaarheid kan worden gekwantificeerd in de qPCR reacties, de LOQ's zijn weergegeven in Tabel 2-7.

Tabel 2-7. Aantal DNA-kopieën dat met een maximale variatie coëfficiënt van 35% kan worden gekwantificeerd in een qPCR reactie (95% betrouwbaarheidsinterval).

Merker	LOQ (kopieën/PCR)	LOQ (kopieën/ml drinkwater)
NV2247	7,2 (VC=30,8%)	1,4
NV2310	7,5 (VC=29,2%)	1,5

De hierboven berekende LOD en LOQ betreffen de concentraties die kunnen worden aangetoond en gekwantificeerd in de qPCR reacties, deze worden ook wel de "Assay LOD" (ALOD) en "Assay LOQ" (ALQO) genoemd. Aangezien deze parameters zijn bepaald door het analyseren van monsters met een volume van 50 ml kunnen hiervoor ook de LOD's en LOQ's worden bepaald per ml drinkwater. De LOD en LOQ voor het aantonen van natuurlijke virussen in watermonsters wordt door de meerdere factoren bepaald:

1. Het volume water dat in behandeling wordt genomen en de invloed die dit volume heeft op:
2. De efficiëntie waarmee de virussen door centricon ultrafiltratie (en eventueel additionele concentratiestappen, zoals hemoflow ultrafiltratie) uit het water worden geconcentreerd. NB. Het concentreren van grotere volumes met vergelijkbare efficiëntie zal resulteren in lagere LOD en LOQ.
3. De efficiëntie waarmee het DNA uit het geconcentreerde monster wordt geïsoleerd.

#### 2.1.5 Effect van concentratie en DNA-isolatiemethode op LOD en LOQ

Het is mogelijk dat het concentreren van de natuurlijke virussen, met centricon filters, uit watermonsters een effect heeft op de kwantificatie van die virussen, zo kunnen bijvoorbeeld virusdeeltjes achterblijven in het filter die derhalve niet meer worden aangetoond in de qPCR analyse. Ook is bekend dat met de DNA-isolatiestap niet 100% van het DNA wordt uit het concentraat wordt geïsoleerd. Om inzicht te krijgen in de invloed van de centricon concentratiemethode op de gemeten concentraties natuurlijk virussen, is een vergelijking gemaakt van de qPCR kwantificatie met en zonder centricon stap.

Deze vergelijking is uitgevoerd door drie verschillende monsters in viervoud te analyseren:

- (a) **Zonder centricon:** 300 µl Lekkanaal water en IC is direct gebruikt in de DNA-extractieprocedure.
- (b) **50 ml met centricon:** 50 ml Lekkanaal water is geconcentreerd tot 300 µl met centricon, aan het concentraat is IC toegevoegd en dit mengsel is gebruikt in de DNA-extractieprocedure.
- (c) **1000 ml met centricon:** 50 ml Lekkanaal water is toegevoegd aan 950 ml drinkwater en is geconcentreerd tot 300 µl met centricon, IC is toegevoegd en dit mengsel is gebruikt in de DNA-extractieprocedure.

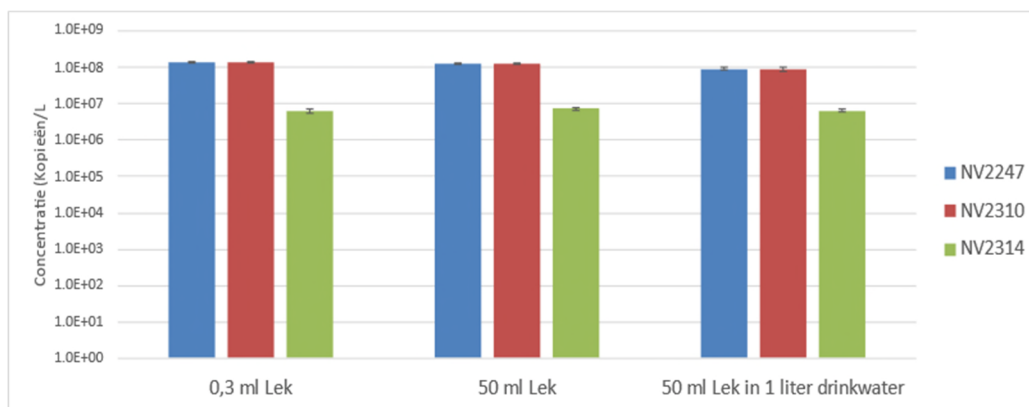
Om inzicht te krijgen in de efficiëntie van de DNA-isolatiestap is in deze monsters ook de opbrengst van isolatie van de (aan het centricon concentraat) toegevoegde interne controle (IC) gemeten, deze opbrengsten zijn weergegeven in Tabel 2-8.

Tabel 2-8. Opbrengst IC bij processing van verschillende volumes drinkwater

Meting	Opbrengst IC (%)				Gem	SD	VC (%)
	1	2	3	4			
(a) Direct 0,3 ml	62,4	61,3	64,9	59,4	62,0	2,3	3,7
(b) 50 ml	65,8	65,5	62,0	66,6	65,0	2,0	3,1
(c) 50 ml in 1L	63,2	67,2	66,2	66,2	65,7	1,7	2,6

Bovenstaande getallen laten zien dat het IC-DNA met een zeer reproduceerbare opbrengst van gemiddeld 64,2% (VC=3,1%) wordt geïsoleerd. Er worden geen verschillen waargenomen tussen opbrengsten verkregen na het opwerken van verschillende volumes opgewerkt water. Dit geeft aan dat IC-DNA gebruikt kan worden voor het monitoren van de opbrengst van de DNA-isolatie stap.

Aansluitend zijn de concentraties natuurlijke virussen (NV2247, NV2310 en NV2314) bepaald in het directe (300 µl) en de monsters na centricon concentratiestap (50 en 1000 ml) en de gemeten concentraties zijn teruggerekend naar de virusconcentraties in het lekwater (DNA-kopieën/L) waarbij de meetwaarden zijn gecorrigeerd voor de opbrengst van de IC. De resultaten van deze metingen zijn weergegeven in Tabel 2-9 en gevisualiseerd in Figuur 2-1.



Figuur 2-1. Concentraties Natuurlijke virussen gemeten direct in 0,3 ml lekwater (0,3 ml Lek), in 50 ml lekwater na concentratie met centricon (50 ml Lek) en in 50 ml lekwater toegevoegd aan 950 ml drinkwater na concentratie met centricon (50 ml Lek in 1 liter drinkwater). De concentraties zijn weergegeven op een log-schaal. De foutbalk geeft de standaard deviatie weer.

Tabel 2-9. Meetwaarden (DNA kopieën/L) van de natuurlijke virussen 2247, 2310 en 2314 in het water van het lekkanaal.

Meting:	Gemiddelde concentratie (DNA-kopieën/L)	Standaarddeviatie (DNA-kopieën/L)	Variatie-coëfficiënt (%)	Opbrengst t.o.v. direct (%)*
<b>NV2247</b>				
300 µl (zonder centricon)	1,4E+08	6,1E+06	4,5	
50 ml (met centricon)	1,2E+08	4,6E+06	3,8	88,3
1000 ml (met centricon)	1,0E+08	8,3E+06	8,0	75,9
<b>NV2310</b>				
300 µl (zonder centricon)	1,4E+08	9,4E+06	6,8	
50 ml (met centricon)	1,2E+08	3,0E+06	2,4	90,2
1000 ml (met centricon)	9,0E+07	1,1E+07	11,8	65,5
<b>NV2314</b>				
300 µl (zonder centricon)	6,2E+06	7,7E+05	12,4	
50 ml (met centricon)	7,4E+06	6,3E+05	8,6	118,6
1000 ml (met centricon)	6,5E+06	5,3E+05	8,2	104,5

\* Met dit percentage wordt weergegeven welk deel van de natuurlijke virussen wordt teruggemeten na gebruik van de centricon concentratie methode.

Deze analyses maken duidelijk dat:

- De variatie tussen meerdere metingen van identieke monsters klein is (VC tussen 2,4% en 12,4%).
- De vergelijking tussen de concentraties gemeten in monsters zonder concentratiestap en de toepassing van een concentratiestap met centricon filters laat zien dat de concentratiestap minimale verliezen van de natuurlijke virussen veroorzaakt. Dit is het geval bij het concentreren van een klein volume (50 ml) maar ook bij het concentreren van een groter volume (1L).
- De metingen van NV2314 zijn bij toepassing van centricon hoger dan zonder toepassing van een concentratiestap met centricon filters. Het is niet duidelijk waardoor dit wordt veroorzaakt.

- Vanwege de beperkte verliezen bij het processen van 50 ml en 1000 ml met centricon zijn de LOD's bij deze volumes aanmerkelijk lager (Tabel 2-10)

Zoals verwacht, geeft dit aan dat lagere LOD's kunnen worden bereikt bij het processen van grotere volumes water. Bij het behandelen van nog grotere volumes is het van belang dat metingen van IC moeten worden gebruikt om inzicht te krijgen in de opbrengst van DNA-isolatie stap en dat experimenten moeten worden uitgevoerd waarmee inzicht wordt verkregen in de opbrengst van de concentratiestap.

Tabel 2-10. LOD's voor NV2247 en NV2310 bij het processen van resp. 50 ml Lekwater of 50 ml lekwater in 1000 ml drinkwater

NV-merker	kopieën/PCR	50 ml		1000 ml	
		Opbrengst Centricon (%)	LOD (kopieën/ml)	Opbrengst Centricon (%)	LOD (kopieën/ml)
NV2247	4,2 (0,8)	88,3	1,0	75,9	0,05
NV2310	4,0 (0,8)	90,2	0,9	65,5	0,06

### 2.1.6 Samenvatting en conclusies

Hieronder staan de voornaamste uitkomsten samengevat over de optimalisatie van de reeds ontwikkelde analyses voor NV-merkers in oppervlaktewater:

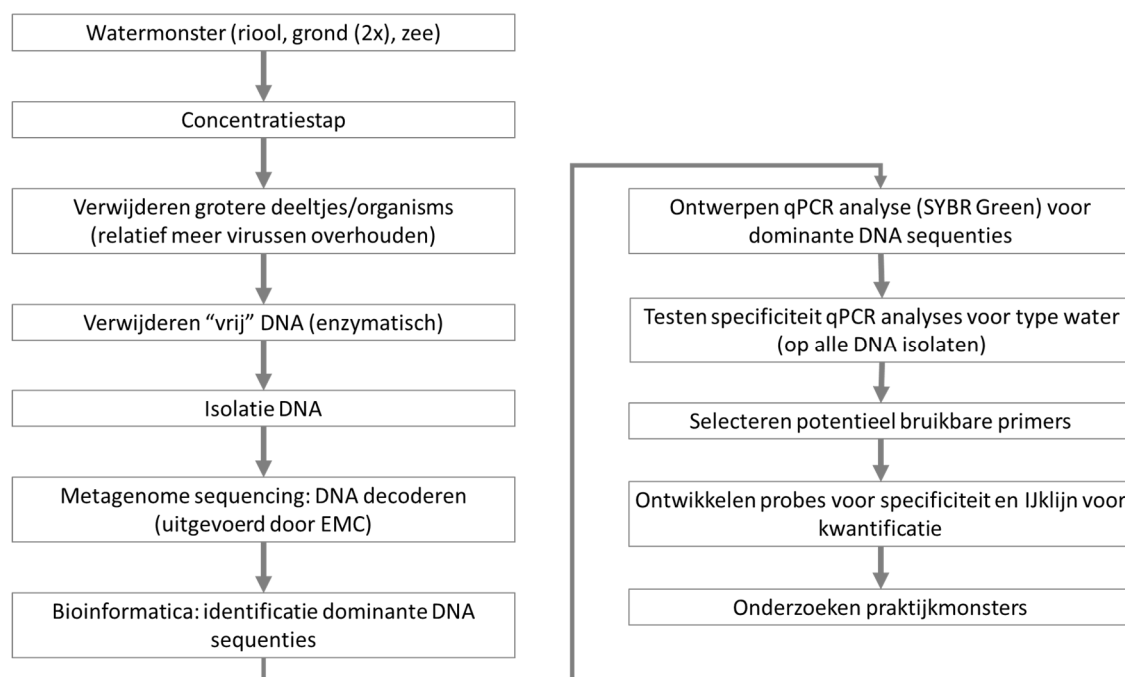
- Probe-based qPCR analyses zijn opgezet voor vier van de NV-merkers voor oppervlaktewater en worden nu als standaard gehanteerd.
- Kwantificatie van de ijklijnen met ddPCR heeft de kwantificatie met de qPCR-methode nauwkeuriger gemaakt, deze kwantificatie wordt nu als standaard gehanteerd.
- De detectielimiet (LOD) en kwantificatielimiet (LOQ) voor de qPCR-analyse en voor de methode op watermonsters is bepaald.
- De variatie tussen replicamonsters is laag gebleken en geeft aan dat de analyses robuust zijn.
- Het effect van de centricon concentratiestap is klein en kan daarmee gebruikt worden voor de methode voor volumes tot maximaal één liter.
- Een standaardprotocol is opgezet en wordt nu gehanteerd voor deze NV-merkers, hierdoor zou bij implementatie op andere locaties consistente resultaten verwacht mogen worden.
- Grotere volumina moeten eerst worden geconcentreerd met hemoflow. Dit is met name van belang voor monsters waarvan kan worden verwacht dat de concentratie NV-merkers zeer laag is (bv na een zuiveringsstap met RO-membranen) om de detectielimiet van de methode verder te verlagen. Het effect van een concentratiestap met hemoflow op de methode is nog niet bepaald. Ook zijn mogelijk andere concentratiemethoden geschikt om volumes groter dan 1L in behandeling te nemen. Nader onderzoek moet uitwijzen wat hiervoor de meest geschikt methode is.
- NV2303 en NV2314 zijn minder geschikt om als merker te gebruiken, met name door de lagere concentraties en minder robuuste qPCR analyses.

## 2.2 Ontwikkelen nieuwe NV-merkers voor andere drinkwaterbronnen

In voorgaand onderzoek zijn NV-merkers voor oppervlaktewater ontwikkeld en binnen dit onderzoek geoptimaliseerd (paragraaf 2.1) en toegepast (hoofdstukken 4 en 5). Binnen deze activiteit is fundamenteel onderzoek uitgevoerd om ook in andere waterbronnen nieuwe natuurlijke virusmerkers te identificeren, er zijn nieuwe NV merkers geïdentificeerd in de volgende waterbronnen:

1. *Influent van rioolwaterzuivering*: rioolwater wordt niet direct gebruikt als bron voor drinkwaterproductie, echter is het waardevol om een NV-merker hiervoor te ontwikkelen. Bijvoorbeeld om beter zicht te krijgen in eventuele vervuiling van drinkwaterbronnen met rioolwater. Als bron voor rioolwater is een monster genomen van het influent van RWZI Utrecht.
2. *Grondwater*: grondwater is een belangrijke bron voor drinkwaterproductie, daarom bestond de wens bij de partners om voor grondwater een NV merker te ontwikkelen. Omdat de samenstelling van, en condities in, grondwater variabel is, is ervoor gekozen om twee bronnen in het onderzoek mee te nemen:
  - a. Ps Ouddorp: Evides infiltreert Haringvlietwater in de duinen bij Ps Ouddorp om daar vervolgens drinkwater van te maken.
  - b. Zs Schuwacht: Oasen maakt gebruik van geïnfiltreerd rivierwater (de Lek) en geïnfiltreerd polderwater.
3. *Zeewater*: in sommige landen wordt zeewater gebruikt als bron van drinkwater (of proceswater) en is voor zuivering grotendeels afhankelijk van membranen. Het ontwikkelen van een universele NV merker voor zeewater zou daarom van toegevoegde waarde zijn om de integriteit van de membranen te kunnen controleren. Als bron voor zeewater is een monster genomen bij Scheveningen.
4. *Rivierwater*: Om te beoordelen of mogelijk een andere NV-merker nog dominanter aanwezig is dan de reeds ontwikkelde NV-merkers, en daarmee mogelijk nog beter geschikt, is opnieuw een watermonster van de Lekkanaal meegenomen. Uit de analyse is gebleken dat de reeds ontwikkelde NV2247 het meest dominant aanwezig was, daarom is dit monster in de verdere rapportage niet meegenomen.

Om nieuwe NV merkers te ontwikkelen is het nodig inzicht te verkrijgen in welke (bekende *en* onbekende) virussen in hoge concentraties in de betreffende monsters aanwezig zijn. Om dit inzicht te verkrijgen wordt een techniek gebruikt dat metagenomics heet. Hiermee wordt de genetische code bepaald van al de in een monster aanwezige organismen en worden dus ook virussen op basis van hun DNA inzichtelijk gemaakt. De gevolgde procedure wordt hieronder op hoofdlijnen omschreven en is schematisch weergegeven in Figuur 2-2. Van elk watertype zijn steeds twee monsters meegenomen (duplo's).



Figuur 2-2. Schematische weergave van doorlopen stappen om nieuwe NV-merkers te ontwikkelen voor andere waterbronnen.

### 2.2.1 Voorbehandeling watermonsters

1. *Concentratie watermonsters*: Om de concentratie virusdeeltjes te maximaliseren zijn de watermonsters steeds eerst geconcentreerd. Voor rioolwater is geen concentratiestap uitgevoerd omdat de concentratie virussen in rioolwater dermate hoog is dat er geen concentratiestap noodzakelijk is.
2. *Verrijken virusdeeltjes*: Het doel van deze stap is om andere organismen (o.a. bacteriën, schimmels en (delen van) andere organismen) en grotere deeltjes uit het monster te verwijderen zodat zoveel mogelijk van het monster bestaat uit virussen. Anders bestaat het risico dat het genetisch materiaal van de virussen niet in voldoende mate terug is te vinden in de resultaten. Hiervoor is het geconcentreerde monster eerst gefilterd over een filter met poriëgrootte van 0,7  $\mu\text{m}$  en daarna over een 0,22  $\mu\text{m}$  filter.
3. Vervolgens zijn de overgebleven deeltjes geconcentreerd met behulp van ultracentrifugatie (uitgevoerd door de WUR). Hiermee worden alle deeltjes in een pellet/neerslag geconcentreerd waarna het bovenstaande water kan worden verwijderd.
4. Vervolgens is eventueel 'vrij aanwezig' DNA en RNA afgebroken met enzymen (DNase en RNase). Dit vrije DNA/RNA is afkomstig van organismen (hogere organismen, bacteriën) die zijn afgestorven en kapot zijn gegaan, maar waarvan het genetisch materiaal nog niet is afgebroken. Het is daarom onwenselijk om dit vrije DNA/RNA in de analyse mee te nemen.
5. Het genetisch materiaal uit de overgebleven organismen (met name virussen) is geïsoleerd en opgezuiverd met de PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit van Thermo Fischer.
6. Het gezuiverde DNA is vervolgens gebruikt voor een metagenoom analyse om de DNA-codes van het geïsoleerde DNA te bepalen. De metagenoom analyses zijn door het Erasmus Medisch Centrum (EMC) uitgevoerd. Door de Corona pandemie hebben de analyses vertraging opgelopen aangezien metagenoom analyses ook worden gebruikt om Sars-Cov-2 en diens varianten te typeren.

### 2.2.2 Data-analyse metagenoom resultaten

De genetische codes die met de metagenoom sequencing zijn verkregen voor de monsters zijn middels bioinformatica geanalyseerd. Door het EMC zijn met het programma Genome Detective (Vilsker, Moosa et al. 2018) de data verwerkt (assemblies maken) om daarna de DNA-sequenties te identificeren. Voor identificatie is een referentie database gebruikt die alleen virale sequenties bevat. Nadeel hiervan is dat alleen bekende virussen kunnen worden geïdentificeerd. Volledig onbekende virussen worden met deze aanpak niet weergegeven, dit

terwijl bekend is dat juist in milieumonsters nog veel onbekende virussen aanwezig zijn (Krishnamurthy and Wang 2017).

Tabel 2-11. Overzicht van het aantal DNA sequenties dat per monster is gevonden (aantal DNA sequenties) en hoeveel hiervan overeenkomen met reeds bekende virussen in de door "Genome Detective gebruikte database. Dit betreft data verkregen van monsters na filtratie over 0,2 µm om grotere deeltjes te verwijderen en na afbraak van vrij DNA/RNA.

Watermonster	Aantal DNA sequenties	Aantal virale DNA sequenties	Percentage
Rioolwater (1)	3.432.688	568.104	14,5
Rioolwater (2)	3.778.872	305.186	16,5
Grondwater Ps Ouddorp (1)	5.604.508	334.972	6,0
Grondwater Ps Ouddorp (2)	2.561.834	154.650	6,0
Grondwater Schuwacht (1)	6.862.510	376.952	5,5
Grondwater Schuwacht (2)	4.145.198	207.830	5,0
Zeewater (1)	4.130.500	1.225.304	29,7
Zeewater (2)	8.363.554	2.880.508	34,4
Lekkanaal (1)	539.924	78.946	9,1
Lekkanaal (2)	2.767.796	401.034	14,5

Voor gebruik als NV-merker is het met name van belang dat de virussen in hoge concentraties aanwezig zijn om met qPCR analyses de verwijdering gedurende zuiveringsprocessen te kunnen monitoren. Daarom zijn de datasets ook geanalyseerd om te bepalen welke DNA-sequenties dominant in de monsters aanwezig zijn, dus ook van onbekende virussen. Hiervoor is gebruik gemaakt van het programma MetaviralsSPAdes (Antipov, Raiko et al. 2020). Met deze aanpak zijn een aantal bruikbare DNA-sequenties geïdentificeerd, al is de virale herkomst van deze DNA-sequenties minder zeker. Gezocht is naar dominante DNA-sequenties die waarschijnlijk afkomstig zijn van virussen en uniek zijn voor een bepaalde waterbron. Er is ook gezocht naar DNA-sequenties van virussen die in alle, of meerdere, waterbronnen dominant voorkomen (voor gebruik als universele virusmerker). Deze bleken niet aanwezig.

### 2.2.3 Ontwikkeling qPCR analyses voor nieuwe NV merkers

Voor dominant aanwezige DNA-sequenties die uniek lijken te zijn voor elk watertype zijn verschillende synthetische DNA-moleculen (primers) ontworpen op basis waarvan potentieel toepasbare qPCR assays zijn ontwikkeld (SYBR Green).

Waterbron	Naam PCR	Meest verwant virus in database
Grondwater Ps Ouddorp	Grond1	Beihai_narna-like_virus (refseq:NC_032463)
	Grond2	Beihai_sobemo-like_virus (refseq:NC_032895)
	Grond3	Geen verwant virus in database
	Grond4	Hubei_tombus-like_virus (refseq:NC_033220)
	Grond5	Geen verwant virus in database
Grondwater Zs Schuwacht	Grond6	Avon-Heathcote_Estuary_associated_circular_virus (refseq:NC_026642)
	Grond7	Geen verwant virus in database
	Grond8	Cladosporium_fulvum_T-1_virus (refseq:NC_043491)
	Grond9	Errantivirus (refseq:NC_038512)
	Grond10	Geen verwant virus in database
	Grond11	Geen verwant virus in database
RWZI influent Utrecht*	RWZI1	Culex_Bastrovirus-like_virus (refseq:NC_040647)
	RWZI2	Tomato_brown_rugose_fruit_virus (refseq:NC_028478)



Zeewater	RWZI3	Pseudomonas virus PaMx74
	RWZI4	Olive_mild_mosaic_virus (refseq:NC_006939)
	CrassPhage	
	Sea1	Vibrio_phage_ICP2 (refseq:NC_015158)
	Sea2	Phaeocystis_globosa_virus (refseq:NC_021333)
	Sea3	Pseudoalteromonas_phage_Pq0 (refseq:NC_029100)
	Sea4	Verrucomicrobia_phage_P8625 (refseq:NC_029047)

\* Deze zijn ook vergeleken met de reeds bestaande merker voor rioolwater: CrassPhage.

Vervolgens is een eerste screening met de ontwikkelde qPCR analyses uitgevoerd, daarbij zijn de 18 nieuwe qPCR analyses en ook Crassphage en NV2247 (oppervlaktewater) doorgemeten in al de vijf watertypen (grond- 2x, zee-, riool- en oppervlaktewater) waarbij het volgende is onderzocht:

- Zijn de gemeten concentraties hoog?
- Zijn de NV-merkers uniek voor de watertype waarvoor ze zijn ontwikkeld?

De resultaten van de screening staan weergegeven in Tabel 2-12. Omdat voor deze qPCR analyses nog geen ijklijnen zijn opgezet is het niet mogelijk de resultaten goed te kwantificeren. Daarom zijn de ruwe resultaten van de qPCR analyse in Ct-waarden weergegeven. Van belang bij het lezen hiervan is dat een *hoge* (of late) Ct-waarde overeenkomt met een *lage* DNA-concentratie (met een maximum van 40 Ct). Een *lage* (of vroege) Ct-waarde komt dan dus overeen met een *hoge* DNA-concentratie (vroegst gemeten waarde is 15 Ct). Ook is van belang om te beseffen dat ongeveer elke toe- of afname van 3,3 Ct overeenkomt met een factor 10 lagere of hogere DNA-concentratie in de qPCR reactie.

Tabel 2-12. Overzicht van de qPCR resultaten (Ct-waarden) van de 21 qPCR analyses uitgevoerd op de vijf verschillende waterbronnen. De resultaten zijn een gemiddelde van twee monsters per waterbron. De grijs gearceerde cellen geven aan dat het een merker betreft dat is ontwikkeld voor die waterbron. "n.a." geeft aan dat de merker niet is aangetoond in het monster. De oranje gearceerde cellen geven aan dat de merker in een andere waterbron is gedetecteerd met een late Ct-waarde. De rood gearceerde cellen geven aan dat de merker in een andere waterbron is aangetoond met een vroege Ct-waarde. De groen gearceerde cellen geven aan dat de qPCR analyse is geselecteerd voor verdere doorontwikkeling en testen.

Watertype	qPCR naam KWR	Grondwater (Ps Ouddorp)	Grondwater (Zs Schuwacht)	Rioolwater (RWZI Utrecht)	Zeewater (Kamperland)	Oppervlaktewater (Lekkanaal)
Grondwater (Ps Ouddorp)	Grond 1	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
	Grond2	27	<i>n.a.</i>	30	<i>n.a.</i>	37
	Grond3	24	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
	Grond4	29	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	35
	Grond5	21	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Grondwater (Zs Schuwacht)	Grond6	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	32	<i>n.a.</i>
	Grond7	<i>n.a.</i>	19	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	37
	Grond8	36	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	30
	Grond9	28	32	32	37	<i>n.a.</i>
	Grond10	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
	Grond11	32	22	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	31
Rioolwater	RWZI1	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
	RWZI2	33	37	37	<i>n.a.</i>	28
	RWZI2	27	30	29	32	<i>n.a.</i>
	RWZI4	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
	Crassphage	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	23	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Zeewater	Sea1	31	<i>n.a.</i>	28	15	32
	Sea2	<i>n.a.</i>	33	29	21	28

	Sea3	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	29	15	28
	Sea4	26	29	31	16	<i>n.a.</i>
Oppervlaktewater	NV2247	28	32	17	21	15
Volume watermonster in PCR (ml/PCR)		38,5	158,9	0,4	14,2	15,2

Op basis van de screening is per waterbron één qPCR analyse geselecteerd de laagste Ct-waarde (hoogste concentratie) heeft in de eigen oorspronkelijke waterbron (grijs gearceerde cellen in tabel). De geselecteerde qPCR analyses om door te ontwikkelen zijn groen gearceerd in bovenstaande tabel, deze worden hieronder kort toegelicht en Tabel 2-13 samengevat.

- Voor het grondwater van Ps Ouddorp geldt dat een goede kandidaat is gevonden in Grond5. De Ct-waarde is relatief laag en deze is niet in de andere vier monsters aangetoond<sup>1</sup>.
- Voor het grondwater van Zs Schuwacht is een goede kandidaat gevonden in Grond7, deze heeft een lage Ct-waarde en is niet of nauwelijks in de andere monsters aangetoond<sup>1</sup>. In het oppervlaktewatermonster is het met een Ct-waarde van 37 aangetoond, dit is echter laat te noemen (rond de theoretische detectielimiet van de qPCR analyse).
- Voor zeewater is een goede kandidaat gevonden in Sea1. Deze heeft de laagste Ct-waarde en komt in de overige monsters veel later op. In het grondwater van Zs Schuwacht is Sea1 niet aangetoond<sup>1</sup>.
- Voor rioolwater is gebleken dat de reeds bestaande merker Crassphage het meest geschikt is. Deze heeft een relatief lage Ct-waarde en is in de andere monsters niet aangetoond<sup>1</sup>.
- Voor NV-merker NV2247 geldt dat de laagste Ct-waarde is gemeten in het water waarin deze merker oorspronkelijk is geïdentificeerd (oppervlaktewater uit het Lekkanaal). De resultaten laten ook zien dat hogere concentraties NV2247 ook zijn gemeten in de rioolwater- en zeewatermonsters. Dit geeft aan de deze NV-merker niet alleen specifiek is voor oppervlaktewater.

Opvallend is dat er maar twee NV-merkers in hoge concentraties aanwezig zijn in grondwater (Grond5 en Grond7) en dat deze beide merkers uniek zijn voor hun eigen specifieke grondwaterbron. Ze kunnen daarom niet als universele NV-merker voor grondwater worden gebruikt.

Een aantal van de ontwikkelde analyses is niet bruikbaar gebleken doordat ze lage concentraties of geen resultaat geven (*n.a.*) in de waterbron waarvoor ze zijn ontwikkeld (bijvoorbeeld analyse Grond6, Grond10 en RWZ14).

Tabel 2-13. Overzicht van de qPCR analyses die zijn geselecteerd voor verdere optimalisatie en testen.

Waterbron	PCR naam	Kennis over de NV-merker	Status
Grondwater Ps Ouddorp	Grond5	Onbekend	Nieuwe NV-merker
Grondwater Zs Schuwacht	Grond7	Onbekend	Nieuwe NV-merker
Zeewater	Sea1	Homologie met Vibrio_phage_ICP2	Nieuwe NV-merker
Rioolwater	CrassPhage	Een Bacteroides bacteriofaag	Bestaande NV-merker
Oppervlaktewater	NV2247	Onbekend	Bestaande NV-merker

Deze qPCR analyses zijn vervolgens doorontwikkeld:

- Naar een op probe gebaseerde qPCR analyse (zie voor toelichting paragraaf 2.1.1).
- Kwantificatie middels een ijklijn (zie voor toelichting 2.1.2).
- Voor deze nieuwe NV-merkers is nog geen LOD en LOQ-bepaling uitgevoerd.

<sup>1</sup> In onderzochte hoeveelheid water

De oorspronkelijke waterbronnen zijn met de ontwikkelde NV-merkers met qPCR doorgemeten om de concentraties (kopieën/L in plaats van Ct-waarden) te bepalen. De resultaten staan weergegeven in Tabel 2-14. Belangrijk hierbij is dat geen concentratiestap is uitgevoerd voor deze analyses, er is in plaats daarvan direct 300 µl watermonster aan de DNA-extractieprocedure toegevoegd. Dit betekent dat de detectielimieten van de qPCR analyses hoger zijn dan gebruikelijk.

Tabel 2-14. Zes ontwikkelde NV-merkers voor verschillende waterbronnen zijn gebruikt voor detectie en kwantificatie in vijf waterbronnen (duplonsters geanalyseerd) om de specificiteit en concentraties te bepalen in de oorspronkelijke monsters. De resultaten zijn weergegeven als DNA-kopieën per liter.

Waterbronnen	NV2247 (opp. water)	NV2310 (opp. water)	NV GR5 (Ps Ouddorp)	NV GR7 (Zs Schuwacht)	NV SEA1 (zeewater)	CrassPhage (rioolwater)
Oppervlaktewater (Lekkanaal)	3,2E+08	1,4E+08	<6,3E+05	<6,3E+05	<6,3E+05	<6,3E+05
Oppervlaktewater (Lekkanaal)	3,6E+08	1,5E+08	<8,0E+05	<8,0E+05	<8,0E+05	<8,0E+05
Grondwater (Ps Ouddorp)	<6,2E+05	<6,2E+05	4,3E+06	<6,2E+05	<6,2E+05	<6,2E+05
Grondwater (Ps Ouddorp)	<5,7E+05	<5,7E+05	3,7E+06	<5,7E+05	<5,7E+05	<5,7E+05
Grondwater (Zs Schuwacht)	<6,7E+05	<6,7E+05	<6,7E+05	<6,7E+05	<6,7E+05	<6,7E+05
Grondwater (Zs Schuwacht)	<7,2E+05	<7,2E+05	<7,2E+05	<7,2E+05	<7,2E+05	<7,2E+05
Zeewater	2,0E+07	1,0E+07	<8,0E+05	<8,0E+05	2,2E+08	<8,0E+05
Zeewater	2,4E+07	9,4E+06	<8,0E+05	<8,0E+05	2,1E+08	<8,0E+05
Brakwater*	<8,3E+05	<8,3E+05	<8,3E+05	<8,3E+05	7,2E+06	<8,3E+05
Brakwater*	<7,4E+05	<7,4E+05	<7,4E+05	<7,4E+05	8,1E+06	<7,4E+05
Rioolwater	2,9E+07	<1,9E+06**	<1,9E+06	<1,9E+06	<1,9E+06	1,3E+09
Rioolwater	3,2E+07	<1,8E+06**	<1,8E+06	<1,8E+06	<1,8E+06	1,6E+09

\* Voor deze metingen is een brakwater monster (Oosterschelde bij Kamperland) geanalyseerd in plaats van een zeewatermonster om te bepalen of voldoende hoge concentraties aanwezig zijn van de merker in deze watertype.

\*\* In ander onderzoek van KWR is NV2310 wel in hoge concentraties aangetoond in rioolwater, vergelijkbaar met NV2247 en crAssphage (data hier niet opgenomen), waarschijnlijk doordat grotere volume monsters zijn geanalyseerd waardoor de detectielimiet lager lag.

- De metingen laten zien dat de CrassPhage merker in rioolwater in hoge concentraties aanwezig is (gemiddeld 2,9E+09 kopieën/L).
- Ook de nieuwe NV-merker SEA1 is in de oorspronkelijke zeewaterbron in hoge concentraties gemeten (gemiddeld 2,2E+08 kopieën/L). De concentratie van SEA1 in het brakwatermonster van de Oosterschelde is in ongeveer 100x lagere concentraties aangetroffen dan in zeewater. Of deze concentraties in alle brakwateren aanwezig zijn en of deze hoog genoeg is om in de praktijk, bij de zuivering van brakwater, de verwijdering in verschillende zuiveringsprocessen effectief te monitoren zal in de praktijk moeten worden onderzocht.
- Zoals reeds bekend zijn de NV-merkers (NV2247 en NV2310) in oppervlaktewater in hoge concentraties aanwezig (3,4E+08 en 1,5E+08 kopieën/L respectievelijk). Beide NV-merkers zijn ook in hoge concentraties aangetoond in zeewater (gemiddeld respectievelijk 2,2E+7 kopieën/L en 9,7E+6 kopieën/L), al is de concentratie SEA1 merker nog ongeveer 10 keer hoger en daarmee beter geschikt. De oppervlaktewater NV-merker NV2247 is ook in relatief hoge concentraties aangetoond in het rioolwater (gemiddeld 3,1E+07 kopieën/L), al is de concentratie CrassPhage merker ongeveer nog 100x hoger en daarmee beter geschikt.
- De nieuwe NV-merker GR5 voor grondwater bij Ps Ouddorp is in iets lagere concentraties aangetoond (gemiddeld 4,0E+06 kopieën/L). De praktijk moet uitwijzen of deze concentraties hoog genoeg zijn om de verwijdering in verschillende zuiveringsprocessen effectief te kunnen monitoren.
- De NV-merker voor grondwater bij Zs Schuwacht (GR7) is niet boven de detectiegrens van 7,0E+06 kopieën/L aangetoond. Dit heeft enerzijds te maken met de hogere detectielimiet van de methode zoals die is toegepast (zonder concentratiestap) en anderzijds doordat deze analyse nog niet optimaal lijkt te functioneren. Dit is

met name te zien doordat de qPCR analyse een lagere signaalsterkte heeft dan gebruikelijk, waardoor deze minder efficiënt wordt gedetecteerd. Bovendien is gebleken dat het grondwater ijzerrijk is, wat ook een negatief effect kan hebben op de qPCR methode. Een verdere optimalisatie van de methode en de qPCR analyse is nodig om deze optimaal te laten functioneren voor toepassing in de praktijk. Een aantal opties om dit te doen zijn:

- De qPCR analyse optimaliseren. Zoals eerder genoemd is de signaalsterkte van GR7 lager dan gebruikelijk, door dit te verbeteren (bv. met een aangepaste probe) zou de detectielimiet lager worden.
- Het water van Zs Schuwacht is rijk aan ijzer en mangaan wat een negatief effect heeft op de concentratiestap (er kan minder volume worden gefiltreerd) en op de qPCR analysestap (ijzer en mangaan kunnen de analyse verstoren). Door de filtratie en/of DNA-isolatie stappen te optimaliseren om de invloed van het ijzer en mangaan in het bronwater te minimaliseren is het mogelijk de detectielimiet te verlagen.
- Het permeaat na RO-filtratie bevat geen ijzer meer. Het is daarom mogelijk de volume water dat wordt bemonsterd en geanalyseerd te verhogen (bv. door gebruik te maken van hemoflow, zie ook paragraaf 2.1.3). Dit zou de detectielimiet van de methode ook verlagen.
- Het grondwater opnieuw analyseren met metagenomics om te beoordelen of een andere NV-merker mogelijk in hogere concentraties in het bronwater aanwezig is.

Initiële testen met de nieuw ontwikkelde NV-merkers GR5 en GR7 zijn uitgevoerd op reeds beschikbare DNA-extracten van drinkwaterzuiveringen. De resultaten worden besproken in paragrafen 4.3.2.5 en paragraaf 5.2.2.4. Omdat dergelijke praktijkmonsters niet beschikbaar waren voor de nieuwe NV-merkers voor zeewater en rioolwater, was het niet mogelijk praktijkmonsters hiervan te analyseren.

#### 2.2.4 Samenvatting en conclusies

Hieronder staan de voornaamste uitkomsten samengevat over de ontwikkeling van nieuwe NV-merkers voor andere drinkwaterbronnen:

- Nieuwe NV-merkers voor grondwater (twee aparte) en voor zeewater zijn ontwikkeld. Deze analyses kunnen nu routinematig worden toegepast, al moet de LOD en LOQ van de methode nog worden bepaald. Bestaande merkers voor oppervlaktewater (NV2247 en NV2310) en voor rioolwater (CrassPhage) bleken effectiever dan het ontwikkelen van nieuwe NV-merkers voor deze watertypen.
- De grondwater NV-merkers bleken niet universeel te zijn voor grondwater. Beiden merkers werden alleen aangetoond in het grondwater waarin ze zijn geïdentificeerd. In het andere grondwater zijn ze niet boven de detectielimiet aangetoond. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het feit dat de condities in verschillende soorten grondwater sterk variëren (bv. zoutconcentraties, redoxcondities, nutriënten, etc.) en daarom ook verschillende microbiomen bevatten. Door te bepalen welke NV-merkers in welke type grondwater voorkomen (bv. aeroob, ijzerrijk, nitrificerend, sulfaatreducerend, methanogeen, ...) is het waarschijnlijk dat voor verschillende type grondwateren verschillende NV-merkers ontwikkeld en toegepast kunnen worden.
- De **GR5 NV-merker** lijkt vrij consistent aanwezig te zijn in het infiltratiewater van Ps Ouddorp. De concentratie van de NV-merker was hoog genoeg en de detectielimiet van de methode was laag genoeg om de LRV van de UF-stappen consistent te bepalen. Verdere praktijktesten moeten uitwijzen of de merker ook op andere momenten, voor andere grondwaterbronnen en zuiveringsprocessen kan worden toegepast.
- De **GR7 NV-merker** (Zs Schuwacht) moet verder worden geoptimaliseerd en getest om te bepalen of deze in de praktijk kan worden toegepast. Dit betreft met name of de concentratie in het bronwater hoog genoeg is, de optimalisatie van de methode (om ijzer en mangaan in het bronwater te verwijderen) en de optimalisatie van de qPCR analyse.
- De **SEA1 NV-merker** is in zeer hoge concentraties gemeten in zeewater. Hiermee is het in principe goed mogelijk om de integriteit van ontziltingsinstallaties te monitoren. Het was echter niet mogelijk om dit binnen het project te testen. De concentraties van SEA1 in brak water (van de Oosterschelde) was een ongeveer een factor 100

lager (in 1 monster gemeten). Niet onderzocht is of deze merker ook op andere zeewaterlocaties of op andere momenten prevalent is.

- De bestaande merker voor rioolwater, **CrassPhage**, is meest geschikt gebleken voor dit watertype.
- De bestaande merker voor oppervlaktewater, **NV2247**, is opnieuw als meest dominante merker gevonden in oppervlaktewater. Deze NV-merker is ook in hoge concentraties aangetoond in zeewater en in rioolwater. De tweede NV-merker voor oppervlaktewater **NV2310** is ook opnieuw in hoge concentraties aangetoond in oppervlaktewater. Deze is ook in hoge concentraties aangetoond in zeewater. Het is niet aangetoond in rioolwater terwijl dat eerder wel het geval was, waarschijnlijk heeft dit te maken met de hogere detectielimiet als gevolg van kleine monstervolumina die in behandeling zijn genomen.

De werkzaamheden hebben geresulteerd in analyses voor twee nieuwe potentiële NV-merkers, één voor grondwater (GR5) en één voor zeewater (SEA1). De qPCR analyse voor een derde potentiële NV-merker, voor grondwater (GR7), vergt wat nadere optimalisatie. Voor de drie nieuwe NV-merkers geldt dat onderzocht moet worden in hoeverre deze generiek en constant voorkomen in het water waarvoor ze zijn ontwikkeld voordat deze gebruikt kunnen worden voor praktijktesten. Voor grondwater is reeds gebleken dat waarschijnlijk verschillende merkers nodig zijn afhankelijk van het type grondwater dat wordt gebruikt.

### 2.3 Karakteriseren NV-merkers in oppervlaktewater

Alleen de (gedeeltelijke) genetische DNA-codes zijn bekend van de natuurlijke virussen die als NV-merkers worden gebruikt. Het is echter van belang om ook informatie te hebben over de fysische eigenschappen van de natuurlijke virussen die worden geanalyseerd als NV-merker, zoals grootte, lading en vorm. Indien bijvoorbeeld de grootte van het virus bekend is, dan kan het specifiek worden ingezet voor integriteitmetingen van membranen met een specifieke poriëgrootte. Binnen deze activiteit is op twee manieren getracht deze informatie te verkrijgen voor natuurlijke virussen uit oppervlaktewater:

- Op basis van de genetische code.
- Op basis van laboratoriumtesten.

Deze werkzaamheden zijn uitgevoerd voor de NV-merkers voor oppervlaktewater (nog niet voor de binnen dit project nieuw ontwikkelde NV-merkers)

#### 2.3.1 Analyse van genetische code

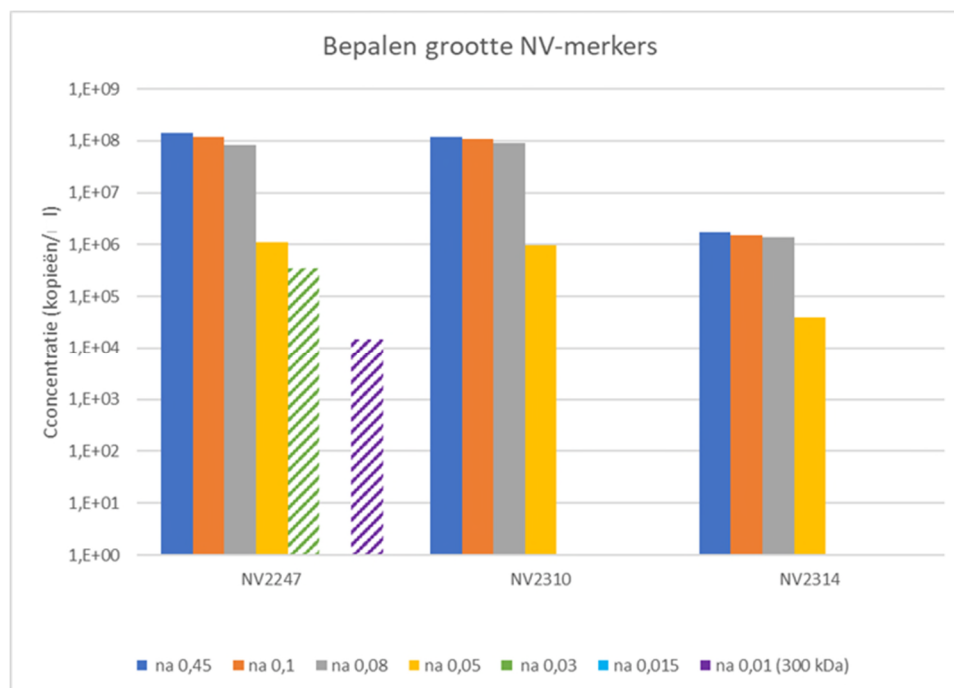
Van de huidige, uit oppervlaktewater geïdentificeerde, virussen is de genetische code grotendeels bekend (Hornstra, Silva et al. 2019). Door de beschikbare data op DNA- en eiwit-niveau, met Blast (Altschul, Gish et al. 1990) en Genome Detective (Vilsker, Moosa et al. 2018) te analyseren, is getracht te achterhalen of (delen van) het DNA, of de eiwitsequenties (vertaald vanuit de DNA-sequenties), overeenkomsten (homologie) heeft met reeds bekende virussoorten en/of hun eiwitten. Echter, vanwege het ontbreken van referentiesequenties in de databases, geven deze analyses geen inzicht in de virussen waarvan de DNA-sequenties afkomstig zijn. Hierdoor is het ook niet mogelijk om, alleen op basis van de DNA-sequenties, iets te kunnen zeggen over de eigenschappen (afmeting, morfologie, oppervlakte eigenschappen of lading) van deze virussen.

#### 2.3.2 Laboratoriumtesten

Een aantal laboratoriumtesten is uitgevoerd om inzicht te krijgen in de grootte en de lading van de natuurlijke virussen die met de NV-merkers worden aangetoond.

### 2.3.2.1 Grootte

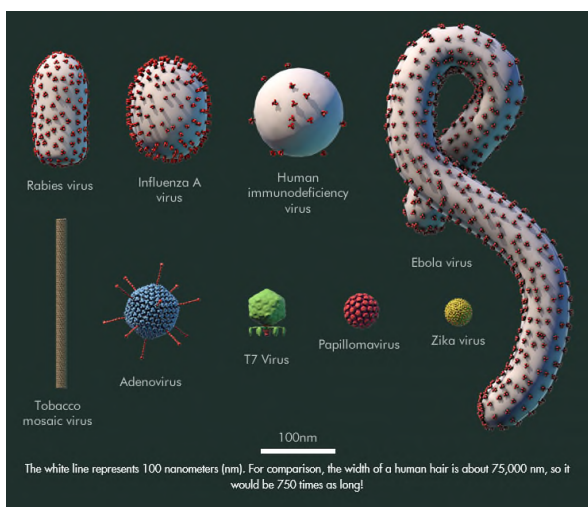
Om een indicatie van de grootte van de virussen te verkrijgen is een rivierwatermonster over filters met verschillende poriëgroottes gefilterd (van 0,45µm tot 0,01µm). Door na elke stap het gefilterde water met qPCR te testen kon worden bepaald of de NV-merkers door het filter gingen (en dus kleiner zijn dan de poriëgrootte van dat filter) of juist op het filter achterbleven (en dus groter zijn dan de poriëgrootte van die filter). De resultaten zijn weergegeven in Figuur 2-3.



Figuur 2-3. Concentratie (kopieën/L) van drie NV-merkers voor oppervlaktewater na filtratie met filters van verschillende poriëgrootte om inzicht te krijgen in de grootte van de virussen voor oppervlaktewater (NV2247, NV2310 en NV2314). Gearceerde balken geven aan dat de NV-merker wel is aangetoond, maar niet kon worden gekwantificeerd (<LOQ).

De resultaten laten zien dat de drie natuurlijke virussen tussen de 50 nm en 80 nm groot zijn. Na filtratie met 50nm worden de NV-merkers nog wel gedetecteerd met qPCR, al zijn de concentraties ongeveer een factor 40-120 lager. Voor NV2247 geldt dat ook na filtratie met 30 nm poriëgrootte en 10 nm poriëgrootte de NV-merker nog is aangetoond met qPCR, maar niet meer kon worden gekwantificeerd (<LOQ). Verschillende oorzaken dat na filtratie toch nog een deel van de virussen kan worden aangetoond zijn:

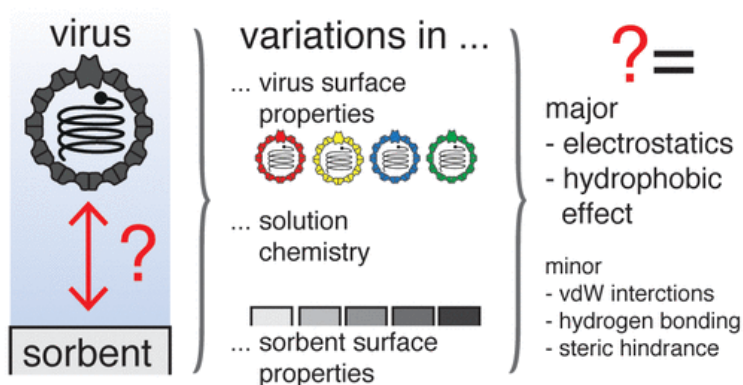
- De vorm van de virusdeeltjes: wanneer het bijvoorbeeld langwerpige deeltjes zijn is het mogelijk dat de deeltjes in de breedte groter zijn dan de porie van het filter, maar in de lengte veel smaller zijn en nog wel door de porie heengaan (zie ter illustratie Figuur 2-4).
- De qPCR analyse kan ook vrij DNA detecteren van virusdeeltjes die kapot zijn gegaan, maar waarvan het DNA niet is gedegradeerd. Het vrije DNA is kleiner dan de virusdeeltjes en kan daarom nog door kleinere poriën heen.
- De poriën in filters hebben niet allemaal precies de aangegeven poriëgrootte. Ze bevatten willekeurig verdeelde poriën waardoor poriën soms overlappen en daardoor groter zijn. Dit betekent dat deels ook grotere deeltjes nog door de filters heen komen.



**Figuur 2-4.** Overzicht van verschillende vormen en groottes van bekende virussen. Met name de staafvormige tobacco mosaic virus, doordat het zo smal is, in de lengte nog door kleinere poriëgroottes heenkomen dan in de breedte mogelijk is (afbeelding afkomstig van [www.pbs.org/spillover-zika-ebola-beyond/about-viruses/virus-explorer](http://www.pbs.org/spillover-zika-ebola-beyond/about-viruses/virus-explorer)).

2.3.2.2 *Lading*

Een belangrijke eigenschap van de NV-merkers voor toepassing in de praktijk is in hoeverre de natuurlijke virussen blijven plakken (absorberen) aan verschillende oppervlaktes als zand, bodem of membranen. Absorptie hangt van verscheidene factoren af, bijvoorbeeld de virusoppervlakte, de samenstelling van de watermatrix en de oppervlakte zelf (zie Figuur 2-5).



**Figuur 2-5.** Schematische weergave van eigenschappen die bepalen of een virusdeeltje aan een oppervlakte plakt of niet uit (Armanious, Aeppli et al. 2016). vdW is van der Waals.

Virussen hebben een pH-afhankelijke oppervlaktelading in water. Om inzicht te krijgen van een virusdeeltje in een medium een neutrale, positieve of negatieve lading heeft, is het isoelektrisch punt (IEP of pI) van het virusdeeltje van belang. Dit is de pH van het medium waarin het virusdeeltje zich bevindt waarbij de netto lading van het deeltje neutraal is (Michen and Graule 2010). Voor virussen kan het IEP liggen tussen 1,9 en 8,4 maar meestal ligt het tussen pH 3,5-7. Enterovirussen hebben bijvoorbeeld een pI 4-6,5; norovirussen van 5,5-6 en MS2 van 3,5-4.

Middels een aantal kolomexperimenten is voor de oppervlaktewater NV-merkers NV2247, NV2310 en NV2314 bepaald of de virussen netto een neutrale, positieve of negatieve lading hebben in vers oppervlaktewater bij drie verschillende pH-waarden (pH 7, 5,5 en 4), zie Figuur 2-6. Vers oppervlaktewater (Lekkanaal) is ingesteld op een gewenste pH-waarde. Vervolgens is het water over een kationwisselaar (vangt positief geladen deeltjes weg) of over een anionwisselaar (vangt negatief geladen deeltjes weg) gebracht. Voor elke pH is een nieuwe kolom aangemaakt met anion of kationwisselaar (in totaal 6 kolommen). De concentratie NV-merkers is in elk van de influent monsters (pH7, pH5,5 en pH4) in triplo met qPCR bepaald. Het effluent van beide kolommen is eveneens in

triplo bemonsterd en met qPCR geanalyseerd op de drie NV-merkers. Indien de NV-merkers een positieve lading hebben bij de geteste pH-waarden is de verwachting dat de concentraties na de kationwisselaar afnemen. Indien de NV-merkers een negatieve lading hebben is de verwachting dat de concentraties na de anionwisselaar afnemen. Indien ze een neutrale lading hebben, wordt er geen afname in concentraties gemeten.

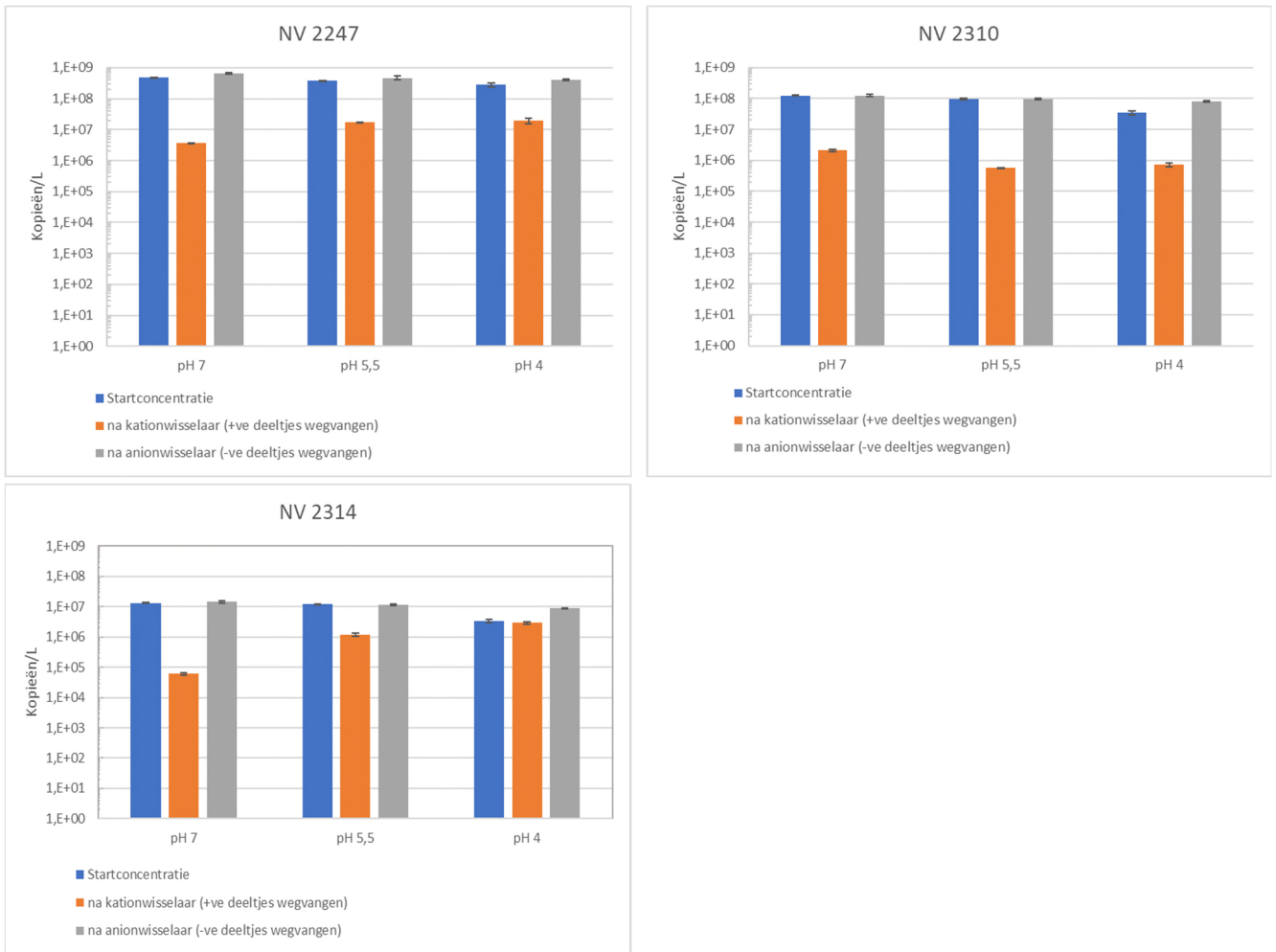


**Figuur 2-6.** Vers oppervlaktewater is eerst gesteld tot de gewenste pH-waarde (pH7, pH5.5 en pH4). Vervolgens is het water over de kationwisselaar of over de anionwisselaar gebracht. Het influentwater en het effluentwater van beide kolommen is in triplo bemonsterd en op de NV-merkers met qPCR geanalyseerd om te bepalen in welke mate de virusdeeltjes zijn weggevangen door de kolommen. Kationwisselaar: vangt positief geladen deeltjes weg (gebruikte hars: Lanxess Lewatit Monoplus S108 (in Na vorm) sterk basisch) Anionwisselaar: vangt negatief geladen deeltjes weg (gebruikte hars: Lanxess Lewatit S6368A (in Cl vorm) sterk zuur)

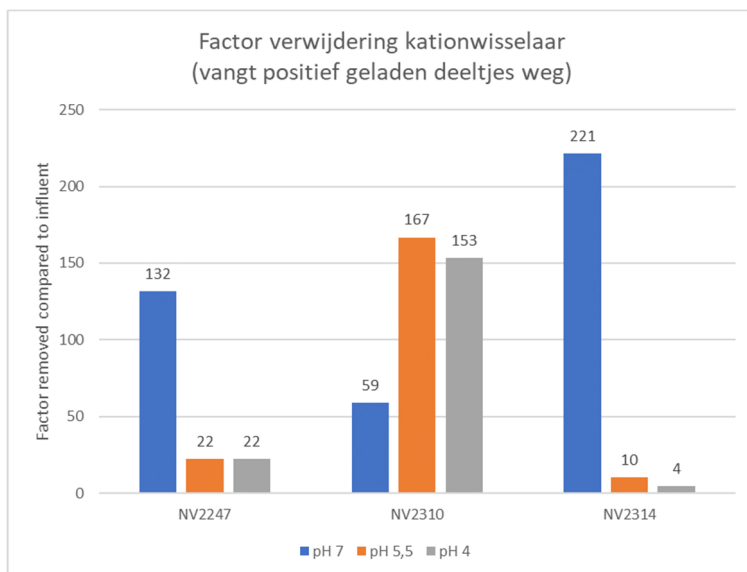
De qPCR resultaten van de kolomexperimenten staan per NV-merker weergegeven in Figuur 2-7. De startconcentraties voor de drie pH-waarden zijn voor NV2247 gelijk gebleven, het veranderen van de pH met HCl heeft geen effect hierop gehad. De startconcentraties van NV2310 en NV2314 bij pH 4 zijn echter (iets) lager dan bij pH 5,5, en pH 7. De concentraties na de anionfilter zijn wel weer gelijk aan de startconcentraties van de andere pH-waarden. Omdat het niet mogelijk is dat er virusdeeltjes worden gevormd is voor de berekening van de verwijderingsfactor van de experimenten bij pH4 gebruik gemaakt van de gemiddelde startconcentraties bij pH 7 en pH 5,5.

De concentraties NV-merkers na de anionwisselaar zijn voor de drie NV-merkers bij de drie geteste pH-waarden gelijk aan de startconcentraties. Dit geeft aan dat de anionwisselaar geen virusdeeltjes heeft weggevangen en dat de NV-merkers bij de geteste pH-waarden geen negatieve lading hebben. De concentraties na de kationwisselaar zijn in veel van de testen wel lager dan de startconcentraties wat aangeeft dat de virusdeeltjes een positieve lading hebben. Voor de kationwisselaar is de verwijderingsfactor berekend en weergegeven in Figuur 2-8.





Figuur 2-7. Met qPCR gemeten concentraties van de drie NV-merkers (NV2247, NV2310 en NV2314) bij de verschillende geteste pH-waarden (pH7, pH5,5, en pH4) bij de start (influent) en na de kationwisselaar en na de anionwisselaar.



Figuur 2-8. Verwijderingsfactor berekend voor de experimenten met de kationwisselaar. Als startconcentratie voor de experimenten bij pH4 is de gemiddelde startconcentraties van pH 7 en pH 5,5 gebruikt.

Voor NV2247 is te zien dat de meeste virusdeeltjes worden weggevangen door de kationwisselaar bij pH 7 (factor 132 lagere concentratie dan het influent). Bij pH 5,5 en pH 4 worden ook minder virusdeeltjes gemeten, al is de verwijderingsfactor lager (factor 22). Dit geeft aan dat bij pH 7 NV2247 een sterkere positieve lading heeft dan bij pH 5,5 en pH 4.

Voor NV2310 is te zien dat, in tegenstelling tot NV2247 en NV2314, juist meer virusdeeltjes zijn verwijderd bij lagere pH-waarden (factor 167 bij pH 5,5 en factor 153 bij pH 4) dan bij pH 7 (factor 59 verwijderd). Dit geeft aan dat NV2310 juist meer positief geladen is bij lagere pH-waarden.

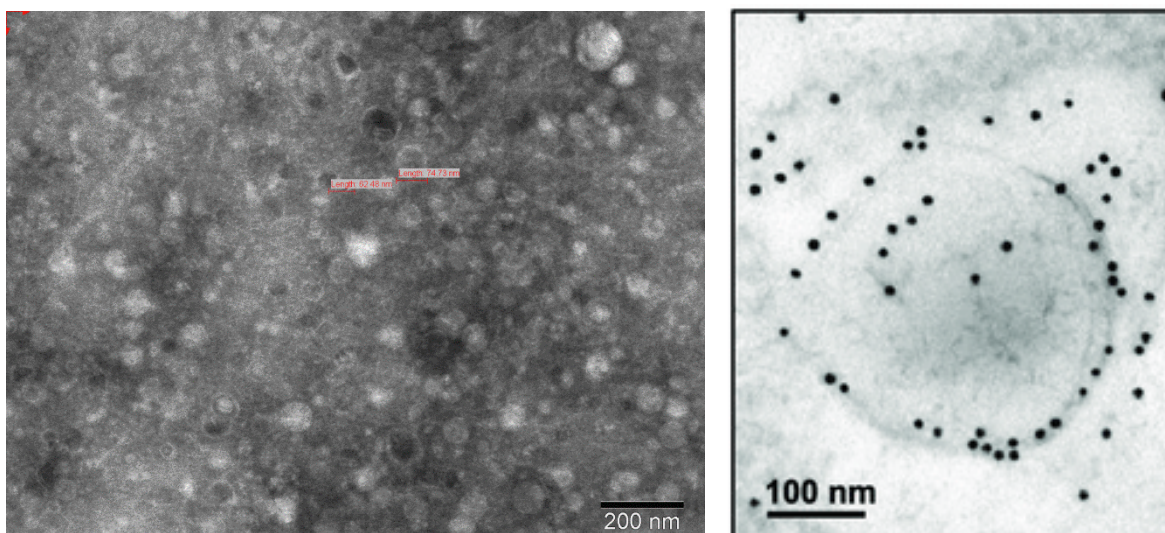
Voor NV2314 geldt dat de verwijderingsfactor van de kationwisselaar hoger is bij pH 7 (factor 221 verwijdering) dan bij pH 5,5 (factor 10 verwijdering) en pH 4 (factor 4 verwijdering). De lage verwijderingsfactor bij pH 4 geeft aan dat de lading van NV 2314 bij deze pH min of meer neutraal is en dat dit daarmee rondom het isoelektrisch punt (IEP) ligt van deze virus.

Deze experimenten geven een eerste indicatie van de lading van de NV-merkers bij verschillende pH-waarden van het oppervlaktewater. Om de IEP van de verschillende NV-merkers nauwkeurig te bepalen is het nodig meer pH-waarden te testen en/of de opzet van de experimenten aan te passen. Verschillende methoden om de IEP te bepalen staan omschreven in de wetenschappelijke literatuur, de meeste worden gebruikt voor pure viruspreparaten (schone monsters, geen grote diversiteit aan geladen deeltjes in het medium). Het is van belang te bepalen welke methode het meest geschikt is om te gebruiken voor milieumatrices die een grote diversiteit aan geladen deeltjes en virussen bevatten.

### 2.3.2.3 *Morfologie*

Om de natuurlijke virussen uit oppervlaktewater van rond de 50-80 nm grootte te visualiseren is elektronenmicroscopie nodig. Transmission Electronmicroscopie (TEM) is eerder gebruikt op een geconcentreerd oppervlaktewatermonster, zie Figuur 2-9 (Hornstra, Silva et al. 2019). Hierin zijn veel virusdeeltjes te zien, het nadeel is echter dat geen onderscheid kon worden gemaakt tussen alle zichtbare virussen en is het dus onbekend welke specifiek door de verschillende qPCR's voor NV-merkers worden gemeten. Daarom is een aanpak nodig waarmee met elektronenmicroscopie onderscheid kan worden gemaakt tussen de specifieke NV-merkers en andere virussen die in de milieumonsters aanwezig zijn.

Omdat de DNA-sequenties (grotendeels) bekend zijn van de natuurlijke virussen die met de NV-merkers worden aangetoond, is het DNA het enige manier op dit moment om onderscheid te kunnen maken. FISH (Fluorescence in situ Hybridisation) is een veelgebruikte methode om specifieke cellen/micro-organismen te labelen/merken met een fluorescerende DNA-probe en deze daarna te visualiseren onder een fluorescentie microscoop. Voor een elektronenmicroscoop is een vergelijkbare methode bruikbaar waarbij gebruik wordt gemaakt van met goud-gelabelde DNA-probes (Visa, Puvion-Dutilleul et al. 1993, Cmarko and Koberna 2007), echter naar ons weten is deze methode niet eerder gebruikt om onbekende virussen te onderscheiden en zichtbaar te maken in milieumonsters.



Figuur 2-9. Linkerplaatje uit (Hornstra, Silva et al. 2019) met TEM zonder probe. veel virussen zijn zichtbaar, maar het is niet mogelijk te zeggen welke de NV-merkers zijn die in het onderzoek worden gebruikt. Rechterplaatje aangepast uit (Rensen, Pietropaoli et al. 2022) als voorbeeld van EM-ISH, hier is Sars-CoV-2 virus in humane cellen zichtbaar als zwarte bolletjes alleen is het niet mogelijk de morfologie van de virussen te zien (wordt gebruikt om te bepalen waar in de cel de virussen zich bevinden).

Verscheidende Nederlandse EM-laboratoria zijn benaderd met de vraag of ze een dergelijke analyse uit kunnen voeren. De Microscopy CORE Lab (MCL) van Maastricht University is bereid gevonden een protocol hiervoor op te zetten en dit toe te passen om een van de natuurlijke virussen (NV2247) te visualiseren.

De volgende drie monsters zijn door KWR aangeleverd aan MCL:

Monsteromschrijving	Inschatting NV2247 concentratie per 500 $\mu$ l	Inschatting MS2 concentratie per 500 $\mu$ l
1. geconcentreerd Lekkanaal water met NV2247 (<0,08 $\mu$ m) en MS2	6,6E+07	8,2E+12
2. geconcentreerd Lekkanaal water met NV2247 (<0,45 $\mu$ m) en MS2	6,7E+07	7,8E+12
3. hoge concentraties MS2	-	8,9E+12
4. negatieve controle - drinkwater	-	-

MS2 is een virus dat door KWR veelal als standaard of referentie wordt gebruikt. Deze is in de monsters 1 en 3 meegenomen om als positieve controle te fungeren. De werkzaamheden uitgevoerd door MCL en tussentijdse resultaten staan beknopt omschreven door MCL in Bijlage 6.

Ondanks dat een aantal stappen in het protocol met succes is doorlopen, is het labellen van de virussen met een DNA-probe nog niet succesvol gebleken. Optimalisatie van de monstervoorbehandeling om andere deeltjes te verwijderen en de concentratie virussen te vergroten zou de kans van slagen kunnen vergroten. Ook is verdere optimalisatie van de labelling procedures met DNA-probes nodig.

### 2.3.3 Samenvatting en conclusies

Hieronder staan de voornaamste uitkomsten samengevat over de karakterisatie van de NV-merkers in oppervlaktewater.

Het is niet mogelijk gebleken op basis van de genetische code van de NV-merkers (genotype) een uitspraak te doen over de eigenschappen (fenotype). Dit komt doordat geen/zeer weinig informatie nog aanwezig is over deze natuurlijk virussen.

De grootte van de NV-merkers NV2247, NV2310 en NV2314 is bepaald met filtratie experimenten.

- De drie NV-merkers zijn tussen de 50nm en 80nm groot.
- Na filtratie met 50 nm worden de NV-merkers nog in lagere concentraties gedetecteerd wat aangeeft dat deze mogelijk niet een ronde vorm hebben en/of dat de gebruikte filters deels ook grotere poriën bevatten.
- NV2247 is ook na filtratie met 30 nm poriegrootte en 10 nm aangetoond (<LOQ), dit kan ook eveneens door de vorm van de virus of het filter, of doordat residueel vrij DNA wordt gemeten.

De lading van de NV-merkers NV2247, NV2310 en NV2314 is bepaald in oppervlaktewater bij pH 7, pH 5,5 en pH 4.

- Onder de geteste condities heeft geen van de NV-merkers een negatieve lading.
- Bij pH 7 heeft NV2247 een sterkere positieve lading dan bij pH 5,5 en pH 4.
- NV2310 heeft een sterkere positieve lading bij pH 5,5 en pH 4 dan bij pH 7 (in tegelstelling tot NV2247 en NV2314).
- Bij pH7 heeft NV2314 een sterkere positieve lading dan bij pH5,5 en pH4. Bij pH 4 lijkt de lading van NV2314 min of meer neutraal te zijn wat aangeeft dat dit rondom het isoelektrisch punt (IEP) ligt van deze virus.

Initiële experimenten zijn uitgevoerd om de NV-merkers onder een elektronenmicroscop te labelen om ze zo te visualiseren en te onderscheiden van andere virussen (EM-ISH). Gedurende de looptijd van het project is het niet gelukt om deze analyse succesvol uit te voeren, ondanks meerdere pogingen. Een aantal stappen in het protocol is succesvol gebleken, echter is optimalisatie van de monstervoorbehandeling en labelling procedures nodig om de kans van slagen te vergroten.

## 3 Verkenning mogelijkheden om NV-methode op locatie uit te voeren

De verwijderingscapaciteit van een waterbehandelingsstap kan worden bepaald door NV-merkers voor en na de behandeling te kwantificeren. Door dit te monitoren is het mogelijk de integriteit van de zuiveringsstappen te monitoren en tijdig in te grijpen indien de verwijderingscapaciteit minder is. Hiervoor is het nodig regelmatig de analyses uit te voeren en tijdig de resultaten te verkrijgen zodat hier ook naar kan worden gehandeld. Op dit moment worden de analyses echter uitgevoerd in gespecialiseerde laboratoria waardoor de doorlooptijd en kosten voor de analyses hoger liggen. Idealiter zou het daarom mogelijk zijn zelf de analyses op locatie uit te voeren. Daarmee zou ter plekke en met meer regelmaat (bv. dagelijks) de integriteit kunnen worden bepaald en is een snellere respons mogelijk indien dit nodig blijkt. In dit werkpakket is een eerste verkenning uitgevoerd naar opties om op locatie de qPCR analyses voor NV-merkers uit te voeren.

### 3.1 Beschikbare lab-onafhankelijke qPCR-methoden

In de afgelopen jaren zijn verschillende qPCR systemen beschikbaar gekomen die het voor niet-specialisten mogelijk maken om qPCR analyses op locatie uit te voeren. Deze zijn of draagbaar/mobiel op verschillende locaties te gebruiken, of autonoom op één locatie te gebruiken. Een aantal systemen zijn beschikbaar die in alle/de meeste stappen voorzien:

- Udetect ([www.udetect.nl](http://www.udetect.nl)): mobiel qPCR systeem voor watermonsters (filtratie (0,2 µm), DNA-isolatie, qPCR)
- Biomeme ([www.biomeme.com](http://www.biomeme.com)): mobiel qPCR systeem (DNA-isolatie en qPCR)
- GeneCount qPCR ([www.luminultra.com/tech/genecount-qpcr/](http://www.luminultra.com/tech/genecount-qpcr/)): mobiel qPCR systeem (DNA-isolatie en qPCR)
- Bioalert ([www.bioalert.ca](http://www.bioalert.ca)): autonoom opererend systeem op basis van qPCR ontwikkeld voor monitoring van Legionella in koelwater.
- Krakensense ([www.krakensense.com](http://www.krakensense.com)): autonoom opererend systeem op basis van qPCR ontwikkeld voor monitoring van bacteriën en virussen.

Voor al deze systemen geldt dat ze, op dit moment, nog niet direct ingezet kunnen worden voor routinematige monitoring van de NV-merkers in water, bijvoorbeeld omdat ze nog veel handmatig werk vereisen en/of omdat ze nu nog met name geschikt zijn voor het analyseren van bacteriën of enkel hoge concentraties virussen.

### 3.2 Verkennende testen met twee online qPCR methoden

Voor twee systemen was het mogelijk om gedurende de looptijd van het project een aantal verkennende testen uit te voeren om te beoordelen of de DNA-isolatie en qPCR stappen op hoofdlijnen geschikt zijn om NV-merkers te monitoren:

- GeneCount
- Udetect

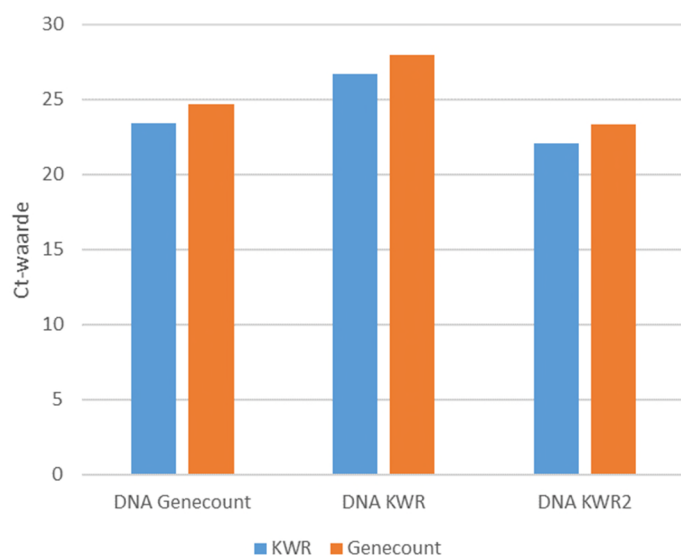
#### 3.2.1 Genecount® van Luminultra

Omdat geen geschikte methode beschikbaar is om virussen in het veld te concentreren, is voor de verkennende testen geen concentratiestap uitgevoerd maar is een DNA-isolatie direct op een klein volume monster (1000 µl) uitgevoerd. Dit betekent dat de detectielimieten hoger zijn dan gebruikelijk. De Genecount methode voor DNA-isolatie (ontwikkeld voor Sars-Cov-2) is vergeleken met twee methoden die door KWR worden gehanteerd (Qiagen en Biomerieux) op een drinkwatermonster en een oppervlaktewatermonster (Lekkanaal). De monsters zijn steeds geanalyseerd op NV2247.



Figuur 3-1. Genecount Q-16 mobiele qPCR system van LuminUltra voor DNA-isolatie en qPCR analyse.

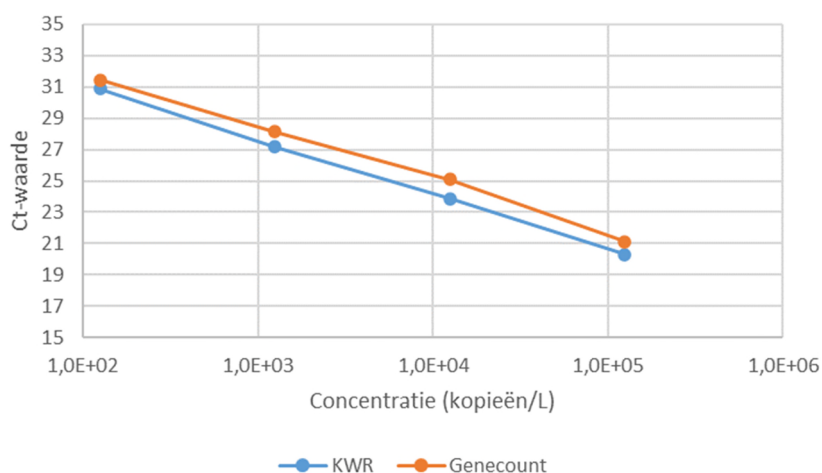
De resultaten verkregen met de verschillende methoden zijn weergegeven in Figuur 3-2.



Figuur 3-2. Ct-waarden gemeten van NV2247 (in Lekwater). Drie verschillende DNA-isolatiemethoden zijn gebruikt (van Genecount, de standaardmethode van KWR en een alternatieve methode van KWR (KWR2)). De drie DNA-isolaten zijn getest op het qPCR apparaat van KWR (CFX van Biorad) en die van Genecount.

De Ct-waarden verkregen voor de verschillende DNA-isolatiemethoden kunnen niet één op één worden vergeleken. Dit komt doordat het DNA met de Genecount en de KWR2 gedurende de isolatieprocedure een concentratiestap hebben ondergaan (van respectievelijk 20x en 10x) ten opzichte van de standaard KWR-methode. Dit verklaart waarom de Ct-waarden van de KWR-methode hoger zijn dan die voor Genecount en KWR2. Wanneer hiervoor wordt gecorrigeerd (bijvoorbeeld door 3,3 Ct-waarde bij de Genecount en KWR2 op te tellen) is geen verschil meer tussen KWR en Genecount. KWR2 heeft in dat geval iets lagere Ct-waarden dan de andere twee DNA-isolatiemethoden. De resultaten laten verder zien dat de Ct-waarden gemeten met het KWR-apparaat iets lager zijn dan die gemeten met de Genecount (ongeveer 1,2 Ct-waarde verschil).

Vervolgens zijn vier verdunningen van de ijklijn van NV2247 met beide systemen doorgemeten om te bepalen of hier verschillen tussen zijn. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 3-3.



*Figuur 3-3. Vier punten van de ijklijn voor NV2247 zijn gemeten op zowel het qPCR apparaat van KWR als die van Genecount. De resultaten laten zien dat de resultaten zeer vergelijkbaar zijn en dat de Genecount ongeveer 1,2 Ct-waarden hoger is (gemiddeld 0,9 Ct) dan voor KWR.*

De resultaten laten zien dat beide systemen zeer vergelijkbaar presteren. De thermocycler van KWR heeft nu ook weer steeds een iets lagere Ct-waarde dan de Genecount thermocycler.

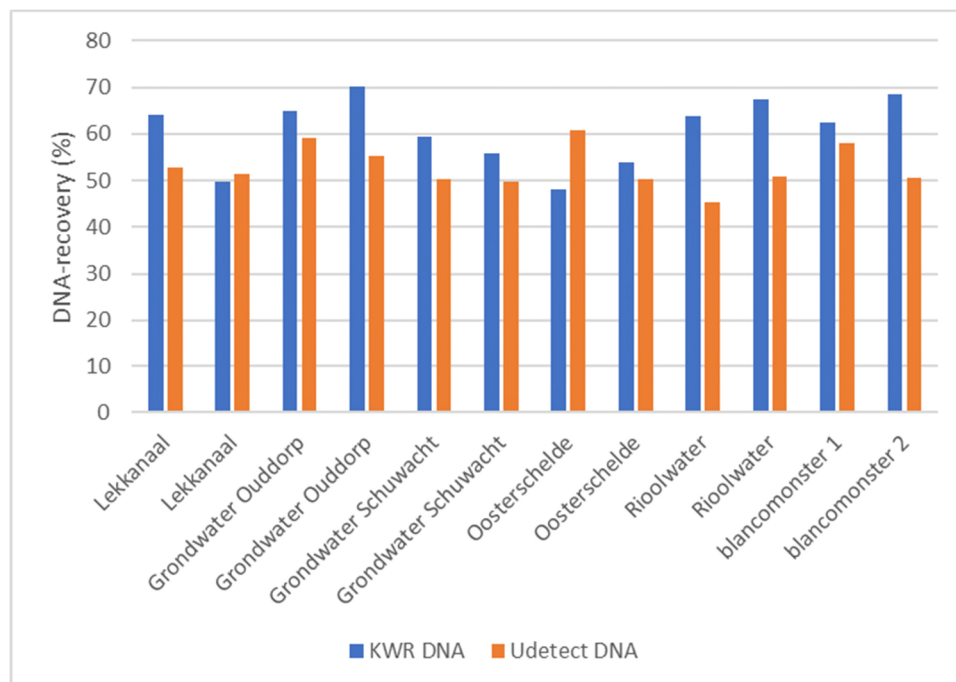
### 3.2.2 Udetect® van Orvion

De verkennende testen zijn uitgevoerd in waterbronnen waarin de NV-merkers in hoge concentraties voorkomen. Omdat de bestaande Udetect concentratiestap niet geschikt is voor het concentreren van virussen is geen concentratiestap uitgevoerd, maar is een DNA-isolatie direct op een klein volume monster (300 µl of 100 µl voor rioolwater) uitgevoerd. Dit betekent dat de detectielimieten hoger zijn dan gebruikelijk. Het Udetect systeem getest ten tijde dat de nieuwe NV-merkers voor zeewater, rioolwater en grondwater werden ontwikkeld (zie paragraaf 2.2). Hierdoor was het mogelijk ook de nieuwe NV-merkers en verschillende waterbronnen te testen met het systeem.



*Figuur 3-4. Het Udetect mobiele qPCR systeem voor waterfiltratie, DNA-isolatie en qPCR analyse.*

Om te bepalen of de DNA-isolatie methode van Udetect geschikt is om de NV-merkers te analyseren met qPCR is in eerste instantie een DNA-isolatie op zes verschillende watermonsters in duplo uitgevoerd met zowel de KWR methode (DNeasy PowerBiofilm Kit van Qiagen) als de Udetect methode. De interne controle is steeds in de DNA-isolaties meegenomen om te kunnen beoordelen hoe efficiënt deze is (zie Figuur 3-5). Ook is een blanco monster meegenomen om te controleren of contaminatie is opgetreden. Het verkregen DNA is vervolgens geanalyseerd voor zes NV-merkers op het qPCR apparaat van KWR (CFX van Biorad).



Figuur 3-5. DNA-recovery bepaald aan de hand van de interne controle voor de twee DNA-isolatiemethoden (KWR en Udetect) voor de duplomonsters.

De interne controle voor DNA-isolatie laat zien dat de efficiëntie van de Udetect methode gemiddeld iets lager ligt (53,7% VC 8,6%) dan die van KWR (60,9% VC 8,6%). De opbrengst is echter nog altijd ruim voldoende. De blanco monsters die zijn meegenomen zijn voor beide methoden steeds negatief getest.

Tabel 3-1. De gemeten concentraties (gecorrigeerd voor DNA-opbrengst) van de zes verschillende NV-merkers (kopieën/L) in vijf verschillende waterbronnen. De monsters zijn steeds in duplo geanalyseerd, de gemiddelde waarde is hier weergegeven.

NV-merker (kopieën/L)	DNA-extract	Watermonster				
		Lekkanaal	GW Ps Ouddorp	GW Zs Schuwacht	Oosterschelde	Rioolwater
NV2247	KWR	3,4E+08	<	<	<	3,1E+07
	Udetect	3,9E+08	<	<	1,3E+06*	3,5E+07
NV2314	KWR	2,5E+06	<	<	<	<
	Udetect	2,8E+06	<	<	<	<
NV GR5	KWR	<	4,0E+06	<	<	<
	Udetect	<	3,9E+06	<	<	<
NV GR7	KWR	<	<	<	<	<
	Udetect	<	<	1,4E+06	<	<
NV SEA1	KWR	<	<	<	7,7E+06	<
	Udetect DA	<	<	<	5,8E+06	<
crAssphage	KWR	<	<	<	<	1,5E+09
	Udetect	<	<	<	<	1,3E+09



\* In dit monster testte één van de duplomonsters positief.

De resultaten laten zien dat de concentraties gemeten in de Udetect DNA-extracten zeer vergelijkbaar zijn met die gemeten in de KWR DNA-extracten. In twee extracten zijn NV-merkers gemeten in het Udetect DNA-extract, maar niet in het KWR DNA-extract, al liggen de metingen zeer dichtbij de detectielimiet (gemiddeld was deze  $9,6E+05$  kopieën/L).

De analyses op de Udetect DNA-extracten die positief waren, zijn vervolgens opnieuw geanalyseerd met de Udetect methode (qPCR en reagentia (niet gevriesdroogd)). De analyses voor de NV-merkers zijn in deze verkennende fase niet geoptimaliseerd of gevalideerd voor het Udetect systeem, de condities zoals gebruikt in het laboratorium van KWR zijn overgenomen. Ook is geen ijklijn gemaakt en getest voor het Udetect systeem waardoor kwantificatie niet mogelijk was. Daarom zijn voor deze testen de Ct-waarden met elkaar vergeleken en niet concentraties. Voor Ct-waarden geldt dat hoe *lager* de Ct-waarde, hoe *hoger* de DNA-concentratie in de reactie is. Een verschil van ongeveer 3,3 Ct-waarden komt overeen met een factor 10 verschil in DNA-concentratie in de reactie.

Tabel 3-2. De Ct-waarden gemeten met het qPCR apparaat van KWR en het qPCR apparaat van Udetect. Lege cellen geven aan dat de analyse niet is uitgevoerd. < geeft aan dat de NV-merker niet boven de detectielimiet van de analyse is aangetoond.

NV-merker	qPCR apparaat	Watermonster				
		Lekkanaal	GW Ps Ouddorp	GW Zs Schuwacht	Oosterschelde	Rioolwater
NV2247	KWR	26,4			35,4	31,6
	Udetect	26,7			34,7	33,0
NV2314	KWR	33,1				
	Udetect	32,4				
NV GR5	KWR		36,3			
	Udetect		36,4			
NV GR7	KWR			35,9		
	Udetect			<*		
NV SEA1	KWR				32,4	
	Udetect				33,4	
crAssphage	KWR					29,6
	Udetect					29,3

\* Het fluorescent signaal van de NV-merker GR7 analyse was te laag voor het Udetect qPCR apparaat om te kunnen detecteren. Zoals eerder omschreven in hoofdstuk 2 is de signaalsterkte van deze analyse lager dan gebruikelijk en is het nodig deze te optimaliseren.

De resultaten laten zien dat de verkregen Ct-waarden met het Udetect apparaat zeer vergelijkbaar zijn met die van het qPCR apparaat van KWR. Eén analyse wijkt af (NV GR7 op het DW Zs Schuwacht DNA-extract), dit komt doordat de signaalsterkte van deze analyse te zwak is en het daarom niet werd opgepakt door het Udetect qPCR apparaat. Optimalisatie van de GR7 analyse is nodig om de signaalsterkte te verhogen.

Deze verkennende testen met Genecount en Udetect laten zien dat er verschillende mogelijkheden bestaan om op locatie de integriteit van zuiveringsstappen te kunnen monitoren aan de hand van NV-merkers. De verkennende testen met twee systemen geven aan dat de DNA-isolatie methoden en qPCR apparaten op hoofdlijnen goed bruikbaar zijn om NV-merkers in water te meten. Doorontwikkeling, optimalisatie en validatie van de systemen is echter noodzakelijk om de benodigde gebruiksvriendelijkheid en lage detectielimieten te kunnen realiseren voor routinematige toepassing in de praktijk. Om een lage detectielimiet te behalen is het met name van belang om een on-site concentratiemethode te hebben, anders kan slechts een klein volume water (<1 ml) worden geanalyseerd.

### 3.3 Samenvatting en conclusies

Hieronder staan de voornaamste uitkomsten samengevat over de verkenning van de mogelijkheden om de NV-methode op locatie uit te voeren.

- Verschillende technologieën zijn commercieel beschikbaar om handmatig of geautomatiseerd qPCR analyses op locatie (buiten het lab) uit te voeren.
- Geen van de technologieën is als zodanig geschikt om de NV-merkers te analyseren. Dit komt met name doordat een lage detectielimiet benodigd is (met name in het permeaat) en doordat virussen i.p.v. bacteriën worden geanalyseerd. De verwachting is dat dit met verdere doorontwikkeling wel haalbaar is.
- Verkennende testen met twee technologieën (Udetect en Genecount) zijn uitgevoerd waaruit blijkt dat de DNA-isolatie en qPCR stappen voldoende goed werken. De benodigde doorontwikkeling betreft met name de concentratiestap en het verder vereenvoudigen van de methodes.
- Het was niet mogelijk de volledig geautomatiseerde qPCR systemen binnen dit onderzoek te testen. Het is daarom niet duidelijk in hoeverre deze technologieën geschikt zouden zijn.

## 4 Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van UF-membranen op lab-, pilot- en praktijkschaal

### 4.1 Algemene informatie NV-methode

De ontwikkelde NV-merkers (zie hoofdstuk 2) worden steeds voor en na een behandelstap gemeten in het water volgens het standaard protocol omschreven in 2.1.3 (indien hiervan is afgeweken wordt dit in de tekst aangegeven). Dit geeft aan wat het verwijderingsrendement is van die zuiveringsstap. Door de verwijderingsrendement in de tijd te monitoren wordt inzichtelijk gemaakt of de verwijdering stabiel blijft, of dat deze terugloopt wat aangeeft dat de zuiveringsstap mogelijk niet meer integer is.

Dit wordt bepaald door de LRV (Log Removal Value) van een zuiveringsstap als volgt te berekenen:

$$LRV = \log_{10} \left( \frac{c_f}{c_p} \right)$$

Waarbij:

LRV	=	Log Reduction Value	[-]
$C_f$	=	concentratie in de voeding	[in kopieën/L]
$C_p$	=	concentratie in het permeaat	[in kopieën/L]

Indien de gemeten concentraties NV-merkers lager zijn dan de onderste analysegrens, is de onderste analysegrens gebruikt om de LRV te berekenen.

Deze toepassing van de ontwikkelde NV-merkers wordt in dit rapport de NV-methode genoemd.

De gebruikte formule om de LRV te berekenen geldt ook voor andere integriteitsparameters als troebelheid (FNU), sulfaat (mg/L) of andere parameters.

### 4.2 Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van UF-membranen op lab- en pilotschaal

De ontwikkelde NV-methode is getest op zowel nieuwe/intacte als beschadigde UF-membranen. Dit is gebeurd op zowel lab/pilot als praktijkschaal om de toepassing van de NV-methode als integriteitsbewaking te verifiëren. Tijdens het lab/pilotonderzoek is de invloed van vezelbreuk op de integriteit van UF-membranen onderzocht. Op deze manier kan een vertaling van vezelbreuk naar de praktijk (eventueel na veroudering van de membranen) worden gemaakt.

In dit rapport worden de resultaten op hoofdlijnen beschreven van het uitgevoerde lab- en pilotonderzoek waarbij de invloed van vezelbreuk op de integriteit van UF membranen is onderzocht inclusief de vertaling naar praktijk UF-installatie (WPC De Gavers). Meer details over het onderzoek zijn te vinden in de volgende publicaties en een presentatie die gedurende het project zijn gerealiseerd:

- Presentatie tijdens het Euromembrane congres in 2022 (Harmsen, Beerendonk et al. 2022);
- Artikel gepubliceerd in Water Matters (Harmsen, Cornelissen et al. 2022);

- Peer reviewed artikel in voorbereiding (Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024A) waarbij naast bovenstaande ook de invloed van vezelreparatie, op pilotschaal, op de integriteit van UF-membranen is meegenomen.

#### 4.2.1 Invloed vezelbreuk op integriteit UF-membraan op labschaal

##### 4.2.1.1 Opzet laboratoriumtesten invloed vezelbreuk op integriteit UF-membranen

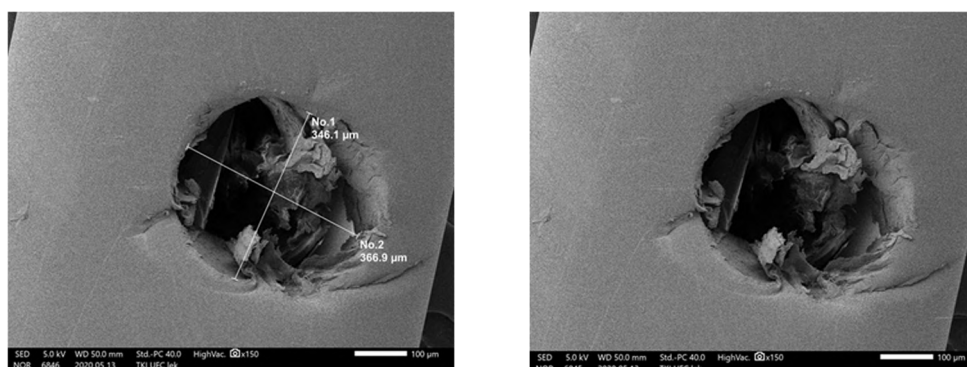
Om de invloed van vezelbreuk op de integriteit van UF-membranen te onderzoeken zijn in eerste instantie testen uitgevoerd met een Pentair RX300 UF-module. De specificaties van de RX300 module zijn weergegeven in Tabel 4-1.

Tabel 4-1. Specificaties RX300 UF- module

Type	Aantal vezels	Membraanoppervlakte (m <sup>2</sup> )	MWCO <sup>2</sup> (kDa)	Poriëngrootte (nm)	interne diameter (mm)
Pentair RX300	120	0,08	150	20	0,8

Als voeding is Lekkanaal water gebruikt afkomstig voor de inlaat voor de WRK in Nieuwegein (achter het KWR gebouw). Het water is opgeslagen in 20 L jerrycans en gekoeld bewaard (4 °C) totdat deze in bewerking werd genomen. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de NV concentratie in het opgeslagen water gedurende 6 maanden niet verandert (hier niet gerapporteerd).

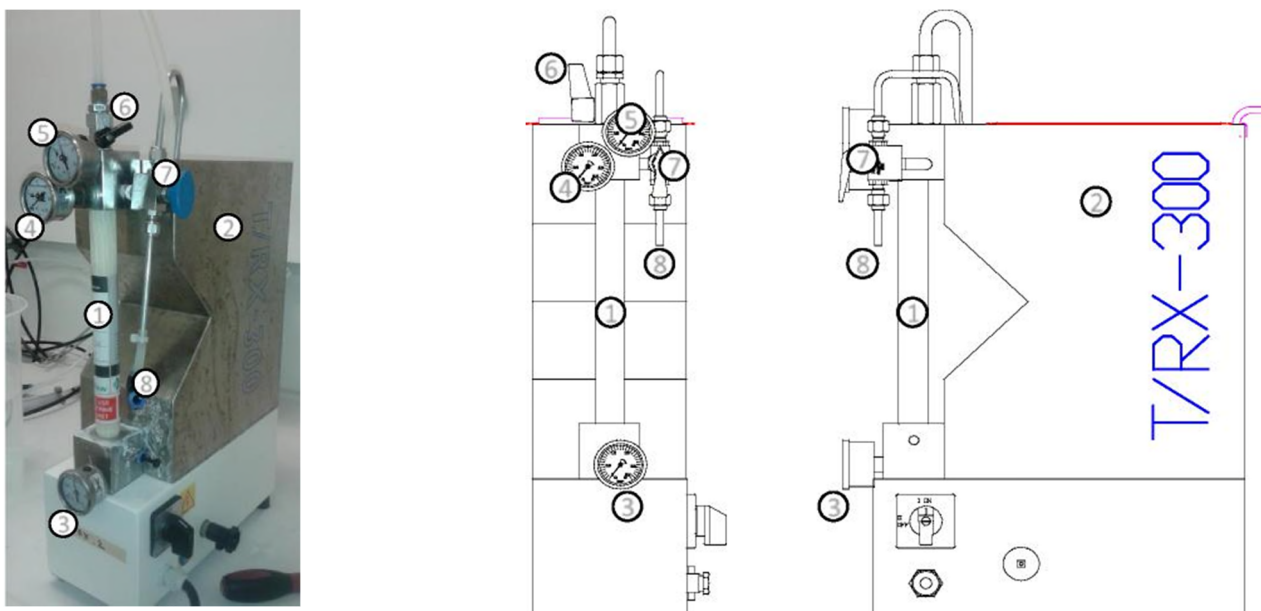
Er zijn verschillende beschadigingen aangebracht aan de vezels van de te testen modules om de invloed hiervan op de membraanintegriteit te onderzoeken. Om een beeld te krijgen vanaf hoeveel beschadigde vezels de membraanintegriteit zou afnemen is er een door KWR/Pentair en model ontwikkeld in Excel om de invloed van vezelbreuk op de UF-membraanintegriteit te voorspellen. Details met betrekking tot het tot stand komen van dit model en de gebruikte formules staan vermeld in Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024A. Uit de modelberekeningen komt naar voren dat beschadiging van 1 vezel (van de in totaal 120 vezels) kan leiden tot een daling van 4 LRV (van 5 naar 1 LRV). Vervolgens zijn modules getest met intacte vezels, vezels met 1 of 3 gaatjes (door middel van boren met een 0,5 mm handboortje) en vezels met 1 of 3 kortere (door vervangen vezels door kortere vezels) vezels. SEM foto's van de aangebrachte beschadiging met behulp van het handboortje zijn weergegeven in Figuur 4-1.



Figuur 4-1. Aangebrachte beschadigingen in UF-vezel met behulp van een 0,5 mm handboortje

De testen werden uitgevoerd met een zogenaamde Pentair X-flow TRX unit waarin zich een RX300 UF-module bevond (Figuur 4-2).

<sup>2</sup> De MWCO (molecular weight cut-off) geeft het molecuulgewicht van stoffen (in Dalton) die voor 90% wordt tegengehouden door het membraan



Figuur 4-2. Links: RX300 module in de TRX300 unit, midden: schematisch vooraanzicht, rechts: schematisch zijaanzicht). Betekenis verschillende nummers aangegeven op de afbeeldingen (1) RX300 module (2) voedingsstank (3) voedingsmanometer (4) permeaatmanometer. (5) retentaatmanometer (6) retentaat/dead-end klep (7) driewegklep. (8) permeaatafvoer

Met de TRX300 unit kunnen op labschaal eenvoudige UF-testen worden uitgevoerd. De UF-module is verticaal in de unit geplaatst. De installatie kan op de volgende twee manieren worden bedreven door de verschillende kleppen te open of te sluiten (zie Figuur 3 2).

1. Spoelen van de module.
2. Filtratie op basis van dead-end filtratie (al het water wordt dan door het membraan geperst).

Tijdens de testen, waarbij de invloed van vezelbreuk op de UF-membraanintegriteit is onderzocht, is de volgende procedure gevolgd:

1. Module gedurende 20 minuten spoelen met Ultrapuur water.
2. SchoonWaterFlux (SWF) bepalen met 5 L Ultrapure water bepaald.
3. Filtratietest uitvoeren met 5 L Lekkanaalwater.
4. Nadat 4 L Lekkanaalwater is behandeld zijn monsters genomen voor de analyse op NV-merkers.
5. De troebelheid van de voeding en permeaat is ook gemeten.

De troebelheid is gemeten met behulp van een HACH 2100Qis Portable Turbidimeter. Deze is ook gebruikt voor alle andere in dit rapport uitgevoerde troebelheidsmetingen. Door de SWF te bepalen kan er worden gekeken wat de permeabiliteit van een membraan is aan het begin van een test voordat deze wordt behandeld met (vuil) water waardoor de permeabiliteit zal afnemen. Daarnaast wordt op deze manier ook de invloed van vezelbreuk op de permeabiliteit onderzocht. Om de permeabiliteit te bepalen zijn het permeaatdebiet en de drukken voor en na de module gemeten. Vervolgens is de permeabiliteit berekend met behulp van de volgende formules.

Om de membraanpermeabiliteit te berekenen dient eerst de transmembraandruk (TMP) en flux te worden berekend. De transmembraandruk (TMP) wordt als volgt berekend:

$$TMP = \frac{P_v + P_c}{2} - P_p$$

Waarbij:

TMP	=	transmembraandruk	[bar]
$P_v$	=	voedingsdruk	[bar]
$P_c$	=	concentraatdruk	[bar]

$P_p$  = permeaatdruk [bar]

De (water) flux wordt als volgt berekend:

$$J_w = \frac{Q_p}{A_{mem}}$$

Waarbij:

$J_w$  = flux [L/m<sup>2</sup>.uur]  
 $Q_p$  = permeaatdebiet [L/uur]  
 $A_{mem}$  = membraanoppervlak [m<sup>2</sup>]

Met behulp van de flux en de TMP wordt de membraanpermeabiliteit berekend:

$$A = \frac{J_w}{TMP}$$

Waarbij:

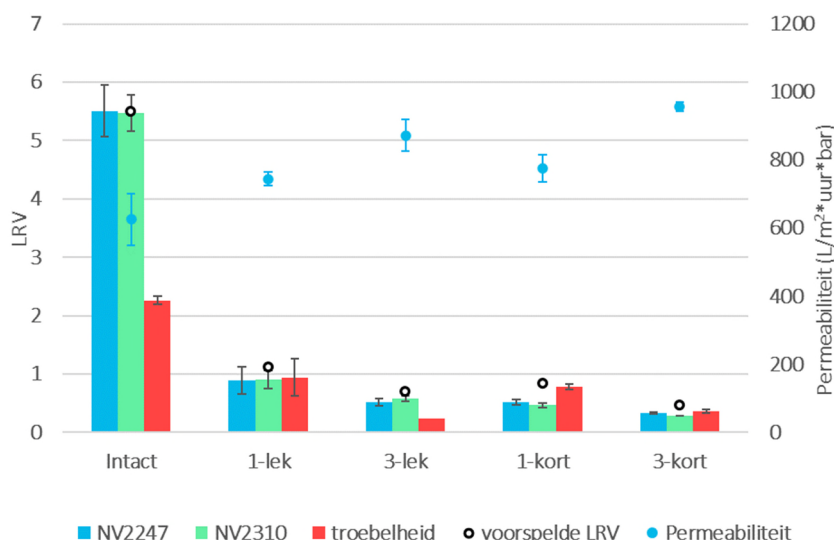
A = (water) permeabiliteit [L/ m<sup>2</sup>.uur.bar]

Alle hierboven beschreven parameters zijn voor dit onderzoek niet genormaliseerd omdat de testen, in alle gevallen, bij ongeveer dezelfde temperatuur zijn uitgevoerd.

De testen zijn uitgevoerd in de periode 29 juni tot en met 1 juli 2020. Er zijn modules getest met intacte vezels, vezels met 1 of 3 gaatjes en vezels met 1 of 3 kortere vezels. Alle testen zijn in duplo uitgevoerd. De monsters zijn steeds geanalyseerd op de NV-merkers voor oppervlaktewater (NV2247 en NV2310) en troebelheid. Daarnaast zijn ook iedere keer als het voedingswater uit een ander vat kwam de concentratie NV-merkers en troebelheid van de voeding opnieuw bepaald. Om de invloed van vezelbreuk op de UF-membraanintegriteit te bepalen is de LRV van de NV-merkers en van de troebelheid door het UF-membraan bepaald zoals hierboven reeds omschreven.

4.2.1.2 Resultaten laboratoriumtesten invloed vezelbreuk op integriteit UF-membranen

De gemiddelde LRV van de NV-merkers en troebelheid en de voorspelde LRV voor de verschillende geteste modules als gevolg van vezelbreuk in een TRX300 module zijn weergegeven in Figuur 4-3. Tevens is de permeabiliteit die is gemeten tijdens de SWF testen van de verschillende modules in de figuur weergegeven. De gemeten SWF, NV-concentraties en troebelheid gemeten tijdens alle testen zijn terug te vinden in Bijlage 2.



Figuur 4-3. Permeabiliteit SWF test, gemeten en voorspelde LRV tijdens testen invloed vezelbreuk op membraanintegriteit met TRX300 module

Uit de resultaten van de laboratoriumtesten met de TRX300 modules met verschillende vezelbreuken weergegeven in Figuur 4-3 blijkt dat:

- De permeabiliteit van het intacte membraan is bij de start van de test (SWF) 625 L/ m<sup>2</sup>.uur.bar.
- De permeabiliteit van een module met lekke vezels toeneemt met 19% (1 lekke vezel) en 39% (3 lekke vezels) ten opzichte van een intacte module.
- De permeabiliteit van een module met korte vezels toeneemt met 24 % (1 korte vezel) en 53 % (3 korte vezels) ten opzichte van een intacte module.
- Met de NV-methode (met NV2247 en NV2310) 5,5 LRV is aangetoond voor een intacte UF-module.
- Met troebelheidsmetingen 2,2 LRV is aangetoond voor een intacte UF-module.
- Beschadiging van 1 lekke vezel (op 120 vezels) resulteert in een daling van 4,5 LRV tot een waarde van 1 LRV.
- De LRV neemt af naarmate de beschadigingen groter worden. 3 lekke vezels geven een vergelijkbare LRV (0,5 LRV) als een beschadiging van 1 korte vezel.
- De LRV bepaald met de NV-methode laat de volgende trend zien intact >> 1 lek > 3 lek = 1 kort > 3 kort
- De gemeten verschillen in LRV (met NV-methode) voor de verschillende aangebrachte vezelbeschadigingen zijn klein (tussen 1,0 – 0,3 LRV).
- De gemeten LRV kwam overeen met de voorspelde LRV zoals bepaald door het model.
- De LRV bepaald met de twee verschillende NV-merkers is hetzelfde (geen significant verschil tussen de twee NV-merkers).
- De LRV bepaald met de NV-merkers verschilt van de LRV bepaald met de troebelheidsmetingen.

#### 4.2.2 Invloed beschadigde vezels 9'' UF-modules

##### 4.2.2.1 Opzet pilotonderzoek invloed vezelbreuk op integriteit UF-membranen met 9'' UF-modules

Een vergelijkbare aanpak ten aanzien van vezelbreuk is vervolgens toegepast op een nieuwe 9'' UF-module. Het onderzoek werd uitgevoerd met een Pentair X-Flow Aquaflex 64 UF-module. De specificaties van de Aquaflex 64 module zijn weergegeven in Tabel 4-2.

Tabel 4-2. Specificaties Pentair X-Flow Aquaflex 64 UF- module

Type	Aantal vezels	Membraanoppervlakte (m <sup>2</sup> )	MWCO (kDa)	Poriëngrootte (nm)	interne diameter (mm)
Pentair X-Flow Aquaflex 64	18.360	64	150	20	0,8

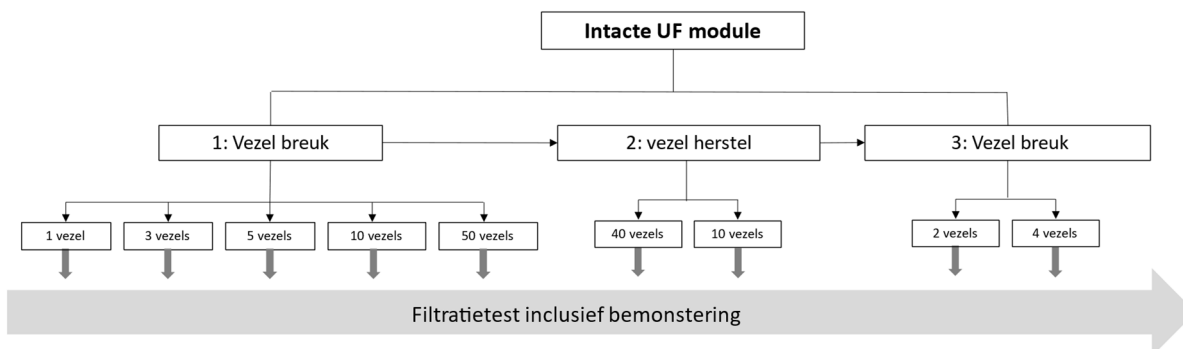
De testen zijn uitgevoerd op de locatie Elsbeekweg (Enschede) van Pentair met water uit het naastgelegen Twentekanaal als voeding (met een concentratie NV-merkers van  $1 \times 10^8$  –  $9 \times 10^8$  kopieën/L, gemeten op 18 mei 2021). Op basis van de resultaten van de RX300 modules testen (zie paragraaf 4.2.1.2) en berekeningen door het door KWR/Pentair ontwikkelde model (Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024A) werd bepaald hoeveel vezels er moeten worden beschadigd om een duidelijk en significant verschil in LRV te kunnen aantonen. Op basis van de berekeningen is voorspeld dat reeds bij de breuk van 1 van de 18.360 vezels een significante LRV daling plaats zou vinden van 5 LRV tot 2,5 LRV (bepaald met de NV-methode) en dat het grootste effect is te verwachten tussen 1 en 10 vezelbreuken.

Om vezels te beschadigen zijn gaten geboord in het omhulsel (epoxylaag) van het membraan. De gaten zijn vervolgens weer dichtgemaakt met behulp van festokoppelingen (Figuur 4-4). Op deze manier kunnen systematisch vezels uit de module worden verwijderd/kapotgemaakt. Dit is gerealiseerd door middel van het doorsnijden van een vezel met behulp van een pincet en 1 mm scalpel (Figuur 4-4).



Figuur 4-4. Vezelbeschadiging 9'' UF-module, links: festokoppeling, midden: aangebrachte gaten om vezels te benaderen rechts: doorsnijden vezel

Op 7 oktober 2021 zijn testen uitgevoerd met de intacte module en na 1, 3, 5, 10 en 50 beschadigde vezels. Op 10 mei 2022 zijn testen uitgevoerd waarbij de omgekeerde weg is bewandeld. Eerst is een test uitgevoerd met een beschadigde module (50 vezels), vervolgens zijn er vezels gerepareerd. Aangezien het meest eenvoudig is om 10 vezels per keer te repareren zijn eerst 40 vezels gerepareerd en getest, en daarna een test uitgevoerd waarbij ook de laatste 10 rietjes zijn gerepareerd. Reparatie is uitgevoerd door de lekken eerst te markeren in een waterbak waar luchtdruk van buiten naar binnen op de membranen is gezet. Om de vezels te repareren is een systematische re-plug methode gebruikt met behulp van een insertie tool met geribbelde pespin.<sup>3</sup> Als laatste stap zijn vervolgens testen uitgevoerd waarbij 2 en 4 vezels opnieuw zijn beschadigd. De volgorde van aangebrachte vezelbeschadiging, vezelreparatie en de daaropvolgende vezelbeschadiging zijn weergegeven in Figuur 4-5.



Figuur 4-5. Schematische weergaven volgorde vezelbeschadiging en reparatie tijden testen met 9'' UF-module op de locatie Elsbeekweg van Pentair

Testen zijn uitgevoerd met de UF-pilot van Pentair die is weergegeven in Figuur 4-6.



Figuur 4-6. UF-pilot van Pentair op de locatie Elsbeekweg

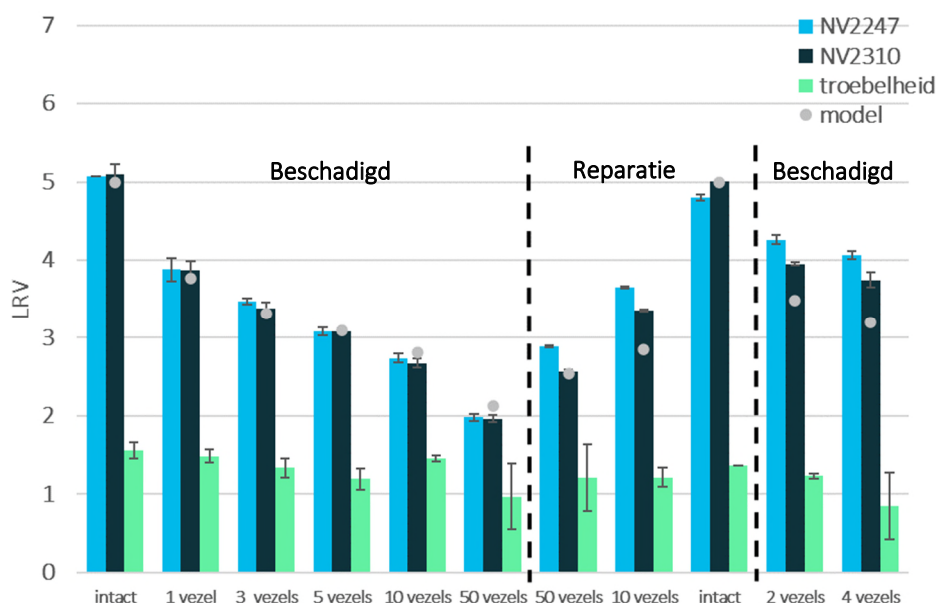
<sup>3</sup> Geen foto's beschikbaar. Vertrouwelijke informatie Pentair.



Alle testen zijn uitgevoerd bij een flux van  $80 \text{ L/m}^2 \cdot \text{uur}$  en een voedingsdruk van  $0,1 - 0,2 \text{ bar}$ . Tijdens iedere filtratietest is gestart met een filtratiestap van 20 minuten om een stabiele flux te bereiken. Daarna is gespoeld in de volgende volgorde: voorwaarts spoelen (15 s) > terugspoelen (30 s) > voorwaarts spoelen (15 s) gevolgd door een tweede en derde filtratie- en spoelstap. Monsters voor NV-analyses voor oppervlaktewater (NV2247 en NV2310) zijn genomen tijdens de tweede en derde filtratiestap. Daarnaast is aan het begin, midden en het einde van de dag een monster genomen van de voeding voor analyse op de NV-merkers. Van alle monsters is ook steeds de troebelheid bepaald.

#### 4.2.2.2 Resultaten pilotonderzoek invloed vezelbreuk op integriteit UF-membranen met 9'' UF-modules

De gemiddelde LRV van de NV-merkers en van de troebelheid en de voorspelde LRV voor de verschillende geteste modules als gevolg van vezelbreuk in een 9'' UF-module zijn weergegeven in Figuur 4-7. De gemeten concentraties NV-merkers en troebelheid zijn terug te vinden in Bijlage 2.



Figuur 4-7. Gemeten en voorspelde LRV tijdens testen met een 9'' UF-module waarbij eerste vezels zijn beschadigd (7 oktober 2021), vervolgens gerepareerd (10 mei 2022) en daarna weer beschadigd (10 mei 2022).

Uit de resultaten van de pilottesten met de 9'' UF-module waarbij eerst vezels werden beschadigd, zijn de volgende observaties gemaakt:

- Met de NV-methode (met NV2247 en NV2310) is 5 LRV aangetoond voor een intacte UF-module.
- Met troebelheidsmetingen is 1,5 LRV aangetoond voor een intacte UF-module.
- Na reparatie van de module zijn vergelijkbare LRV gevonden voor zowel de NV-merkers als de troebelheid ten opzichte van het intacte membraan aan het begin van de testen.
- Beschadiging van 1 vezel (van de 18.360 vezels) resulteert in daling van 1,2 LRV (bepaald met de NV-methode) waardoor de LRV door de 9'' UF-module rond de 4 uitkomt.
- Beschadiging van 50 vezels (van de 18.360 vezels) resulteert in daling van 3,1 LRV (bepaald met de NV-methode) met als gevolg dat de LRV door het beschadigde element op 2,0 uitkomt.
- Na de reparaties is de LRV daling na 2 en 4 vezelbreuk lager is dan de LRV daling na 1 vezelbreuk. De oorzaak hiervan is onduidelijk.
- Beschadiging van vezels laat geen significante verlaging van de LRV zien wanneer dit wordt bepaald met behulp van de troebelheidsmetingen. De spreiding tussen de duplo's ligt ook gemiddeld wat hoger dan de LRV bepaald met de NV-methode.

- De gemeten LRV komen goed overeen met de voorspelde LRV zoals bepaald door het model. Dit geldt met name voordat de reparaties zijn uitgevoerd. Daarna is de voorspelling voor sommige testen minder accuraat geworden (voorspelde LRV ongeveer 0,5 LRV lager dan gemeten LRV).
- Voor reparatie van de vezels is geen significant verschil in de LRV te zien tussen de twee NV-merkers (NV2247 en NV2310). Na reparatie is wel een klein verschil te zien in de LRV bepaald met de twee NV-merkers (tussen de 4,8 en 5,0 LRV). De LRV bepaald met NV2247 is 5,0.

### 4.3 Bepalen membraanintegriteit van UF-praktijkinstallaties met behulp van de NV methode

In de periode december 2019 tot en met november 2023 is de membraanintegriteit, door middel van het bepalen van de LRV, van verschillende UF-praktijkinstallaties van de projectpartners bepaald met behulp van de NV-methode.

De doelstelling van het meten van de LRV van praktijkinstallaties met behulp van de NV-methode waren:

1. Bepalen van de invloed van membraanveroudering (door tijd, chemicaliën en mechanische slijtage) op de integriteit van UF-praktijkinstallaties.
2. De invloed van het membraantype op de membraanintegriteit bepalen (WPC De Gavers, De Watergroep)
3. Vergelijken NV-methode met bestaande integriteitsmethoden (deeltjestellingen) bij PS Heemskerk (PWN).

In Tabel 4-3 staat weergegeven op welke locaties NV metingen zijn uitgevoerd en welke onderzoeksvraag op de desbetreffende locatie is onderzocht.

Tabel 4-3. Locaties monsternamen UF-praktijkinstallaties en onderzoeksvragen

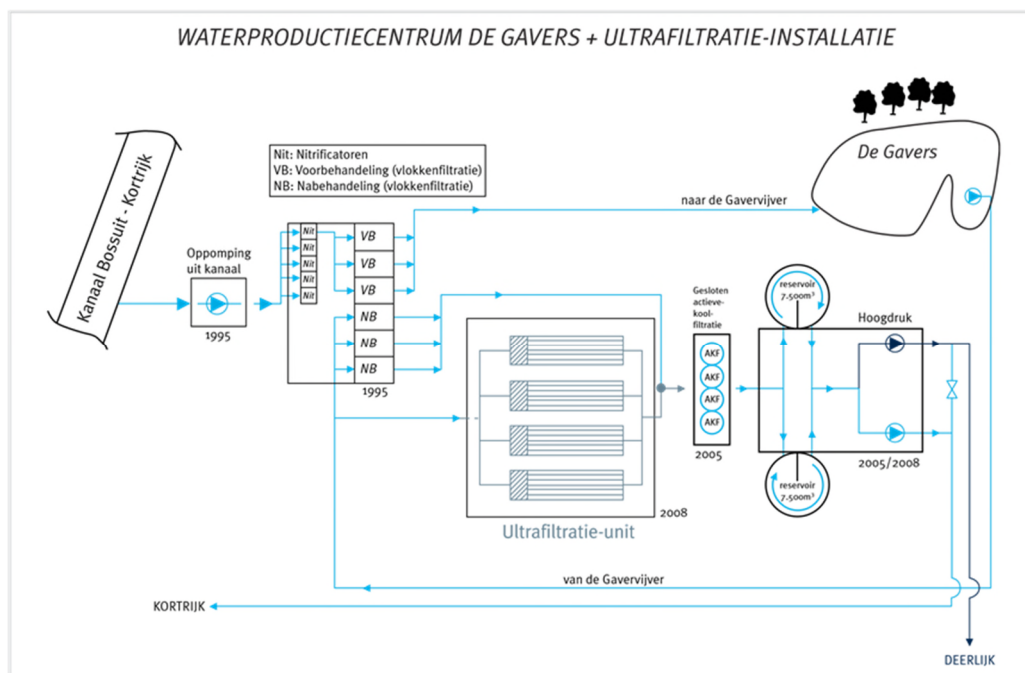
Partner	Locatie	Installatie	Onderzoeksvraag
Evides	PS Ouddorp	UF	Tijdseffect + membraanveroudering
De Watergroep	WPC De Gavers	UF	Tijdseffect + type membranen + membraanveroudering
PWN	DWP Heemskerk	UF	Tijdseffect + vergelijken integriteitsmethoden

De drie NV-merkers ontwikkeld voor oppervlaktewater (NV2247, NV2310 en NV2314, zie ook hoofdstuk 2) zijn in de eerste meetronde gemeten om te bepalen of een voldoende hoge LRV kon worden aangetoond. Op basis van de resultaten van deze nulmetingen is vervolgens bepaald hoe het onderzoek op de praktijkinstallaties voor UF verder vorm te geven.

#### 4.3.1 WPC De Gavers (De Watergroep): bepalen membraanintegriteit UF-installatie met behulp van de NV-methode

##### 4.3.1.1 Opzet eerste NV-metingen WPC De Gavers

Bij WPC De Gavers (De Watergroep) wordt oppervlaktewater gezuiverd (kanaal Bossuit-Kortrijk) door achtereenvolgend nitrificatie, vlokfiltratie (voor fosfaatverwijdering) en opslag in de Gavervijver. Het water van de Gavervijver wordt vervolgens deels gezuiverd door vlokfiltratie (voor verwijdering zwevende stoffen, 25.000 m<sup>3</sup>/dag) of door UF (7.500 m<sup>3</sup>/dag). De laatste zuiveringsstap volgt met behulp van actieve koolfiltratie (AKF). Voor de UF wordt 3 mg-Fe/L als FeCl<sub>3</sub> gedoseerd. Het zuiveringsschema van WPC De Gavers van De Watergroep is weergegeven in Figuur 4-8.



Figuur 4-8. Zuiveringsschema WPC De Gavers

De UF installatie bestaat uit 4 skids waarbij 3 skids zijn gevuld met membranen van Pentair (Pentair Aquaflex 40) en 1 skid met membranen van Suez (IMT Multibore met 7 kanalen). Beide membraan type zijn sinds begin 2011 in gebruik. In Tabel 4-4 zijn de specificaties van beide UF-membranen weergegeven.

Tabel 4-4 Specificaties UF-membranen praktijkinstallatie WPC De Gavers

Type	Skids	Modules per skid	Totaal aantal membranen	Membraanoppervlakte (element/totaal) (m²)	MWCO (kDa)	Poriëngrootte (nm)	interne diameter (mm)
Pentair Aquaflex 40 single-bore	3	40	120	40 / 4800	150	20	0,8
Suez IMT Multibore met 7 kanalen	1	40	40	50 / 2000	100 - 150	?	0,9

De concentratie NV-merkers is eerst gemeten in het ruwe water (de Gavers) en voor UF en na de UF membraaninstallaties (na de Suez UF skid en na de eerste skid van Pentair). Aangezien het niet mogelijk was om een monster te nemen voor de UF na FeCl<sub>3</sub> dosering is het water van de Gavers 2x bemonsterd en is er aan 1 monster 3 mg Fe/L als FeCl<sub>3</sub> toegevoegd. Vervolgens is het monster goed geschud en gedurende 1 minuut 30x gezwenkt. Hiermee is het monster voor de UF gesimuleerd. Op deze manier is bepaald of de FeCl<sub>3</sub> dosering invloed heeft op de concentratie NV-merkers en daarmee de LRV. In Tabel 4-5 is een overzicht gegeven van de monsternamenpunten voor de analyses op de NV-merkers in de zuivering van WPC De Gavers.

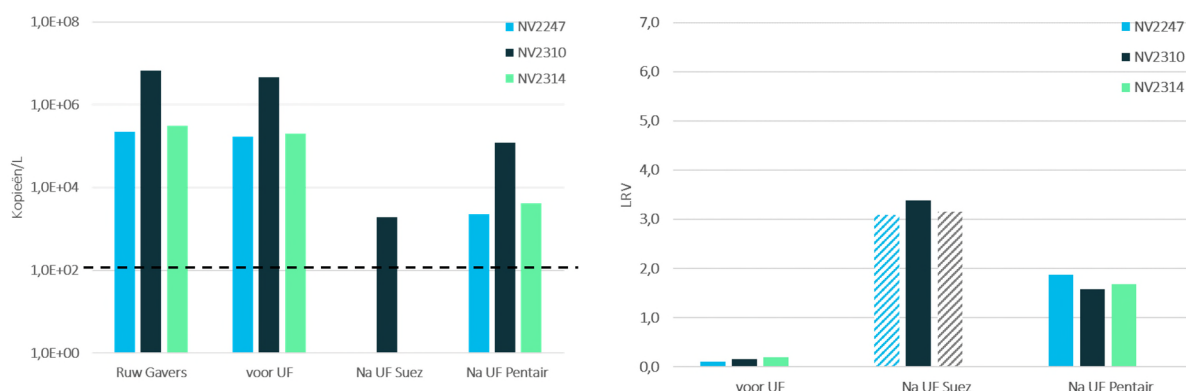
Tabel 4-5. Monsternamenpunten voor analyses op NV-merkers in zuivering WPC De Gavers

Codering	Opmerkingen
Ruw Gavers	Water De Gavers
Voor UF	Water De Gavers + 3 mg Fe/L
Na UF Suez	
Na UF Pentair Skid-1	

4.3.1.2 Resultaten eerste NV-metingen WPC De Gavers

Monsternamen op WPC De Gavers vond plaats op 13 juli 2020. Het is bekend dat ijzer qPCR analyses (en dus ook de analyses voor de NV-merkers) kan verstoren. Omdat ijzer in de vorm van FeCl<sub>3</sub> aan het monster "Voor UF" wordt

gedoseerd kan dit mogelijk verstoring van de analyses opleveren. Om het ijzer voorafgaand aan de analyse te verwijderen is daarom ammoniumoxalaat toegevoegd (zie ook paragraaf 2.1.3). Om te beoordelen of deze voorbehandeling een effect heeft op de NV-metingen is één monster geanalyseerd waaraan ammoniumoxalaat is toegevoegd en één monster waar het niet aan is toegevoegd. In het monster zonder toevoeging van ammoniumoxalaat zijn geen NV-merkers gemeten. In het monster waaraan het wel is toegevoegd zijn wel NV-merkers gemeten en deze zijn daarom gebruikt voor de verdere dataverwerking. In Figuur 4-9 zijn de resultaten van de NV metingen weergegeven.



**Figuur 4-9.** Concentratie NV-merkers gemeten (links) en LRV berekend ten opzichte van vorige processtap (rechts) van de UF-praktijkinstallatie van WPC De Gavers tijdens de eerste meting op 13 juli 2020. Gestreepte horizontale lijn links is de detectiegrens voor de NV-analyses. Gearceerde balken rechts betekent LRV > (LRV berekend met de detectielimiet).

De resultaten van de eerste NV metingen van de UF-praktijkinstallatie van WPC De Gavers weergegeven in Figuur 4-9 laten zien dat:

- Alle geanalyseerde NV-merkers zijn teruggevonden in het water van De Gavers ( $2,2 \times 10^5$  -  $6,6 \times 10^6$  Kopieën/L) en dat de concentraties lager zijn dan metingen uitgevoerd in oppervlaktewater op andere locaties.
- NV2310 in de hoogste concentraties is gemeten in het water van De Gavers ( $6,6 \times 10^6$  Kopieën/L)
- Na de UF skid met Suez membranen alleen NV2310 is teruggevonden.
- Na de UF skid-1 met Pentair membranen alle geanalyseerde NV-merkers zijn teruggevonden.
- Een LRV "Voor UF" (na behandeling met 3 mg Fe/L) ten opzichte van "De Gavers" van nagenoeg 0 is gemeten. Voor vervolgmeting zou het daarom kunnen volstaan om een monster van De Gavers als monster "Voor UF" te gebruiken.
- De gemeten LRV door de UF skid met Suez membranen tussen de 3,1 – 3,4 ligt voor de verschillende merkers. Omdat NV2247 en NV2314 na UF niet meer boven de detectielimiet zijn aangetoond is een minimale LRV bepaald gebruikmakende van de detectielimiet. Dit betekent dat de LRV voor deze twee NV-merkers ook hoger kan zijn.
- De LRV voor skid-1 met Pentair membranen tussen de 1,6 – 1,9 lag voor de verschillende NV-merkers.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monsternamen.

#### 4.3.1.3 Opzet monsternamencampagne WPC De Gavers

Om de invloed van tijd, chemicaliën en mechanische slijtage (door deeltjes in de voeding) op de integriteit van membranen te bepalen is een monsternamencampagne uitgevoerd. Bij WPC De Gavers is gedurende een jaar, eens in de drie maanden een monsternamen uitgevoerd. Tijdens dit jaar is de invloed van membraantype (Pentair en Suez-membraan) op de integriteit onderzocht. Aan het einde van de meetcampagne is een deel van de Pentair (Aquaflex 40) membranen vervangen door Pentair Aquaflex 64 membranen. Daarom is ook de invloed van membraanveroudering op de membraanintegriteit onderzocht. In Tabel 4-6 zijn de specificaties van het Pentair Aquaflex 64 membraan weergegeven.

Tabel 4-6 Specificaties UF Pentair Aquaflex 64 membraan

Type	Membraanoppervlakte (element) (m <sup>2</sup> )	MWCO (kDa)	Poriëngrootte (nm)	interne diameter (mm)
Pentair Aquaflex 64	64	150	20	0,9

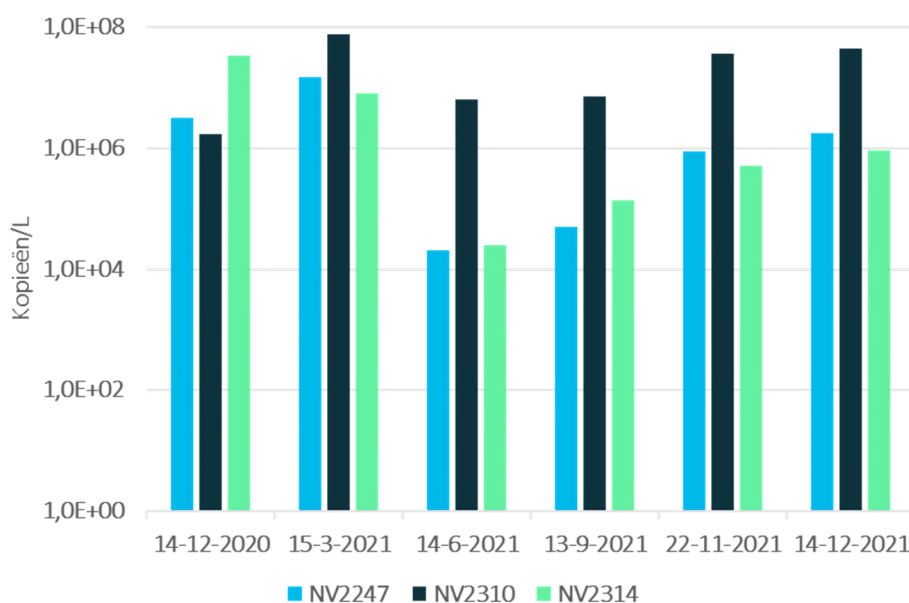
Uit de resultaten van de eerste metingen (paragraaf 3.2.2.2) op WPC De Gavers is voor de volgende opzet van het onderzoek gekozen. Voor de monstercampagne zijn in totaal op vijf momenten monsters genomen op verschillende plekken in de zuivering van De Gavers. De volgende monsterpunten zijn bemonsterd, het water van de Gavers, voor UF en na de vier UF skids. Ook is het verzamelde UF permeaat bemonsterd. In alle monsters zijn steeds de concentraties van de NV-merkers voor oppervlaktewater bepaald (NV2247, NV2310 en NV2314). In november 2021 zijn de membranen van skid 1 en 2 met Pentair Aquaflex 40 membranen vervangen door Aquaflex 64 membranen. Daarom is besloten om een extra monsternamen uit te voeren voor en na vervanging van de membranen. In Tabel 4-7 is een overzicht gegeven van de monsterpunten, de datums van monsternamen en de geanalyseerde NV-merkers tijdens de monsternamencampagne bij WPC De Gavers.

Tabel 4-7. Gegevens monstercampagne WPC De Gavers

Monsternamenpunten	Bemonsteringsdatum
Ruw Gavers, Na UF Pentair skid-1, Na UF Pentair skid-2, Na UF Pentair skid-3 Na UF Suez, Verzameld UF	14-12-2020, 15-3-2021, 14-6-2021, 13-9-2021, 22-11-2021, 14-12-2021

#### 4.3.1.4 Resultaten monsternamencampagne WPC De Gavers

De monsternamencampagne op WPC De Gavers vond plaats van 14 december 2020 tot en met 14 december 2021. Van alle monsters zijn de NV-merkers NV2247, NV2310 en NV2314 geanalyseerd. In Figuur 4-10 zijn de verschillende NV-concentraties van 'Ruw De Gavers' tijdens de monstercampagne van WPC De Gavers weergegeven.

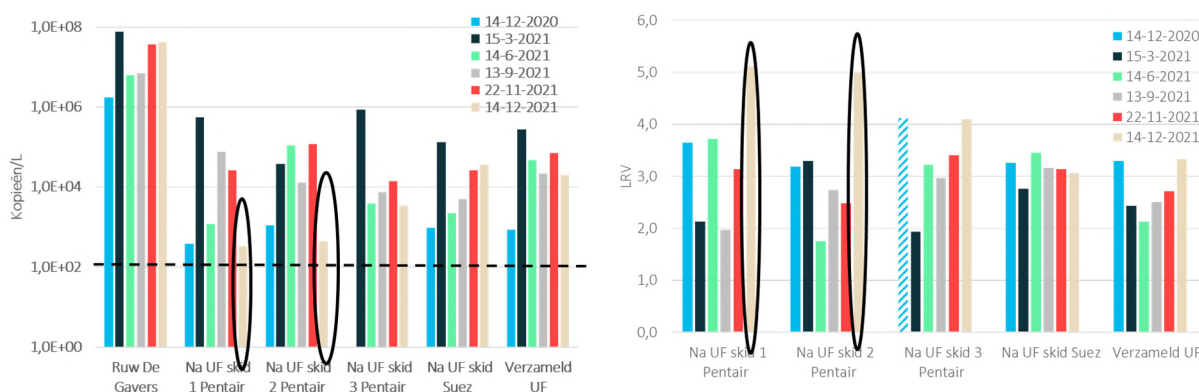


Figuur 4-10. Concentratie van de drie gemeten NV-merkers in het monster Ruw De Gavers tijdens de monstercampagne WPC De Gavers

Alle NV-merkers zijn gemeten in het Ruw De Gavers water (voor de UF). Te zien is dat de concentraties van de NV-merkers in de tijd verschillen. Tijdens de winterperiode zijn de hoogste concentraties NV-merkers aanwezig in het water van De Gavers. Richting de zomer nemen de concentraties af om vervolgens weer te stijgen in het najaar.

Met name NV2247 en NV2314 variëren in concentraties met meer dan een factor 10, terwijl de concentratie NV2247 minder sterk varieert (minder dan een factor 10). Met uitzondering van 14 december 2020 komt de NV2310 in de hoogste concentraties voor in het water van De Gavers.

De resultaten van NV2310 worden in deze paragraaf besproken omdat over het algemeen NV2310 in de hoogste concentraties voorkwam in het Ruw De Gavers water. In Figuur 4-11 zijn de resultaten van de NV2310 metingen weergegeven. Voor een verzameld UF zien we een LRV die varieert tussen 2,1 en 3,3 waarbij de hoogste LRV wordt bereikt in winterperiode (14-12-2020 en 22-11-2021<sup>4</sup>), en de laagste LRV in de zomer (14-6-2021). Dit patroon zien we ongeveer terug voor alle individuele skids. Een verklaring voor deze periode-afhankelijke LRV is moeilijk te geven, en behoeft verder onderzoek. In Bijlage 2 zijn de resultaten van de NV2247 en NV2314 metingen weergegeven.



**Figuur 4-11** Concentratie (links) en LRV NV 2310 ten opzichte van vorige processtap (rechts) NV van UF-praktijkinstallatie van WPC De Gavers tijdens monstercampagne. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekend LRV >. Omcirkelde balken zijn metingen na vervanging membranen.

De resultaten van de meetcampagne van de UF-praktijkinstallatie van WPC De Gavers weergegeven in Figuur 4-11 laten zien dat:

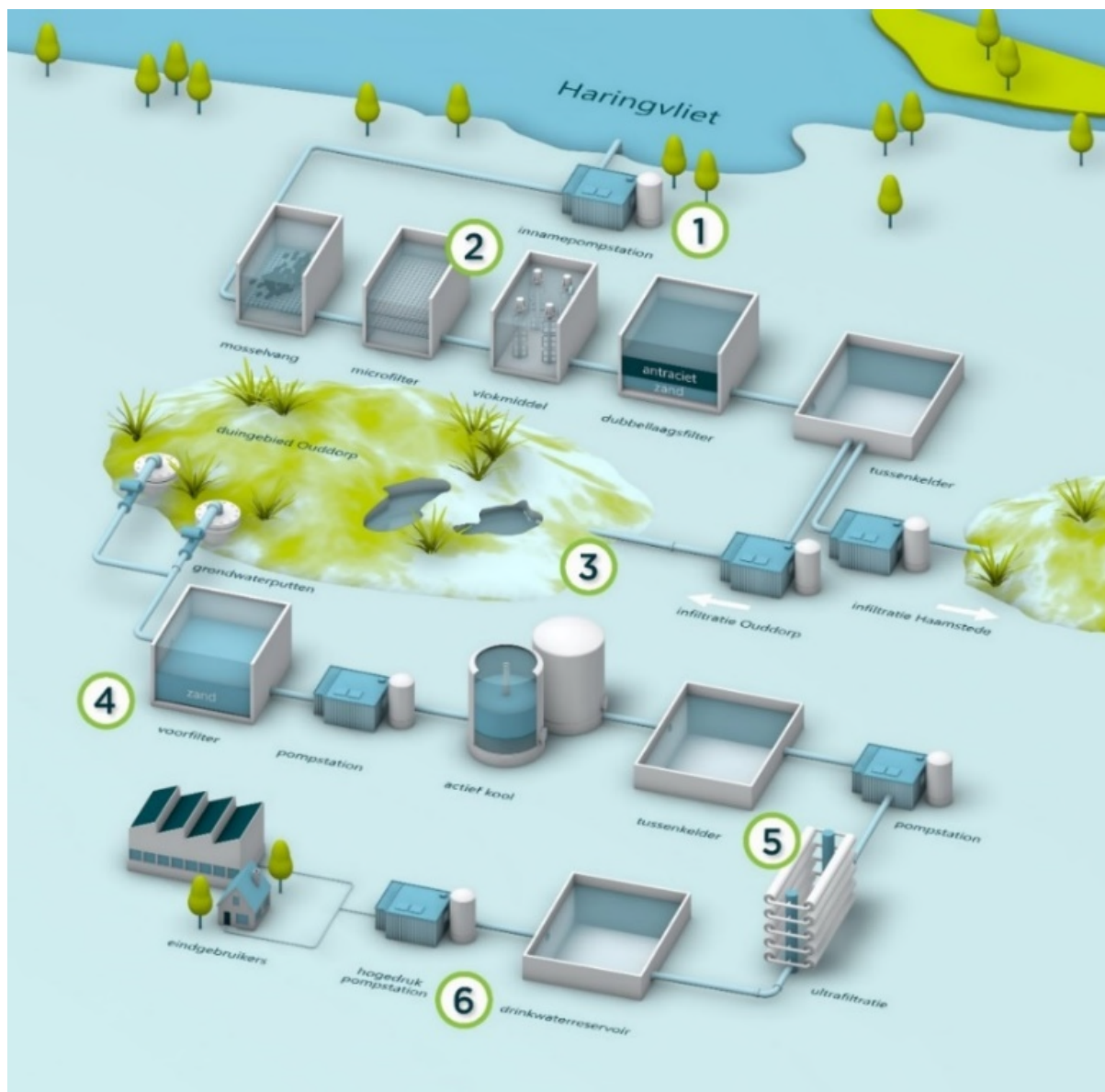
- NV2310 tijdens alle monsters in hoge concentraties ( $1,7 \times 10^6$  -  $7,5 \times 10^7$  Kopieën/L) aanwezig is in het water van De Gavers (voor UF).
- De LRV door de UF skids met Pentair membranen tussen de 1,8 – 4,1 ligt tijdens de verschillende monsternamemomenten.
- De LRV door de UF skid met Suez membranen tussen de 2,8 – 3,5 ligt tijdens de verschillende monsternamemomenten.
- De LRV van Pentair en Suez UF membranen vergelijkbaar zijn.
- De LRV van de UF-praktijkinstallatie van WPC De Gavers tussen de 2,1 – 3,3 ligt tijdens de verschillende monsternamemomenten.
- Vervanging van de Pentair membranen in skid 1 en 2 een verbetering van 2 LRV laat zien.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monsternamen in de praktijkinstallatie.

<sup>4</sup> Resultaten 14-12-2021 mogen niet worden meegenomen in de vergelijking van de LRV op de verschillen bemonsteringsdatums omdat de membranen in skid 1 en 2 (pentair membranen) zijn vervangen voor nieuwe membranen.

### 4.3.2 Bepalen membraanintegriteit UF-installatie PS Ouddorp (Evides) met behulp van de NV methode

#### 4.3.2.1 Opzet eerste NV metingen PS Ouddorp

Het zuiveringsschema van PS Ouddorp van Evides is weergegeven in Figuur 4-12. Oppervlaktewater van het Haringvliet (1) wordt gezuiverd door achtereenvolgens mosselvang, microstrainers (2), FeCl<sub>3</sub>-dosering (0,5 – 1,5 mg/L), dubbellaags snelfiltratie, infiltratie (3), (terug)winning van het geïnfiltreerde water en natuurlijk duinwater, FeCl<sub>3</sub>-dosering (0,5 mg/L), beluchting, snelfiltratie (4), actiefkoolfiltratie, UF (5) en opslag in reinwaterkelders (6). Het infiltratiewater en natuurlijk duinwater wordt via verschillen putten omhoog gepompt en bij binnenkomst in de (na)zuivering gemengd.



Figuur 4-12 Zuiveringsschema Ps Ouddorp (<https://www.evides.nl/drinkwater/de-zuiveringsprocessen>)

De UF-installatie bestaat uit 4 skids (12 drukbuizen en 4 modules per drukbuis). Eind 2019 zijn de 18 jaar oude membranen (Norit X-Flow S-225, geplaatst in maart 2001) vervangen door nieuwe (Pentair Xiga 40), wat een unieke kans was om de invloed van veroudering op de membraanintegriteit te bestuderen. De specificaties van beide membranen worden gegeven in Tabel 4-8.

Tabel 4-8 Membraanspecificaties membranen voor en na vervanging membraanmodules

Type	Skids	Aantal drukbuizen per skid	Aantal Membranen per drukbuis	Totaal aantal membranen	membraan oppervlakte (element/totaal) (m <sup>2</sup> )	MWCO (kDa)	Poriëngrootte (nm)	interne diameter (mm)
Norit X-Flow S-225	4	12	4	192	35 / 6720	150 - 200	25	0,8
Pentair Xiga 40	4	12	4	192	40 / 7680	150	20	0,8

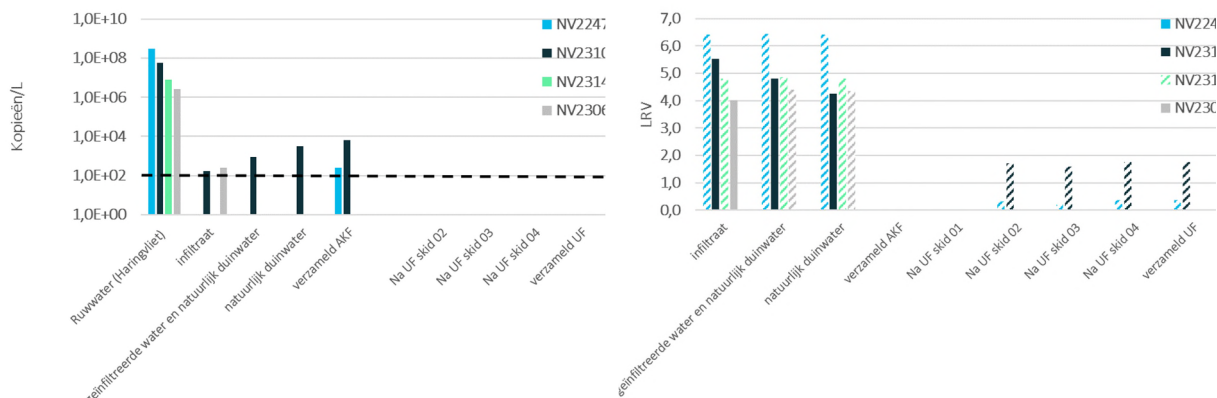
De membranen van skid 4 vervangen in week 45. Vervolgens zijn de membranen van skid 1 op 27 november (week 48) vervangen. De membranen van skid 2 en 3 zijn vervangen in respectievelijk week 50 en 51. Op basis van bovenstaande informatie werd vervolgens besloten om op 26 november (wk 48) en 3 december (wk 49) monsters te nemen om de NV-merkers te analyseren na de verschillende zuiveringsstappen om een beeld te krijgen van de NV-verwijdering voor de verschillende zuiveringsstappen, en of er voldoende NV aanwezig zijn in de bron (Haringvliet) en voor de UF. In Tabel 4-9 is een overzicht van de monsternamenpunten voor NV analyses in de zuivering van PS Ouddorp gegeven. Van alle monsters zijn de merkers NV2247, NV2310, NV2314 en NV2306 geanalyseerd.

Tabel 4-9 monsterpunten voor NV analyses zuivering PS Ouddorp op 26 november en 3 december 2019

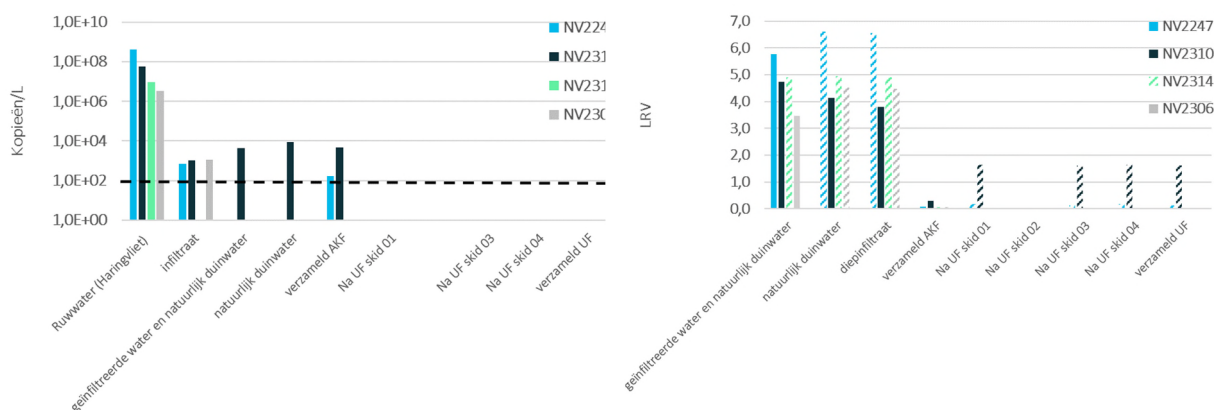
Codering	Opmerkingen
Ruw water (Haringvliet)	Monster m.b.v. chemicaliënpomp genomen
Infiltraat	
geïnfiltreerde water en natuurlijk duinwater	
natuurlijk duinwater	
Verzameld AKF	AKF filtraat 1-6 voor desinfectie, OUD
Na UF skid 01	
Na UF skid 02	
Na UF skid 03	
Na UF skid 04	
Na UF verzameld	Verzameld UF permeaat, OUD

4.3.2.2 Resultaten eerste NV metingen PS Ouddorp

Op 26 november was het niet mogelijk om een monsternamen van skid 1 uit te voeren omdat deze uitgeschakeld was ter voorbereiding op het vervangen van membranen op 27 november. Op 3 december was het niet mogelijk om monsternamen van skid 2 uit te voeren omdat deze uitgeschakeld was ter voorbereiding op het vervangen van membranen. In Figuur 4-13 zijn de resultaten van de analyses op NV-merkers weergegeven.







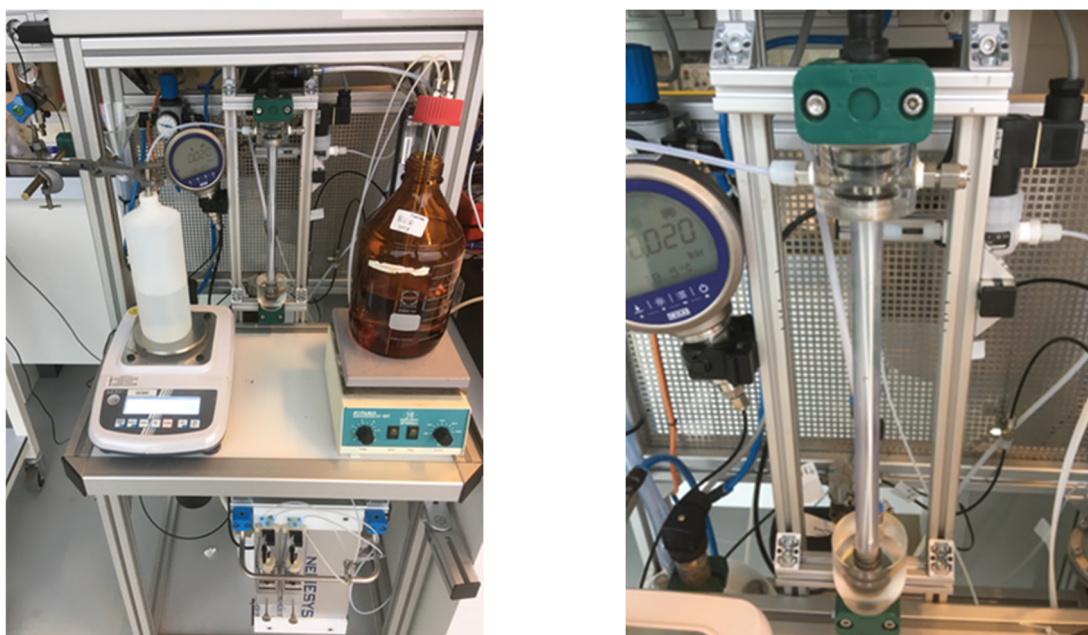
Figuur 4-13 Concentratie (links) en LRV ten opzichte van vorige processtap (rechts) NV van de UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp tijdens eerste metingen op 26 november (boven) en 3 december (onder) 2019. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekent LRV >. Op 26 november skid 01 buiten bedrijf en op 3 december skid 02.

Uit de resultaten van de eerste analyses op NV-merkers van de UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp weergegeven in Figuur 4-13 blijkt dat:

- Alle geanalyseerde NV-merkers in hoge concentraties ( $2,7 \times 10^6$  -  $4,0 \times 10^8$  kopieën/L) aanwezig zijn in de geanalyseerde monsters van het Haringvliet (innamepunt).
- NV2247 in de hoogste concentraties aanwezig is de monsters van het Haringvliet namelijk  $4 \times 10^8$  kopieën/L (8,6 log).
- Bijna alle NV-merkers worden afgevangen tijdens de infiltratiestap, de concentraties zijn sterk afgenomen en NV2314 en NV2306 worden niet meer boven de detectiegrens aangetroffen na AKF.
- Na de UF zijn geen van de geanalyseerde NV-merkers meer boven de detectielimiet teruggevonden.
- Alleen NV2247 en NV2310 zijn nog boven de detectielimiet aanwezig in de voeding (verzameld AKF) voor de UF, al zijn de concentraties laag. Hierdoor kan slechts een LRV van maximaal 1,8 door de UF worden bepaald.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

#### 4.3.2.3 Opzet laboratoriumtesten invloed membraanveroudering op LRV met nieuwe vezels met oude vezels PS Ouddorp

Omdat de NV-merker concentraties na infiltratie sterk zijn verminderd (paragraaf 4.3.2.2) bleek het niet mogelijk om de invloed van het vervangen van de UF-membranen op de membraanintegriteit te bepalen bij PS Ouddorp. Daarom is extra onderzoek uitgevoerd waarbij op labschaal is gekeken naar de invloed van de vervanging van de UF-membranen, na 18 jaar, op de membraanintegriteit. Hiervoor is gebruik gemaakt van vezels afkomstig uit een 18 jaar oude Norit X-Flow S-225 UF membraanmodule (oude vezels) en een nieuwe Pentair Xiga UF-membraanmodule (virgin). Van beide type membraanvezels zijn modules gemaakt met 4 vezels met een lengte van 37,5 cm en een nominale interne diameter van 0,083 cm. De modules zijn vervolgens getest met behulp van de bij KWR aanwezige mini-UF. Foto's van de mini-UF en module zijn weergegeven in Figuur 4-14.



Figuur 4-14 Links mini-UF van KWR. Rechts module met 4 vezels.

Testen zijn uitgevoerd in dead-end filtratie mode bij een flux van 100 L/m<sup>2</sup>\*uur. Als voeding is Lekkanaal water gebruikt afkomstig voor de inlaat van de WRK in Nieuwegein (achter het KWR gebouw). De testen zijn volgens het onderstaande protocol uitgevoerd:

1. Eerst is de module gedurende 30 minuten gespoeld met Ultrapure water in filtratiemode.
2. Vervolgens is de SchoonWaterFlux (SWF) gedurende 10 minuten bepaald.
3. Daarna is de filtratietest met Lekkanaalwater uitgevoerd. Eerst is gedurende 30 minuten het permeaat weggegooid (om ervoor te zorgen dat het permeaat dat zich in de module bevindt minstens driemaal is ververs).
4. Vervolgens zijn gedurende 2 uur (500 ml) monsters genomen voor de analyse van NV-merkers.
5. Aan het einde van de monstername is de troebelheid van de voeding en permeaat gemeten.

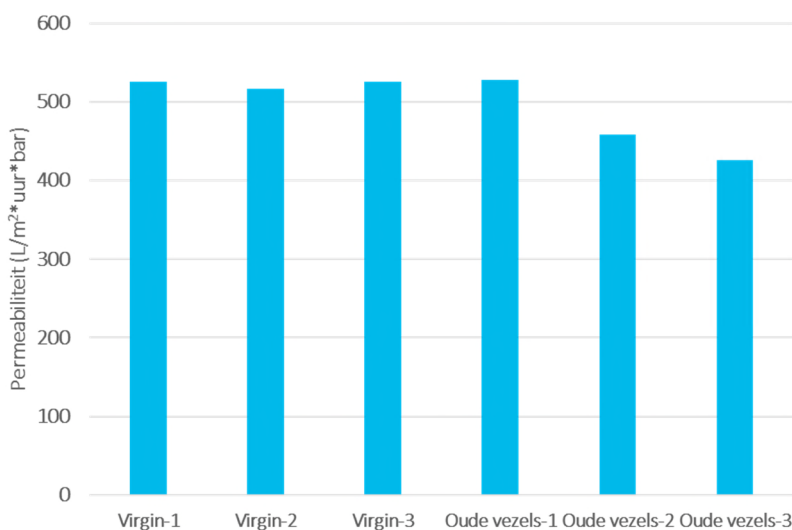
Meer details over de uitvoering van de SWF en de daarvoor gebruikte formules worden gegeven in paragraaf 4.2.1.1. De testen zijn uitgevoerd in de periode 20 oktober tot en met 27 oktober 2020. Op elke testdag is steeds één keer de voeding (lekkanaalwater) en één of meerdere modules bemonsterd om de NV-analyse op uit te voeren (NV2247, NV2310, NV2314). In totaal zijn drie virgin modules en drie modules met oude vezels getest. In Tabel 4-10 is een overzicht gegeven van welke modules op welke datum zijn getest.

Tabel 4-10 Overzicht laboratoriumtesten invloed membraanveroudering op LRV met nieuwe vezels met oude vezels PS Ouddorp

Datum	
20-10-2020	Virgin 1 + 2
21-10-2020	Oude vezels-1
27-10-2020	Oude vezels-2, Virgin 3
28-10-2020	Oude vezels-3

#### 4.3.2.4 Resultaten laboratoriumtesten invloed membraanveroudering op LRV met nieuwe vezels met oude vezels PS Ouddorp

In eerste instantie is voor al de geteste modules de SWF gemeten, de resultaten zijn weergegeven in Figuur 4-15.

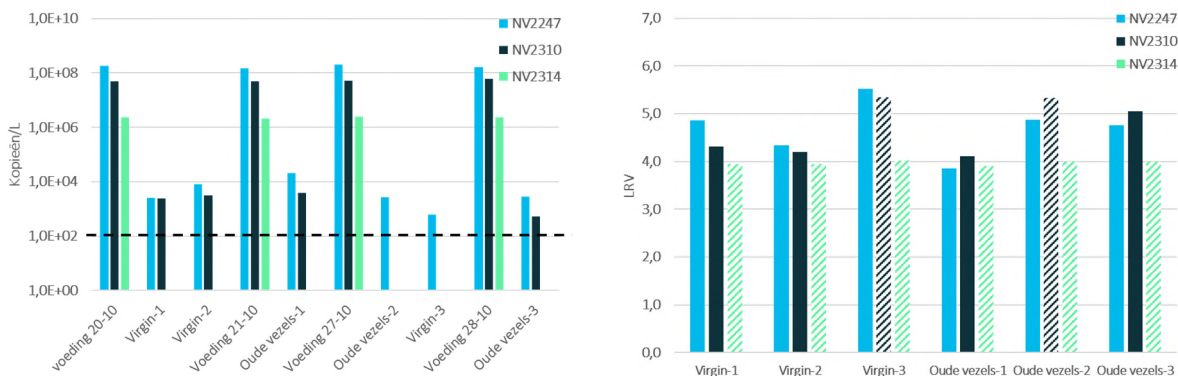


Figuur 4-15 SWF modules tijdens laboratoriumtesten vergelijking nieuwe en 18 jaar oude UF-membraanvezels

Uit de resultaten is te zien dat:

- De gemeten permeabiliteit van de virgin modules  $523 \pm 2$  L/m²\*uur\*bar is.
- De gemeten permeabiliteit van de 18 jaar oude vezels  $471 \pm 41$  L/m²\*uur\*bar is.
- De permeabiliteitsdaling 10% in 18 jaar is.

De troebelheid van het voedingswater is gemeten op  $11,2 \pm 1,6$  FNU. De troebelheid in het permeaat is in alle gevallen  $< 0,1$  FNE. In Figuur 4-16 zijn de resultaten van de analyses op de NV-merkers weergegeven.



Figuur 4-16 Concentratie (links) en LRV (rechts) virgin en 18 jaar oude UF-vezels tijdens mini-UF testen. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekent LRV >.

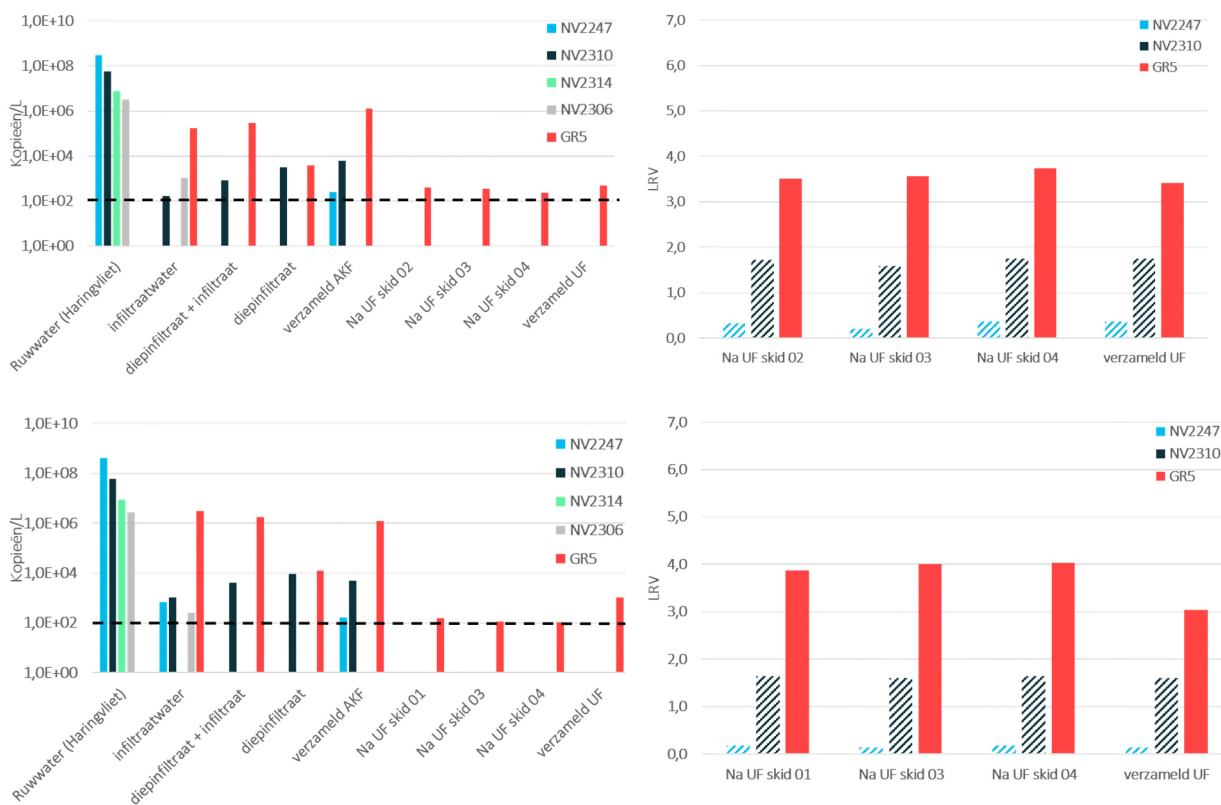
Uit de resultaten van de NV metingen tijdens de laboratoriumtesten waarbij nieuwe (virgin) vezels werden vergeleken met 18 jaar oude vezels weergegeven in Figuur 4-16 blijkt dat:

- De gemeten LRV van de virgin modules  $4,9 \pm 0,6$  is.
- De gemeten LRV van de 18 jaar oude vezels  $4,5 \pm 0,6$  is.
- Er geen significant verschil in LRV is tussen de nieuwe (virgin) en 18 jaar oude vezels.
- De troebelheid gemeten in alle monsters na UF kleiner dan de detectiegrens ( $< 0,1$  FNE) is gemeten.
- De concentratie NV-merkers in het voedingswater in de geteste monsters zeer stabiel is gebleven.
- NV2247 in al de permeaatmonsters is teruggemeten waardoor de LRV accuraat kon worden bepaald. NV2310 is in de monsters van 27-10 niet boven de detectiegrens gemeten. NV2314 is in geen van de permeaatmonsters teruggemeten.

4.3.2.5 Metingen PS Ouddorp herhaald met nieuwe NV-merker

Het bepalen van de LRV van de UF-stap op PS Ouddorp aan de hand van de NV-merkers voor oppervlaktewater bleek niet effectief omdat de concentraties van de NV-merkers na de infiltratiestap al vergaand zijn verwijderd. Hierdoor is het niet mogelijk een hoge LRV van de UF-stap te bepalen en is een LRV van maximaal 1,8 bepaald. Als gevolg hiervan kon het effect van de vervanging van de membranen van skid 4 (week 45) en skid 1 (week 48) ook niet worden bepaald.

Gedurende het project is een nieuwe NV-merker (GR5) ontwikkeld specifiek vanuit het grondwater na infiltratie van PS Ouddorp (zie paragraaf 2.2). Omdat deze nieuwe NV-merker na infiltratie nog in hoge concentraties aanwezig is in het water, is de verwachting dat een hogere LRV kan worden bepaald door deze te analyseren in plaats van de NV-merkers voor oppervlaktewater. Zoals eerder omschreven in paragraaf 2.1.3 zijn de DNA-extracten van alle watermonsters bewaard gebleven waardoor het mogelijk is deze retrospectief te analyseren op nieuwe NV-merkers. Toen de nieuwe NV-merker GR5 eenmaal beschikbaar was, zijn de DNA-extracten van PS Ouddorp opnieuw geanalyseerd om de concentraties GR5 hierin te bepalen. De resultaten staan weergegeven in Figuur 4-17, hierin zijn ook de eerdere resultaten van de NV-merkers voor oppervlaktewater meegenomen ter vergelijking.



Figuur 4-17 Concentratie (links) en LRV ten opzichte van vorige processtap (rechts) van de UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp van alle gemeten NV-merkers tijdens de eerste metingen op 26 november (boven) en 3 december (onder) 2019. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie met uitzondering van GR5 deze dient nog te worden bepaald. Gearceerde balken rechts betekent LRV >. Op 26 november is skid 01 buiten bedrijf en op 3 december skid 02.

De resultaten laten zien dat:

- De NV-merkers voor oppervlaktewater in hoge concentraties aanwezig zijn in het water van het Haringvliet ( $2,7 \times 10^5$  -  $4,0 \times 10^8$  kopieën/L), maar dat de concentratie na infiltratie laag zijn (of beneden detectielimiet).
- De NV-merker GR5 voor grondwater niet boven de detectielimiet is aangetoond in het water van het Haringvliet, maar wel in hoge concentraties aanwezig is in het water na infiltratie ( $1 \times 10^6$  kopieën/L; 6 log).

- Na de UF-stap de nieuwe GR5 NV-merker nog boven detectielimiet is gemeten, terwijl de NV-merkers voor oppervlaktewater niet meer worden teruggevonden boven de detectielimiet.
- Een LRV van maximaal 1,8 voor de UF-stap te bepalen is aan de hand van de NV-merkers voor oppervlaktewater (NV2247 en NV 2310).
- Een LRV van 3,5-4,0 is bepaald voor de verschillende skids aan de hand van de nieuwe NV-merker GR5 en een LRV van 3,4 (26 november) en 3,0 (3 december) is bepaald voor het verzameld UF-permeaat.
- Geen hogere LRV is bepaald voor de nieuwe membranen ten opzichte van de oude membranen, de LRV is min of meer gelijk gebleven.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monsternamen.

#### 4.3.2.6 Grootvolume monsters voor meetcampagne PS Ouddorp

Zoals hierboven reeds omschreven zijn de concentraties van de NV-merkers voor oppervlaktewater na infiltratie te laag gebleken om een accurate LRV van de UF-stap te kunnen bepalen (paragraaf 3.2.3.2). Om de detectiegrens van de methode te verlagen zijn daarom grootvolumemonsters geconcentreerd voor analyse van de NV-merkers (zie paragraaf 2.1.3) tijdens de monstercampagne op deze locatie. Met deze methode worden aanwezige NV-merkers vergaand geconcentreerd waardoor ze mogelijk ook na de UF-stap nog boven de detectielimiet van de analyse kunnen worden aangetoond. Grootvolume monsters zijn genomen op de volgende punten:

- 20 L van het verzameld AKF (voor UF),
- 100 L na de vier UF skids en van het verzameld UF-permeaat.

De monsters zijn geanalyseerd op de NV-merkers voor oppervlaktewater (NV2247, NV2310 en NV2314) en retrospectief voor de nieuwe NV-merker GR5 voor grondwater. In Tabel 4-11 is een overzicht gegeven van de monsterpunten, de datums van monsternamen en de geanalyseerde NV-merkers tijdens de monsternamencampagne bij PS Ouddorp.

Tabel 4-11 Gegevens monstercampagne PS Ouddorp

Monsterpunten	Monsterdatum	NV-merker
Verzameld AKF (voor UF)	7_8-7-2021	NV2247
Na UF skid 01	6-9-2021	NV2310
Na UF skid 02	8-12-2021	NV2314
Na UF skid 03		GR5
Na UF skid 04		
Verzameld UF		

#### 4.3.2.7 Resultaten monstercampagne PS Ouddorp

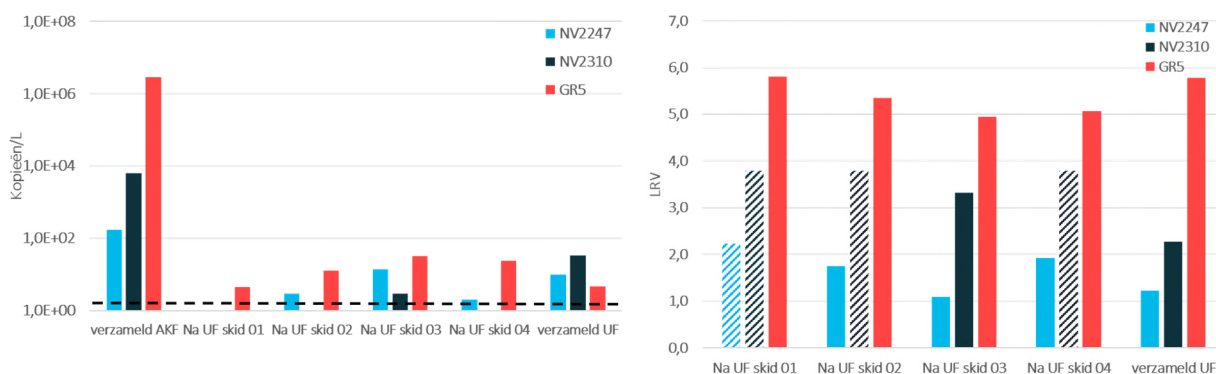
De monsternamencampagne op PS Ouddorp vond plaats van 7 juli tot en met 8 december 2021. Voor alle monsters zijn grootvolumemonsters genomen en geanalyseerd op de NV-merkers NV2247, NV2310 en NV2314 geanalyseerd. Retrospectief zijn de DNA-extracten van de watermonsters ook geanalyseerd op de nieuwe NV-merker GR5 voor grondwater. In Tabel 4-12 zijn de gemeten concentraties van de verschillende NV-merkers in het 'verzameld AKF' weergegeven tijdens de monstercampagne van PS Ouddorp.

Tabel 4-12 NV concentraties verzameld AKF (voor UF) tijdens de monstercampagne PS Ouddorp

Datum	NV-merker (kopieën/L)			
	NV2247	NV2310	NV2314	GR5
7_8-7-2021	$7,2 \times 10^1$	$2,5 \times 10^3$	$6,0 \times 10^0$	$2,7 \times 10^6$
6-9-2021	$2,7 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^5$
8-12-2021	$1,7 \times 10^2$	$6,2 \times 10^3$	$2,9 \times 10^1$	$2,8 \times 10^6$

Al de NV-merkers zijn gedetecteerd in het verzameld AKF (voor de UF). De concentraties van NV2314 zijn echter dermate laag dat deze niet zijn meegenomen in de berekeningen van de LRV. De concentraties van de NV-merkers

fluctueren in de verschillende monsters, al heeft dit geen effect gehad op de bepaalde LRV en de trends hierin. Opvallend is dat tijdens de eerste monsternameronde in juli 2021 de LRV voor NV2247 negatief uitvalt (zie Bijlage 4, Figuur B3-3). Echter, doordat de concentraties NV2247 gemeten na UF skid 4 vrij hoog zijn ( $1 \times 10^4$  kopieën/L) en daarmee hoger dan gemeten in AKF verzameld tot nu toe, bestaat het vermoeden dat het hier gaat om een analysefout en worden de resultaten voor NV2247 van deze ronde buiten beschouwing gelaten. De resultaten van 8 december 2021 worden in deze paragraaf besproken en weergegeven in Figuur 4-18. In Bijlage 3 zijn de resultaten van de 7 juli en 6 september 2021 weergegeven.

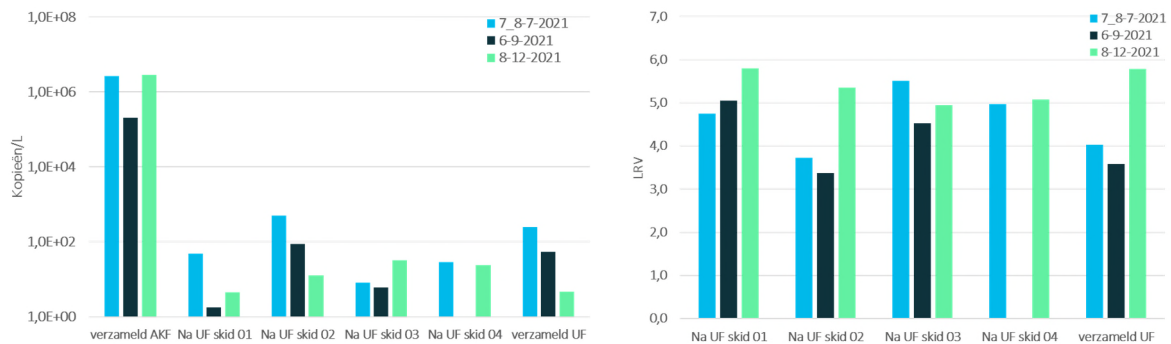


*Figuur 4-18 Concentratie (links) en LRV van alle gemeten merkers ten opzichte van vorige processtap (rechts) van de UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp tijdens monstercampagne 8-12-2021. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekent LRV >.*

De resultaten van de meetcampagne op 8 november 2021 van de UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp weergegeven in Figuur 4-18 laten het volgende zien:

- Al de NV-merkers in het verzameld AKF zijn in concentraties boven de detectielimiet aangetoond, dit geldt ook voor de meetrondes in juli en september.
- De NV-merker GR5 is in de hoogste concentraties aanwezig in het verzameld AKF ( $2,8 \times 10^6$  -  $7,5 \times 10^7$  kopieën/L), dit geldt ook voor de meetrondes in juli en september.
- NV2247 wordt minder goed verwijderd door de UF-stap dan NV2310 en GR5.
- GR5 wordt het beste verwijderd (LRV NV2247 < NV2310 < GR5).
- De berekende LRV voor GR5 van de individuele skids ligt tussen de 4,9 en 5,8.
- De berekende LRV voor GR5 van het verzameld UF is 5,8.
- Door grootvolume watermonsters in behandeling te nemen het mogelijk is de membraanintegriteit (LRV) met behulp van NV-merker GR5 te bepalen. Voor een aantal monsters was dit ook mogelijk met de NV-merkers voor oppervlaktewater (NV2247 en NV2310) waar dit eerst niet mogelijk was. Dit geldt ook voor de meetrondes in juli en in september.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monsternamen.

In Figuur 4-19 zijn de resultaten van GR5 tijdens de monstercampagne van PS Ouddorp weergegeven.



Figuur 4-19 Concentratie (links) en LRV ten opzichte van vorige processtap (rechts) voor NV-merker GR5 van de UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp tijdens monstercampagne. Er is niet gemeten na UF skid 4 op 6 september 2021.

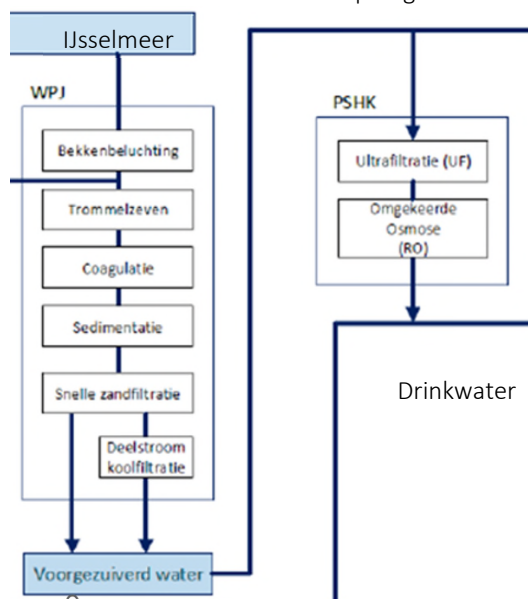
Uit de resultaten van NV-merker GR5 tijdens de meetcampagne van de UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp weergegeven in Figuur 4-19 blijkt dat:

- De LRV door UF skid 01 tussen de 4,7 en 5,8 ligt.
- De LRV door UF skid 02 tussen de 3,4 en 5,4 ligt.
- De LRV door UF skid 03 tussen de 4,5 en 5,5 ligt.
- De LRV door UF skid 04 tussen de 4,9 en 5,1 ligt.
- De LRV door het verzameld UF tussen de 3,6 en 5,8 ligt.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monsternamen.

#### 4.3.3 Bepalen membraanintegriteit UF-installatie WPB Heemskerk (PWN) met behulp van de NV-methode

##### 4.3.3.1 Opzet eerste NV metingen UF-installatie WPB Heemskerk

Bij WPB Heemskerk (PWN) wordt oppervlaktewater gezuiverd (IJsselmeerwater) vanuit Andijk via spaarbekkens (Andijk) gevolgd door de volgende zuiveringsstappen: zeven, vlok-vorming, lamellen-sedimentatie, snelfiltratie en actieve koolfiltratie. Daarna vindt transport naar Heemskerk plaats waarna een deel van het voorgezuiverde water verder wordt behandeld met UF gevolgd door RO. In Figuur 4-20 is alleen het zuiveringsgedeelte van Heemskerk weergegeven met de RO en UF. In deze paragraaf wordt het onderzoek van de UF deel beschreven. Het RO onderzoek wordt beschreven in paragraaf 5.2.1.



Figuur 4-20 Zuiveringschema gedeelte met RO en UF WPB Heemskerk

De UF-installatie bestaat uit 8 skids (blokken). Elke skid bevat 24 drukbuizen en in elke drukbuis zitten 4 modules. In totaal zijn er 768 UF membranen. De installatie is sinds 1999 in gebruik. De installatie bevat Pentair X-flow Xiga-40 UF-membranen. De specificaties van de membranen zijn weergegeven in Tabel 4-13.

Tabel 4-13 Specificaties Pentair X-flow Xiga-40 UF-membraan

Type	Skids	Aantal drukbuizen per skid	Aantal Membranen per drukbuis	Totaal aantal membranen	membraan oppervlakte (element/totaal) (m <sup>2</sup> )	MWCO (kDa)	Poriëngrootte (nm)	interne diameter (mm)
Pentair X-flow Xiga-40	8	24	4	768	40 / 30720	150	20 (15 - 35)	0,8

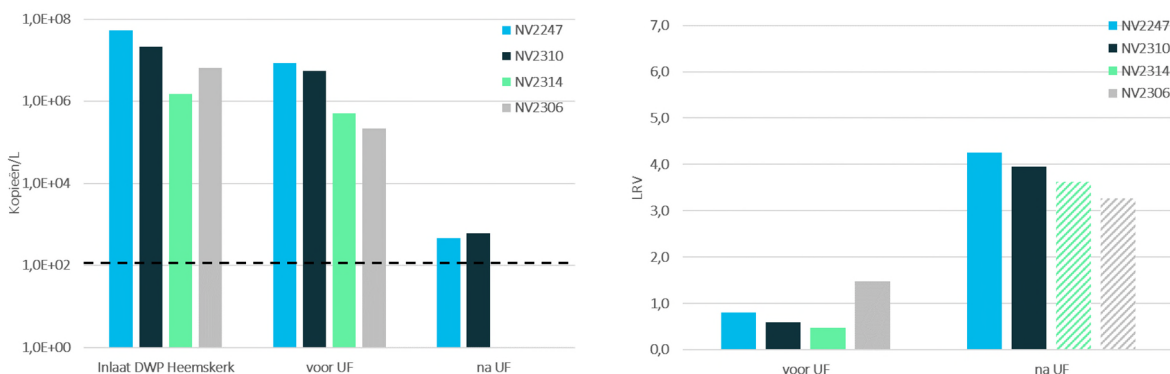
In eerste instantie zijn watermonsters van het ruwe water, het water voor UF en het water na UF geanalyseerd om de concentratie van de NV-merkers voor oppervlaktewater hierin te bepalen. In Tabel 4-14 is een overzicht van de monsterpunten voor NV analyses in de zuivering (inclusief RO) van WPB Heemskerk weergegeven. Van alle monsters zijn de merkers NV2247, NV2310, NV2314 en NV2306 geanalyseerd.

Tabel 4-14 monsterpunten voor NV analyses zuivering DWP Heemskerk (UF en RO)

Codering	Opmerkingen
Inlaat DWP Heemskerk	
Voor UF	
Na UF	Verzameld effluent UF-Installatie
Na RO	Verzameld effluent HF-Installatie

#### 4.3.3.2 Resultaten eerste NV metingen UF-installatie WPB Heemskerk

Monsters van WPB Heemskerk zijn genomen op 17 juni 2020, in Figuur 4-21 zijn de resultaten van de NV metingen weergegeven tot na de UF.



Figuur 4-21 Concentratie (links) en LRV ten opzichte van vorige processtap (rechts) van de NV-merkers van de UF-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk (tot na de UF) tijdens eerste meting op 17 juni 2020. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekenen LRV >.

Uit de resultaten van de eerste NV metingen van de UF-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk weergegeven in Figuur 4-21 blijkt dat:

- Alle geanalyseerde NV-merkers in hoge concentraties ( $6,6 \times 10^5$  -  $5,4 \times 10^7$  kopieën/L) zijn gedetecteerd in het inlaatwater van WPB Heemskerk .
- NV2247 in de hoogste concentraties is gemeten in het inlaatwater van WPB Heemskerk ( $5,4 \times 10^7$  kopieën/L (7,7 log)).
- In het verzamelde effluent na de UF alleen nog NV2247 en NV2310 zijn teruggemeten, NV2314 en NV2306 zijn niet meer boven de detectielimiet aangetoond.



- De LRV door de UF ligt tussen de 3,3 – 4,3 voor de verschillende NV-merkers, waarbij de LRV van NV2314 (3,6) en NV2306 (3,3) ook hoger kunnen liggen omdat deze merkers niet werden terug gemeten na UF.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

#### 4.3.3.3 Opzet monstercampagne UF-installatie WPB Heemskerk

Tijdens de monstercampagne van de UF-installatie op WPB Heemskerk is ervoor gekozen om zowel in de zomer als in de winter een uitgebreide monstername uit te voeren om te beoordelen of de seizoenen een effect hebben op de membraanintegriteit. De membraanintegriteit op WPB Heemskerk wordt ook gemonitord met andere methoden, de verschillende methoden zijn vergeleken met de NV-methode om te beoordelen in hoeverre deze overeenkomen/verschillen.

Naast de continue monitoring van de UF-blokken meet PWN viermaal per jaar de individuele drukbuizen met een gevoelige deeltjesteller (Lighthouse Worldwide Solutions, NanoCount 50+ Liquid Particle Counter) om eventuele lekkage per drukbuis te kunnen meten. De gevoeligere lamsmeting meet 0,05  $\mu\text{m}$  (50nm) en groter. De gemiddelde poriegrootte van de UF is 0,02 $\mu\text{m}$  (20nm). De spreiding van de poriegrootte is tussen de 0,015 $\mu\text{m}$  en 0,035 $\mu\text{m}$ . Indien een drukbuis de norm van 1000 deeltjes overschrijdt, worden de individuele elementen van deze drukbuizen gecontroleerd en gerepareerd.

Monsters zijn genomen op 19 januari (winter) en 1 september (zomer). Naast de door PWN toegepaste deeltjestelling als integriteitsmethode zijn ook de NV-methode (onderste analysegrens 130 - 200 Kopieën/L) en Directe Cel Telling (DCT; onderste analysegrens 600 cel/ml) toegepast om de membraanintegriteit te meten. De volgende monsterpunten zijn bemonsterd: voor UF, zeven individuele UF-drukbuizen en na UF. De selectie van de drukbuizen is gemaakt op basis van de uitkomsten van de deeltjestellingen. Er zijn drukbuizen gekozen die onder, rond en boven de norm (1000 deeltjes) liggen. In Tabel 4-15 zijn de geselecteerde drukbuizen inclusief het aantal getelde deeltjes weergegeven.

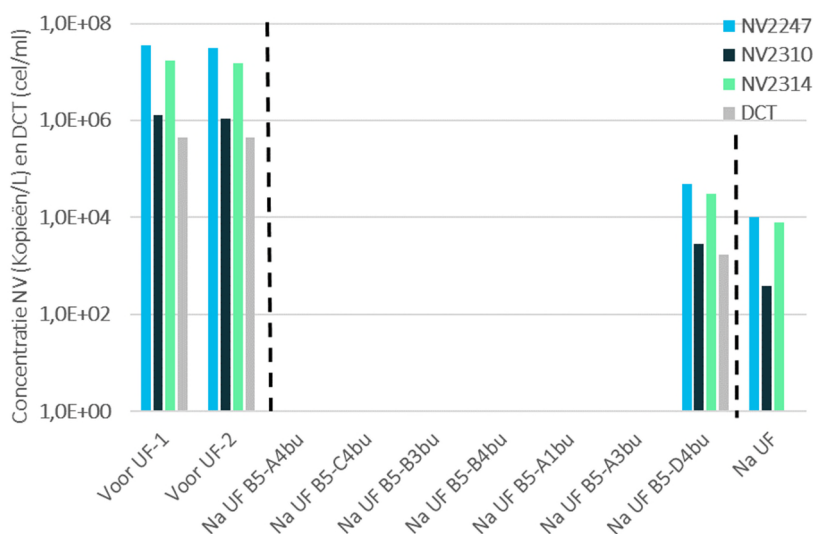
Tabel 4-15 Geselecteerde drukbuizen op basis van deeltjestellingen tijdens monstercampagne WPB Heemskerk

19-1-2021		1-9-2021	
Drukbus	Deeltjes	Drukbus	Deeltjes
Na UF B5-A1bu	312	Na UF B1-B3bi	495
Na UF B5-A3bu	317	Na UF B5-A2bi	881
Na UF B5-A4bu	624	Na UF B3-B2bi	1460
Na UF B5-B3bu	880	Na UF B5-A1bi	2094
Na UF B5-B4bu	1400	Na UF B1-D1bi	2496
Na UF B5-C4bu	2300	Na UF B7-A1bi	2832
Na UF B5-D4bu	4600	Na UF B7-D6bi	2856

#### 4.3.3.4 Resultaten monstercampagne UF-installatie WPB Heemskerk

##### 19 januari 2021 (winter)

De concentraties van de gemeten NV-merkers en de directe cel telling (DCT) in het water voor UF, van de verschillende blokken en na UF, gemeten tijdens de monstername op 19 januari 2021 (winter), zijn weergegeven in Figuur 4-22.



Figuur 4-22 Concentratie van alle gemeten NV-merkers en DCT ten opzichte van vorige processtap van de UF-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk tijdens monstername op 19-1-2021. Onderste analysegrens NV-merkers 130 - 200 Kopieën/L en onderste analysegrens DCT 600 cel/ml.

Vervolgens is de LRV van behandelingsstappen berekend waarbij voor de concentraties voor de UF het gemiddelde van de twee gemeten monsters is genomen. De op basis van de gevonden concentraties berekende LRV zijn weergegeven in

Tabel 4-16. In de tabel zijn tevens de gemeten deeltjes per UF-blok weergegeven.

Tabel 4-16 Berekende LRV verschillende integriteitsmethoden tijdens monstername op 19-1-2021 UF-praktijkinstallatie WPB Heemskerk

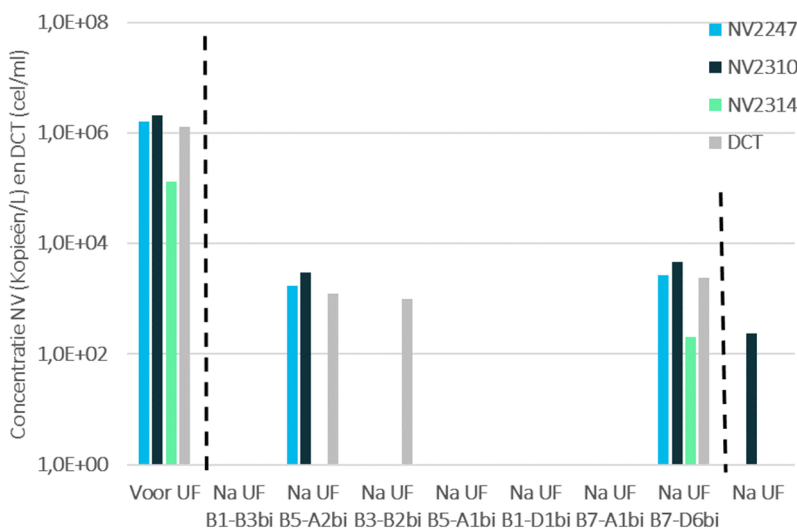
Codering	deeltjes	NV2247	NV2310	NV2314	DCT
		LRV	LRV	LRV	LRV
Na UF B5-A4bu	312	> 5,4	> 4,0	> 5,1	> 2,9
Na UF B5-C4bu	317	> 5,4	> 4,0	> 5,1	> 2,9
Na UF B5-B3bu	624	> 5,4	> 4,0	> 5,1	> 2,9
Na UF B5-B4bu	880	> 5,4	> 4,0	> 5,1	> 2,9
Na UF B5-A1bu	1400	> 5,4	> 4,0	> 5,1	> 2,9
Na UF B5-A3bu	2300	> 5,4	> 4,0	> 5,1	> 2,9
Na UF B5-D4bu	4600	2,8	2,6	2,7	2,4
Na UF		3,5	3,5	3,3	> 2,9

Uit de grafiek (Figuur 4-22) waarin de concentraties van alle gemeten NV-merkers en DCT van de verschillende processtappen en de daaruit volgende LRV ten opzichte van de vorige processtap blijkt dat:

- Ondanks de aanwezigheid van > 1000 deeltjes de maximale aantoonbare LRV werd gehaald, met uitzondering van drukbuis UF B5-D4bu, voor alle toegepaste integriteitsmethoden. Waarbij voor NV2247 een LRV van > 5,4 kon worden aangetoond.
- Bij 4600 deeltjes de LRV bepaald met de NV-merkers en met DCT na UF afneemt en wordt gedetecteerd door alle toegepaste integriteitsmethoden.
- Na UF ook met behulp van de NV-methode een aantoonbare LRV is gevonden voor alle NV-merkers (3,3 – 3,5) terwijl DCT > 2,9 gaf.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

1 september 2021 (zomer)

De concentraties van de gemeten NV-merkers en de directe cel telling voor UF, de verschillende blokken en na UF gemeten tijdens de monstername op 1 september 2021 (zomer) zijn weergegeven in Figuur 4-23.



Figuur 4-23 Concentratie van alle gemeten NV-merkers en DCT ten opzichte van vorige processtap van de UF-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk tijdens monstername op 1-9-2021. Onderste analysegrens NV-merker 130 - 200 Kopieën/L en onderste analysegrens DCT 600 cel/ml.

Vervolgens is de LRV van behandelingsstappen berekend. De op basis van de gevonden concentraties berekende LRV zijn weergegeven in

Tabel 4-17. In de tabel zijn tevens de gemeten deeltjes per UF-blok weergegeven.

Tabel 4-17 Berekende LRV verschillende integriteitsmethoden tijdens monstername op 1-9-2021 UF-praktijkinstallatie WPB Heemskerk

Codering	deeltjes	NV2247	NV2310	NV2314	DCT
		LRV	LRV	LRV	LRV
Na UF B1-B3bi	495	> 4,1	> 4,2	> 3,0	> 3,3
Na UF B5-A2bi	881	3,0	2,8	> 3,0	3
Na UF B3-B2bi	1460	> 4,0	> 4,1	> 2,9	3,1
Na UF B5-A1bi	2094	> 4,1	> 4,2	> 3,0	> 3,3
Na UF B1-D1bi	2496	> 4,1	> 4,2	> 3,0	> 3,3
Na UF B7-A1bi	2832	> 3,9	> 4,1	> 2,9	> 3,3
Na UF B7-D6bi	2856	2,8	2,7	2,8	2,7
Na UF		> 4,0	3,9	> 2,9	> 3,3

Uit de grafiek (Figuur 4-23) waarin de concentraties van alle gemeten NV-merkers en DCT van de verschillende processtappen en de daaruit volgende LRV ten opzichte van de vorige processtap bleek dat:

- Ondanks de aanwezigheid van > 1000 deeltjes de maximale aantoonbare LRV werd gehaald, met uitzondering van drukbuis UF B7-D6bi (allemaal) en UF B3-b2bi (DCT), voor alle toegepaste integriteitsmethoden. Waarbij voor NV2247 een LRV van > 4,2 kon worden aangetoond.
- Bij 2856 deeltjes de NV-merkers en DCT na UF zijn terug gemeten en dat daarmee de LRV ook afneemt tot ongeveer 2,7.
- Bij 881 deeltjes bij drukbuis UF B5-A2bi een LRV van 3,0 werd aangetoond met de NV-merkers (behalve NV2314) en DCT.
- In het verzamelde permeaat na UF ook m.b.v. de NV2310 een aantoonbare LRV (3,9) werd bepaald, de andere NV-merkers en DCT zijn niet terug gemeten en hebben een maximale LRV van >2,9 - >4,0.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

Op basis van de metingen die zijn uitgevoerd in de winter- en de zomerperiode, van 2021, om de integriteit van de UF-installatie en individuele drukbuizen van WPB Heemskerk werden de volgende observaties gedaan:

- In de winter monsters zijn de concentraties NV2247 en NV2310 hoger dan in de zomer monsters. De concentratie NV2310 is in de winter en zomer monsters vrijwel gelijk. Dit komt overeen met de bevindingen op de andere locaties
- In de zomer zijn er meer cel/ml (DCT) aanwezig dan in de winter  $0,5 \cdot 10^6$  cellen/ml vs  $10^6$  cellen/ml
- De hoogste LRV na UF is aangetoond met merkers NV2247 en NV2310
  - Winter > 5,4 en > 5,1
  - Zomer > 4,0 en > 4,2
- Een hogere LRV in de winter t.o.v. de zomer is eerder waargenomen bij WPC De Gavers. Een verklaring is niet gevonden.
- Vanaf 2800 deeltjes lijkt de LRV van een afzonderlijke drukbuis af te nemen en is dit waarneembaar bij zowel de NV als DCT integriteitsmethode.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monsternamen.

## 5 Toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van NF/RO-membranen op lab-, pilot- en praktijkschaal

### 5.1 Onderzoek toepassen NV-methode om integriteit te bepalen van NF/RO-membranen op lab- en pilotschaal

#### 5.1.1 Introductie

De ontwikkelde NV-methode is getest op zowel nieuwe/intacte als beschadigde RO-membranen waarbij is gekeken naar de invloed van (i) membraanbeschadiging en (ii) het effect van chloor en schurende deeltjes op de membraanintegriteit van RO-membranen. Dit is gebeurd op zowel lab/pilot als praktijkschaal om de toepassing van de NV-methode als integriteitsbewaking te verifiëren. Tijdens het lab/pilotonderzoek is er in eerste instantie gekeken naar de invloed van de inzet van het Membraan Test Apparaat (MTA) op de NV-resultaten om de membraanintegriteit te bepalen. Dit onderzoek is gepubliceerd door (Venkataswamy Gowda, Harmsen et al. 2023). In paragraaf 5.1.2 wordt dit onderzoek kort samengevat. Tevens is onderzoek gedaan naar de invloed van schade aan membraanmodules, oxidatieve membraanschade en abrasie schade aan het membraanoppervlak op de membraanintegriteit op bench- en pilotschaal (paragraaf 5.1.3 en 5.1.4). Op dit moment wordt de laatste hand gelegd aan een peer reviewed artikel (Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B) waarin het pilotschaal onderzoek uitgebreid wordt beschreven. Op basis van de artikelen en gegeven presentatie is het lab- en pilot onderzoek in dit rapport beschreven. Meer details zijn terug te vinden in de artikelen en presentatie.

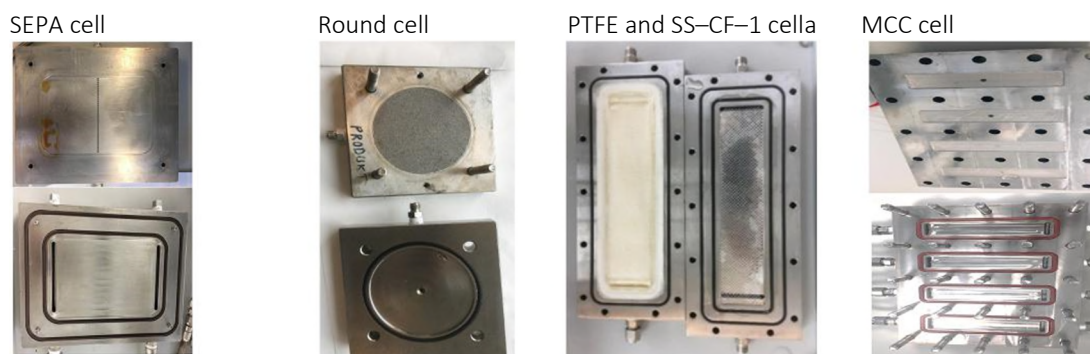
#### 5.1.2 Invloed testcel op resultaten bepalen integriteit RO-membranen

Om de NV-methode te testen op zowel intacte als beschadigde RO-membranen was het plan om ook beschadigingen, direct, op het membraanoppervlak aan te brengen. Hiervoor dienen RO-membraancoupons te worden getest in plaats van RO-modules. Daarom is in eerste instantie gekeken wat de invloed is van testcellen waarin de te testen membraancoupons kunnen worden geplaatst op de bepaling van de membraanintegriteit met behulp van de NV-methode. De integriteit van de membraancoupons is beoordeeld door de passage van NV-merkers en merkers die gevoelig zijn voor fluorescentie te meten. Dit is gebeurd in verschillende type testcellen. Dit onderzoek is reeds gepubliceerd door (Venkataswamy Gowda, Harmsen et al. 2023). Tevens is er een aanbeveling gedaan voor eventuele aanpassingen om de performance van een cel te verbeteren. Dat deel van het gepubliceerde onderzoek dat betrekking heeft op het toepassen van de NV-methode is in deze paragraaf kort samengevat.

De integriteit van membraancoupons van twee type RO-membranen (Filmtec FT-30 van Dow Filmtec en EPSA 2514 van Hydranautics) is getest met behulp van fluorescentie (pyranine en R-WT 20% w/w), de NV-methode (NV2247en NV2310) en geleidbaarheidsmetingen. De resultaten van de fluorescentie data zijn niet in dit rapport uitgewerkt en besproken. De testen zijn uitgevoerd op twee locaties (KWR, Nederland, en de Universiteit van Gent, België) met twee afzonderlijke testsystemen die qua ontwerp vergelijkbaar zijn.

De testen bij KWR zijn uitgevoerd met de zogenaamde MTA-opstelling. Er zijn in totaal vier cellen getest bij KWR i) de commerciële cross-flow cel (SEPA) die normaal gesproken wordt ingezet bij onderzoek op KWR, ii) een ronde RVS testcel, iii) PTFE cross-flow cel (PTFE CF-cel), en iv) RVS cross-flow cel (SS CF-1-cel).

De opstelling van UGent werkt met een meerkanaals cross-flow cel (MCC-cel). Details van de cellen zijn terug te vinden in de paper van (Venkataswamy Gowda, Harmsen et al. 2023). In Figuur 5-1 zijn foto's van de verschillende cellen weergegeven. De testen uitgevoerd in Gent zijn hier verder niet beschreven. De testen bij KWR zijn uitgevoerd met Lekkanaal water afkomstig voor de inlaat van de WRK in Nieuwegein (zie ook paragraaf 4.2.1.1) .

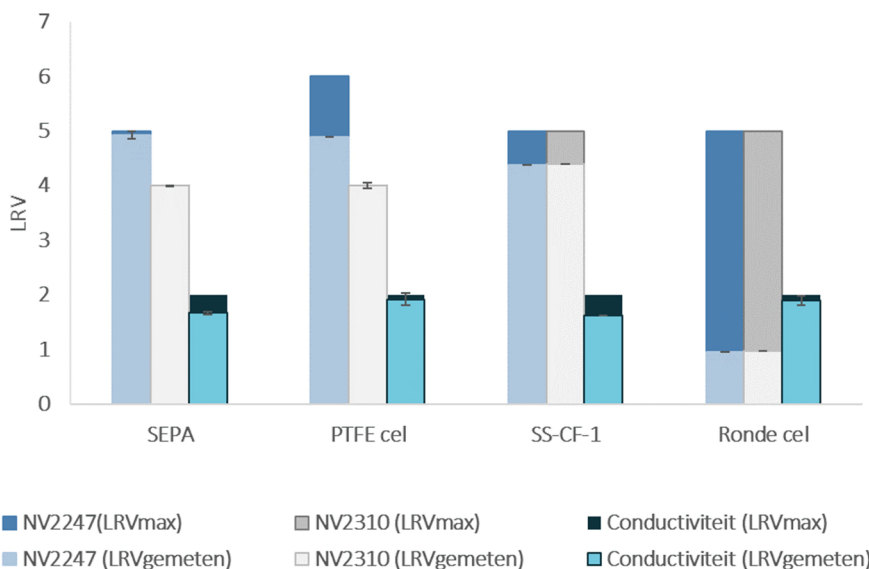


Figuur 5-1 Verschillende cellen die zijn getest tijdens onderzoek (Venkataswamy Gowda, Harmsen et al. 2023)

Voor een test is een nieuwe membraanmodule opengesneden en vervolgens is de membraanenvolp uitgerold. Daarna is een membraancoupon met behulp van een schaar/mesje uit de membraanenvolp genomen en in de cel geplaatst. De cel bestaat uit twee compartimenten (Figuur 5-1), waarbij de voeding, concentraat- en permeaatkanalen in één van de twee delen zijn gefreesd. De membraancoupon wordt in een uitsparing tussen de twee compartimenten geplaatst. De afdichting van de twee compartimenten gebeurt met behulp van O-ringen. Vervolgens worden de twee compartimenten op elkaar geplaatst en samengedrukt met behulp van bouten of een hydraulische systeem. Aan de permeaatzijde van de membraancoupon bevindt zich een permeaatspacer en aan de voedingszijde een voedingsspacer. Door deze constructie komt het membraan direct in contact met de O-ring en de uitsparing waarin het membraan zich bevindt. Hierdoor bestaat de kans dat het membraancoupon wordt beschadigd bij de assemblage van de cel.

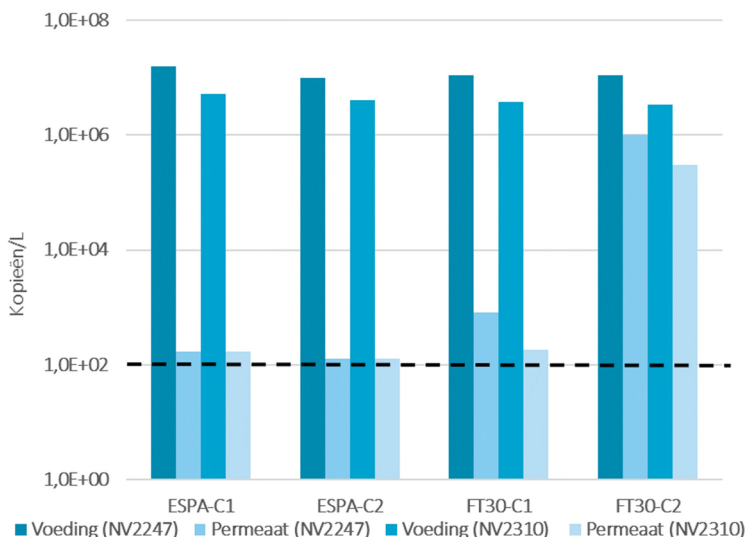
Tijdens de testen zijn de (water)permeabiliteit, in de verschillende testcellen, van de ESPA en FT-30 membraancoupons gemeten. Deze zijn vergelijkbaar met de door de fabrikant opgegeven permeabiliteit. De zoutpassage (NaCl, gemeten als geleidbaarheid) voor de ESPA coupons is in vergelijking met de opgegeven zoutpassage door de fabrikant (0,6 %) vergelijkbaar voor de ronde cel (0,5 %). Voor de andere cellen is een NaCl zoutpassage tussen de 1,8 en 2,2% gemeten wat overeenkomt met een LRV 1,7. Bij de FT-30 coupons ligt de zoutpassage tussen de 2,8 en 3 % (LRV 1,5) voor de verschillende cellen terwijl de fabrikant 0,5% opgeeft.

Ongeacht de concentraties NV-merkers in de voeding is de verwachting dat geen NV-merkers worden teruggevonden in het RO-permeaat. Tijdens bijna al de testen zijn echter NV-merkers gedetecteerd in het permeaat. De LRV bepaald op basis van de concentratie NV-merkers en de geleidbaarheid voor de verschillende cellen, waarin de FT-30 coupons zijn getest, is weergegeven in Figuur 5-2 .



Figuur 5-2 Berekende LRV van de ESPA RO-coupons voor verschillende testcellen, bepaald op basis van geleidbaarheid, en de NV-concentratie (kopieën/L) van NV2247 en NV2310. De donker gekleurde balken geven de maximale aantoonbare LRV weer (afhankelijk van de voedingsconcentratie). De lichter gekleurde balken geven de gemeten LRV.

Alleen bij de testen met de SEPA cel is een LRV vergelijkbaar met de hoogst aantoonbare LRV teruggevonden voor merker NV2247 en NV2310. Bij de PTFE en SS cross-flow cel is een LRV van 5 aangetoond, kanttekening hierbij is dat ook NV-merkers werden aangetoond in het permeaat. De ronde cel presteerde aanzienlijk slechter met een LRV < 1, wat waarschijnlijk het gevolg is van defecten die groot genoeg zijn om virusdeeltjes door te laten. De bevindingen van bovenstaande testen zijn bevestigd in een tweede test waarbij de integriteit van ESPA en FT-30 coupons uitgevoerd in de SEPA cel met elkaar zijn vergeleken. In Figuur 5-3 zijn de NV-concentraties van voeding en permeaat voor de ESPA en FT-30 membraancoupons getest in de SEPA cel weergegeven.



Figuur 5-3 NV-concentratie (kopieën/L) van NV2314 en NV2247 voor ESPA en FT-30 membraancoupons getest in de SEPA cel.

Ook tijdens deze testen zijn NV-merkers gedetecteerd in het permeaat waarbij het permeaat tijdens de testen met FT-30-C2 hoge NV-concentraties bevatten. Het feit dat er NV-merkers zijn teruggevonden in het permeaat is waarschijnlijk toe te schrijven aan mechanische schade van het membraan als gevolg van het op maat maken van het membraancoupon of het plaatsen van de coupon in de cel en het vervolgens sluiten van de cel. Nadat de membranen uit de cel zijn verwijderd is bovenstaande bevestigd. De geteste coupons zijn duidelijk

beschadigd/ingedrukt (Figuur 5-4) op de plekken waar de o-ringen zijn bevestigd of er een overgang is tussen de membraanspacer en de uitsparing (Figuur 5-1) waarin de membraancoupon is geplaatst.



Figuur 5-4 Foto's SEPA (links) en FT-30 (rechts) membraancoupons na testen met SEPA cel

Op basis van de uitgevoerde MTA testen werden de volgens observaties gedaan:

- Tijdens de testen zijn de (water)permeabiliteit, in de verschillende testcellen, van de ESPA en FT-30 membraancoupons gemeten. Deze zijn vergelijkbaar met de door de fabrikant opgegeven permeabiliteit.
- De zoutpassage (NaCl, gemeten als geleidbaarheid) voor de ESPA coupons is in vergelijking met de opgegeven zoutpassage door de fabrikant (0,6 %) vergelijkbaar voor de ronde cel (0,5 %). Voor de andere cellen is een NaCl zoutpassage tussen de 1,8 en 2,2% (LRV 1,7).
- Bij de FT-30 coupons ligt de zoutpassage tussen de 2,8 en 3 % (LRV 1,5) voor de verschillende cellen (fabrikant 0,5%).
- Tijdens bijna al de testen zijn NV-merkers gedetecteerd in het permeaat.
- Het feit dat er NV-merkers zijn teruggevonden in het permeaat is waarschijnlijk toe te schrijven aan mechanische schade van het membraan als gevolg van het op maat maken van het membraancoupon of het plaatsen van de coupon in de cel en het vervolgens sluiten van de cel.
- Alleen bij de testen met de SEPA cel is een LRV vergelijkbaar met de hoogst aantoonbare LRV teruggevonden voor merker NV2247 en NV2310.

Aanpassingen aan de testcel laat een verbetering zien van de membraanperformance. Aangezien dit niet binnen de scope is van het in dit rapport beschreven onderzoek is dit hier niet meegenomen. Voor meer details zie de paper van (Venkataswamy Gowda, Harmsen et al. 2023).

Naar aanleiding van het testcellen onderzoek is besloten om de testen uit te voeren met bench- en pilotschaal installaties en indien nodig alleen gebruik te maken van de SEPA testcel als het niet mogelijk is om testen uit te voeren met spiraalgewonden RO-modules.

### 5.1.3 Invloed membraanbeschadiging op integriteit 2,5'' spiraalgewonden RO-membranen bepaald met behulp van de NV-methode

#### 5.1.3.1 Opzet testen

Om de invloed van (i) membraanbeschadiging en (ii) het effect van chloor en schurende deeltjes te bepalen op de membraanintegriteit van spiraalgewonden (SW) RO-modules zijn testen uitgevoerd met 2,5'' SW RO-modules. Het onderzoek is beschreven in een gepland peer reviewed artikel (Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B). Dat deel van het gepubliceerde onderzoek dat betrekking heeft op het toepassen van de NV-methode is in deze paragraaf kort samengevat.

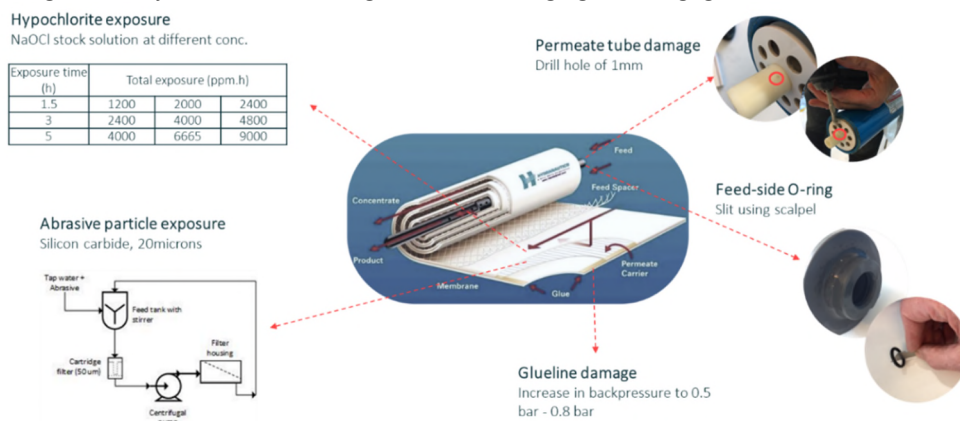


Testen zijn uitgevoerd met de bij KWR beschikbare drie elementenopstelling waarin simultaan drie 2,5'' SW RO-modules kunnen worden getest. Iedere module kan afzonderlijk worden bedreven. Tijdens de in dit onderzoek uitgevoerde testen zijn Trisep TW30 2540 RO-modules, met een membraanoppervlak van 2,6 m<sup>2</sup>, van Dupont getest. Details van de proefopstelling zijn terug te vinden in Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B. Alle testen zijn uitgevoerd bij een voedingsdebiet van 350 L/uur en een constante flux van 50 L/m<sup>2</sup>\*uur. De testen waarbij de integriteit van de verschillende membraanmodules met behulp van de NV-methode zijn bepaald zijn uitgevoerd met Lekkanaal water afkomstig voor de inlaat van de WRK in Nieuwegein.

Er zijn drie type beschadigingen getest:

1. Schade aan membraanmodules (zoals beschadigingen aan O-ringen, lijmranden en schade aan de permeaatbuis (insertion leaks)).
2. Oxidatieve membraanschade (door blootstelling aan hypochloriet tijdens reiniging).
3. Abrasie schade aan het membraanoppervlak (door schurende deeltjes).

In Figuur 5-5 zijn de verschillende geteste beschadigingen weergegeven.



Figuur 5-5 Verschillende geteste beschadigingen tijdens test met 2,5'' SW RO-modules (Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B)

Tijdens de testen zijn de temperatuur, debieten, drukken en het drukverschil over het voedingskanaal continu geregistreerd. Aan de hand van de geregistreerde parameters is vervolgens de permeabiliteit van de modules in de tijd berekend (zie paragraaf 4.2.1.1 voor de gebruikte formules). Op deze manier is een beeld verkregen van de invloed van de beschadigingen op de bedrijfsvoering van de RO-modules. De integriteit van modules is getest met behulp van de NV-methode (NV2247 en NV2310), geleidbaarheid en sulfaatmetingen. Er is gekozen voor sulfaat omdat sulfaat ook wordt toegepast als integriteitsmeting bij de praktijkinstallatie op WPB Heemskerk (PWN). Daarnaast zijn ook surrogaten (pyranine en R-WT 20% w/w) meegenomen als integriteitsmethoden in dit onderzoek. Alleen de resultaten van de analyses met behulp van de NV-methode (NV2247 en NV2310) en de geleidbaarheid en sulfaatmetingen zijn hier beschreven. Verdere details met betrekking tot de resultaten van en discussie over de pyranine en R-WT metingen zijn terug te vinden in Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B.

Voor iedere test is de installatie inclusief het RO-membraan twee dagen gespoeld met drinkwater (Nieuwegein) om eventuele verontreinigingen en conserveringsmiddelen te verwijderen. Vervolgens is de intacte module getest. Eerst met drinkwater om de permeabiliteit en zoutretentie op basis van geleidbaarheid te bepalen. Vervolgens met Lekkanaalwater om de LRV van sulfaat, NV2247 en NV2310 te bepalen. Daarna is weer gespoeld met drinkwater. Vervolgens zijn de desbetreffende beschadigingen aangebracht, is gespoeld met drinkwater gedurende 3 uur en is de test met drinkwater en Lekkanaalwater uitgevoerd.

#### 5.1.3.2 Schade aan membraanmodules

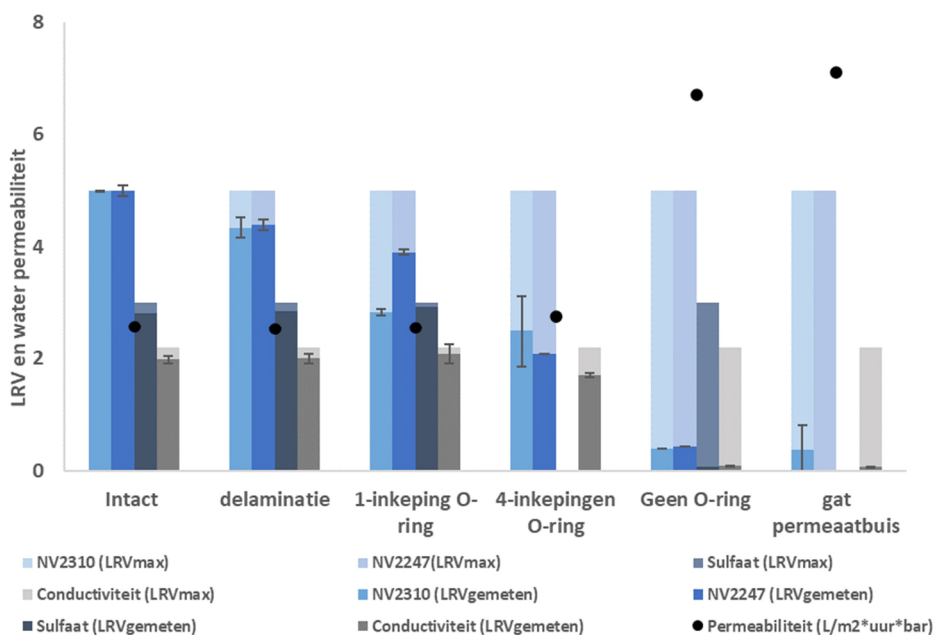
Drie type membraanmoduleschades zijn onderzocht:

1. Beschadiging van O-ringen.

2. Schade aan de permeaatbuis.
3. Beschadiging van de lijmrand (delaminatie).

Met een eerste module zijn testen uitgevoerd waarbij de O-ring (Figuur 5-5) is verwijderd. Daarnaast zijn testen uitgevoerd waarbij met behulp van een rvs scalpel één en vervolgens vier inkepingen van 1 mm in de O-ring zijn aangebracht. Na afloop van de testen met de O-ring is er weer een intacte O-ring teruggeplaatst en is er een gaatje van 1 mm in het uitstekende gedeelte van de permeaatbuis geboord (Figuur 5-5).

Met een tweede module is de invloed van delaminatie van de lijmrand onderzocht. Hiervoor is een tegendruk van 5 bar gecreëerd aan de permeatzijde van het membraan. Na afloop van de test is een autopsie uitgevoerd om de omvang van de delaminatie te controleren. In Figuur 5-6 zijn de resultaten van het onderzoek weergegeven. Voor de intacte module is de gemiddelde genomen van de resultaten van de twee geteste modules.



Figuur 5-6 Berekende permeabiliteit en LRV, bepaald op basis van geleidbaarheid ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), sulfaat ( $\text{mg}/\text{L}$ ) en de concentraties NV-merkers (kopieën/L) van NV2247 en NV2310 voor de verschillende aangebrachte membraanmoduleschades 2,5'' Trisep TW30 RO-module. De licht gekleurde balken geven de maximale aantoonbare LRV weer (afhankelijk van de voedingsconcentratie). De donker gekleurde balken geven de gemeten LRV.

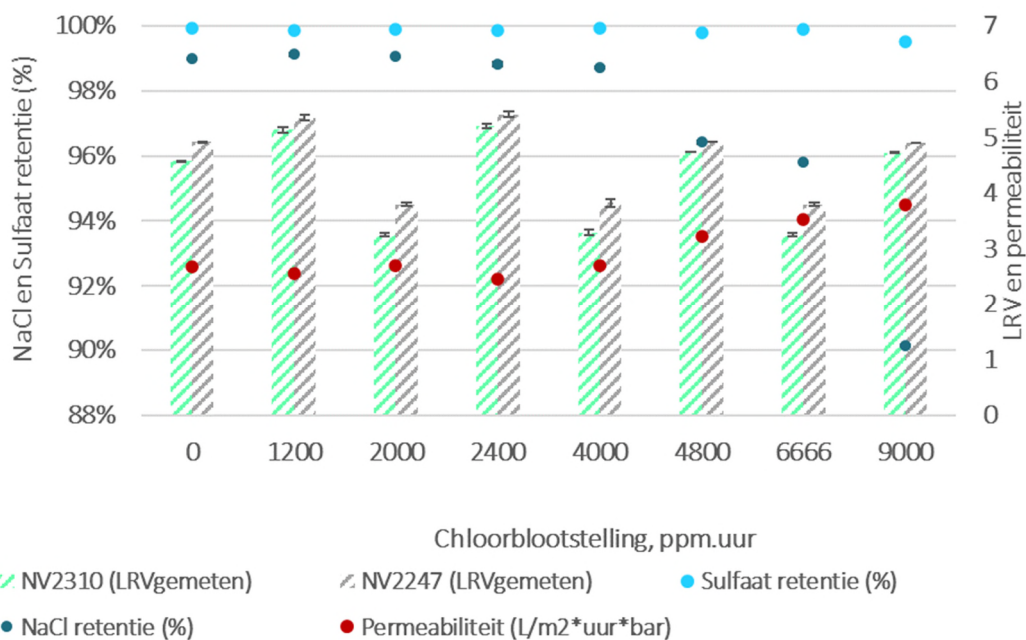
De permeabiliteit van een intacte RO-module is  $2,6 \text{ L}/\text{m}^2 \cdot \text{uur} \cdot \text{bar}$ . De zoutretentie, op basis van de geleidbaarheid, is 99% wat overeenkomt met een LRV van 2. Tijdens de autopsie, na afloop van de testen waarbij een tegendruk van 5 bar op de module is gezet, is delaminatie visueel waargenomen (Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B). Beschadiging van de RO-module als gevolg van delaminatie heeft geen effect op de permeabiliteit ( $2,5 \text{ L}/\text{m}^2 \cdot \text{uur} \cdot \text{bar}$ ) en zoutretentie (99%). Beschadiging als gevolg van het aanbrengen van 1 inkeping in de O-ring heeft geen effect op de permeabiliteit en zoutretentie van de RO-module. De permeabiliteit neemt licht toe bij een beschadiging van vier inkepingen tot  $2,8 \text{ L}/\text{m}^2 \cdot \text{uur} \cdot \text{bar}$ . Het verwijderen van de O-ring resulteert in een sterke permeabiliteitsverhoging tot  $6,7 \text{ L}/\text{m}^2 \cdot \text{uur} \cdot \text{bar}$ . Voor de zoutretentie is een vergelijkbare trend waargenomen. Vier inkepingen laten een verlaging van de zoutretentie van 98% (LRV 1,7) zien. Tijdens de test waarbij de O-ring is verwijderd is de zoutretentie nog maar 17% (LRV 0,1). Beschadiging van de permeaatbuis geeft een vergelijkbaar resultaat als het verwijderen van de O-ring zowel voor de permeabiliteit als voor de zoutretentie. De permeabiliteit is gestegen tot  $7,6 \text{ L}/\text{m}^2 \cdot \text{uur} \cdot \text{bar}$  en de zoutretentie gedaald tot 15% (LRV 0,1).

De LRV van sulfaat door een intacte RO-module is 2,8. De LRV is nagenoeg gelijk aan de maximaal aantoonbare LRV van 3,0. Net als bij de zoutretentie (op basis van geleidbaarheid) blijft de LRV voor de modules met delaminatieschade en schade door 1 inkeping in de O-ring gelijk met de LRV van de intacte module. Het

verwijderen van de O-ring resulteert in een LRV van 0,1 wat overeenkomt met een LRV-daling van 3. Sulfaat is niet gemeten tijdens de test met vier inkepingen in de O-ring en een gat in de permeaatbuis. Met de NV-merkers is voor de intacte RO-module een LRV van >5 bepaald. Vervolgens laten al de aangebrachte beschadigingen een LRV verlaging te zien. Voor NV2247 is de LRV-verlaging 0,6; 1,1; 2,9; 4,6 en 5 voor respectievelijk de modules met delaminatie, 1-inkeping, 4 inkepingen, geen O-ring en gat permeaatbuis als membraanmoduleschade. Voor NV2310 is de LRV 0,7; 2,2; 2,5; 4,6 en 4,6 voor respectievelijk de modules met delaminatie, 1- inkeping, 4 inkepingen, geen O-ring en gat permeaatbuis als membraanmoduleschade.

5.1.3.3 Invloed Oxidatie afbraak op integriteit

De invloed van oxidatieve membraanschade als gevolg van chemische reiniging is onderzocht, uitgevoerd met 5% natriumhypochlorietoplossing. Testen zijn simultaan uitgevoerd op drie 2,5'' RO-modules. De modules zijn blootgesteld aan verschillende chloorconcentraties in de tijd. De testen starten met intacte RO-modules die vervolgens zijn blootgesteld aan concentraties tussen de 1200 en 9000 ppm\*uur. Een blootstelling van 9000 ppm\*uur komt overeen met een continu contacttijd van een membraan met 0,1 ppm vrij chloor gedurende 10 jaar. In Figuur 5-5 zijn de verschillende toegepaste concentraties in de tijd voor de verschillende modules weergegeven. De testen zijn uitgevoerd in recirculatie mode en na iedere chloorblootstelling is de desbetreffende module eerst gespoeld met drinkwater totdat de vrij chloor concentratie < 0,1 mg/L is (titrimetrisch bepaald, zie Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B). Vervolgens zijn de testen met drinkwater (permeabiliteit en zoutretentie) en Lekkanaalwater (LRV sulfaat, NV2247 en NV2310) uitgevoerd. Daarna is de module gedurende 3 uur gespoeld met drinkwater om vervolgens de volgende chloorblootstelling te testen. In Figuur 5-7 zijn de resultaten van het onderzoek weergegeven. Voor de intacte module is de gemiddelde genomen van de resultaten van de drie geteste modules.



Figuur 5-7 Berekende permeabiliteit, zoutretentie bepaald op basis van geleidbaarheid, sulfaat retentie en LRV bepaald op basis van de NV-concentratie (kopieën /L) van NV2247 en NV2310 voor de verschillende aangebrachte chloorblootstellingen 2,5'' Trisep TW30 RO-module. Gearceerde balken betekent LRV >.

In de monsters zijn geen van de NV-merkers teruggevonden in het permeaat wat betekent dat de maximaal aantoonbare LRV steeds is bepaald. De verschillen in LRV voor de NV-merkers bij de intacte RO-modules en de modules waarbij verschillende chloorblootstellingen zijn getest worden veroorzaakt door het feit dat de concentraties NV-merkers in de voeding variëren in de tijd waardoor steeds verschillende maximale LRV worden

aangetoond. De maximale aantoonbare LRV ligt in tussen de 3,8 – 5,4 voor NV2247 en tussen de 3,3 – 5,2 voor NV2310 afhankelijk van de concentratie NV-merkers in de voeding.

De permeabiliteit van een intacte RO-module was 2,7 L/m<sup>2</sup>\*uur\*bar. De zoutretentie, op basis van de geleidbaarheid, was 99% wat overeenkomt met een LRV van 2. Deze zijn vergelijkbaar met de permeabiliteit en zoutretenties die zijn gemeten tijdens de membraanmodulebeschadigingstesten (Figuur 5-6). De permeabiliteit neemt toe vanaf een chloorblootstelling van 4800 ppm\*uur (3,2 L/m<sup>2</sup>\*uur\*bar). Bij een chloorblootstelling van 9000 ppm\*uur is de permeabiliteit gestegen tot 3,8 L/m<sup>2</sup>\*uur\*bar). De zoutretentie neemt af vanaf een chloorblootstelling van 4800 ppm\*uur (96,4%) en daalt verder tot een retentie van 90,1 % (LRV 1) bij een chloorblootstelling van 9000 ppm\*uur. De retentie van sulfaat voor een intacte RO-module is 99,9 % (LRV 3). Pas bij een chloorblootstelling van 9000 ppm\*uur is een lagere sulfaatretentie gemeten van 99,5% (LRV 2,3).

#### 5.1.3.4 Invloed schurende deeltjes

De invloed van schurende deeltjes (Figuur 5-5) is onderzocht door een slurry van 1 w/w% 20 µm siliciumcarbide (SIC) in drinkwater gedurende 4 uur met behulp van recirculatie over een RO-module te leiden. Hierbij is met tussenposes lucht toegevoegd om het schurende effect op het membraanoppervlak te vergroten. Vervolgens is de module gedurende 1 dag gespoeld met drinkwater om de deeltjes te verwijderen. Daarna zijn de testen met drinkwater (permeabiliteit en zoutretentie) en Lekkanaalwater (LRV sulfaat, NV2247 en NV2310) uitgevoerd. Na afloop is de module gedurende 3 uur gespoeld met drinkwater en is de module onderworpen aan een autopsie om het effect van de schurende deeltjes op het membraanoppervlak te onderzoeken met behulp van Elektronenmicroscopie (SEM). In Tabel 5-1 zijn de resultaten van het onderzoek weergegeven.

Tabel 5-1 Berekende permeabiliteit, zoutretentie bepaald op basis van geleidbaarheid en LRV bepaald op basis van de sulfaat en NV-concentraties (kopieën /L) van NV2247 en NV2310 voor de intacte en met SIC behandelde 2,5'' Trisep TW30 RO-module

Membraan	Permeabiliteit	Zoutretentie			
		sulfaat	NV2247	NV2310	
		(op basis van geleidbaarheid)			
	L/m <sup>2</sup> *uur*bar	%	LRV	LRV	LRV
Intact	2,7	99,0	3,2	> 5,2	> 5,0
Beschadigd door SIC	2,8	98,8	3,0	4,6	4,9

De permeabiliteit van een intacte RO-module is 2,7 L/m<sup>2</sup>\*uur\*bar. De zoutretentie, op basis van de geleidbaarheid, is 99% wat overeenkomt met een LRV van 2. Deze is vergelijkbaar met de permeabiliteit en zoutretenties die zijn gemeten tijdens de membraanmodulebeschadiging- en chloorblootstellingstesten (Figuur 5-6 en Figuur 5-7). Na autopsie van de met SIC behandelde module is bepaald dat SIC (schurende deeltjes) schade aan het membraanoppervlakte heeft veroorzaakt. Dit is terug te zien op de SEM foto's (Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B). Na behandeling met de SIC neemt de permeabiliteit toe met 5 % (Tabel 5-1). De zoutretentie is nagenoeg gelijk.

De LRV voor sulfaat, NV2247 en NV2310 door de intacte RO-module zijn vergelijkbaar met de LRV door intacte modules tijdens de membraanmodulebeschadiging- en chloorblootstellingstesten (Figuur 5-6 en Figuur 5-7). De afname in LRV na behandeling met SIC is voor NV2310 en sulfaat respectievelijk 2 en 6 %. Alleen voor NV2247 is een duidelijke afname van de LRV waar te nemen (12%). Dit leidt tot een LRV-verlaging van 0,5 als gevolg van schurende deeltjes (SIC).

#### 5.1.3.5 Samenvatting onderzoek invloed membraanbeschadiging en reiniging op integriteit 2,5'' spiraalgewonden RO-membranen

Hieronder staan de voornaamste uitkomsten samengevat over het onderzoek waarbij de invloed van membraanbeschadiging, het effect van chloor en schurende deeltjes op de integriteit van 2,5'' spiraalgewonden RO-membranen is onderzocht.

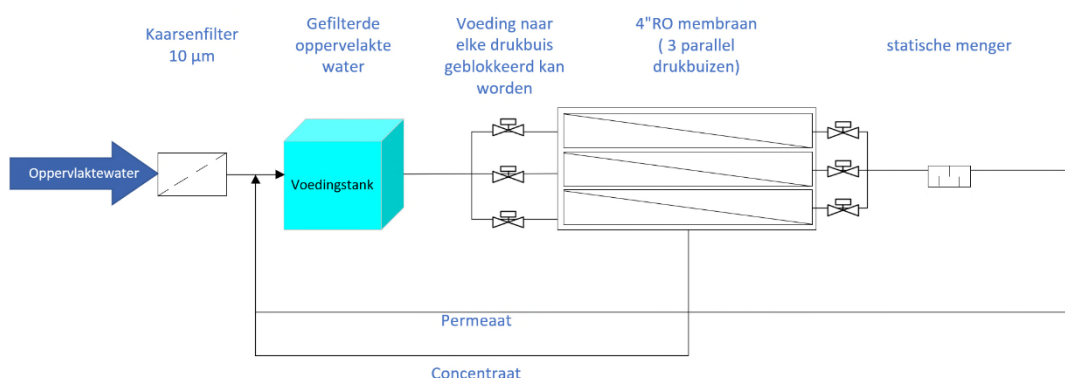
- Tijdens de uitgevoerde testen ligt de permeabiliteit van een intacte RO-module tussen de 2,6 – 2,7 L/m<sup>2</sup>\*uur\*bar en de zoutretentie, op basis van geleidbaarheid, op 99% (LRV 2).
- Over het algemeen kan worden gesteld dat met alle beproefde meetmethoden (permeabiliteit, zoutretentie, sulfaatretentie en LRV met NV2247 en NV2310) met de NV-merkers de hoogste LRV door RO-membranen is aangetoond op pilotschaal.
- Waarbij in alle gevallen, bij het aanbrengen van beschadigingen aan de membraanmodule, de integriteit van de geteste RO-modules lager is zodra er vier inkepingen in de O-ring zijn gemaakt of als de O-ring geheel is verwijderd of er een gat in de permeaatbuis is geboord.
- Delaminatie heeft geen invloed op de membraanintegriteit evenals het maken van 1 inkeping in de O-ring.
- Het effect van blootstelling aan chloor heeft onder de getest condities alleen een negatieve invloed op de permeabiliteit en zoutretentie.
- De sulfaatretentie en LRV van de NV-merkers zijn nauwelijks beïnvloed als gevolg van chloorblootstelling.
- Het aanbrengen van schade door het doseren van SIC (schurende deeltjes) laat alleen een daling van de integriteit zien voor NV2247 (0,5 LRV).

#### 5.1.4 Invloed membraanbeschadiging op integriteit 4" spiraalgewonden RO-membranen bepaald met behulp van de NV-methode

##### 5.1.4.1 Opzet testen

Bij Oasen zijn testen met 4" RO-modules uitgevoerd om de invloed van (i) membraanbeschadiging en (ii) het effect van chloor op de membraanintegriteit van spiraalgewonden SW RO-modules te bepalen. Deze testen zijn eerder uitgevoerd dan de testen met 2,5" SW RO-modules. De resultaten en bevindingen van de testen bij Oasen zijn meegenomen bij het opzetten van het onderzoeksplan voor de 2,5" RO testen. De rapportage (memo) van het onderzoek is terug te vinden in Bijlage 3. In deze paragraaf zijn de resultaten en bevindingen kort samengevat.

Testen zijn uitgevoerd bij Oasen op ZS De Hooge Boom te Kamerik. De testen zijn uitgevoerd op een 4" RO pilot, waarin drie 4 inch membranen parallel zijn geplaatst. De pilot is schematisch weergegeven in Figuur 5-8.



Figuur 5-8 Schematische weergave integriteitsonderzoek RO-pilot op ZS De Hooge Boom (Oasen)

Tijdens de in dit onderzoek uitgevoerde testen zijn Hydranautics ESPA2 LD 4040 RO-modules, met een membraanoppervlak van 7,43 m<sup>2</sup> getest. Alle testen zijn uitgevoerd in recirculatiemodus bij een flux van 15 L/m<sup>2</sup>\*uur en een recovery van 70 – 72 %.

De installatie is gevoed met oppervlaktewater van de Grecht (een weterring die grenst aan het terrein van het zuiveringsstation 'De Hooge Boom'). Voordat het water in het voedingsvat wordt gepompt wordt het eerst gefiltreerd over een 10 µm kaarsenfilter. Gedurende de testperiode is het water gerecirculeerd over de pilot (Figuur 5-8). Aangezien iedere dag metingen en monsternames zijn uitgevoerd is de tank tussentijds bijgevuld met 10 L water om het waterniveau in de voedingsstank constant te houden. Daarnaast is na de eerste test een nieuwe

batch water gebruikt waarmee test 2 tot en met test 5 (Tabel 5-2) zijn uitgevoerd. Monsternamen/metingen zijn uitgevoerd in het voedingsvat en het gezamenlijke permeaat, na statische menging, om een goede menging van het permeaat van de verschillende membranen te garanderen. De geleidbaarheid van de voeding en het gezamenlijke permeaat zijn dagelijks gemeten. Tijdens iedere test zijn monsters voor analyse op de NV-merkers genomen van de voeding en het gezamenlijke permeaat. De volgende merkers zijn geanalyseerd NV2247, NV2310, NV2314 en NV2303.

In totaal zijn 5 testen uitgevoerd. In eerste instantie is een test uitgevoerd met 3 intacte membranen bij een flux van 15 L/m<sup>2</sup>.uur. Daarna is een test (test 2) uitgevoerd met 3 intacte membranen bij een flux van 10 L/m<sup>2</sup>.uur. Tijdens de derde test is de O-ring in de permeatafvoer van de eindkap (Figuur 5-9) van alleen het eerste membraan verwijderd (membraan 2 en 3 zijn intact gebleven). De flux was 15 L/m<sup>2</sup>.uur.



Figuur 5-9 Verwijderen O-ring

Tijdens de vierde test zijn 2 gaatjes van 4 mm met een diepte van 3 cm (Figuur 5-10) in het omhulsel (epoxylaag) van het tweede membraan geboord (membraan 1 en 3 zijn intact gebleven). De flux was 15 L/m<sup>2</sup>.uur.



Figuur 5-10 Gaatjes in membraan 2

Tijdens de vijfde test is aan het begin van de test 2,5 mg/L vrij chloor aan het voedingsvat toegevoegd en over de pilot gerecirculeerd gedurende 22 uur. De test met chloor is alleen uitgevoerd op membraan 1 en 3. De flux was 15 L/m<sup>2</sup>.uur. De proefcondities van de verschillende testen zijn samengevat in Tabel 5-2.

Tabel 5-2- Proefcondities tijdens integriteitsonderzoek Oasen

Test	Flux L/m <sup>2</sup> .uur	EI 1	EI 2	EI 3
1	15	intact	intact	intact
2	10	intact	intact	intact
3	15	Zonder O-ring	intact	intact
4	15	intact	2x 4 mm gaatjes	intact
5	15	Chloorblootstelling	n.v.t.	Chloorblootstelling

#### 5.1.4.2 Resultaten 4'' testen

De resultaten van de testen zijn hieronder beschreven. De bijbehorende figuren zijn terug te vinden in Bijlage 3. De NV-merkers NV2247 en NV2310 komen in de hoogste concentraties voor in het voedingswater ( $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  kopieën/L). De concentraties van de NV-merkers NV2314 en NV2303 in het voedingswater liggen een stuk lager  $1 \times 10^3$  -  $1 \times 10^4$  kopieën/L en zijn daarom niet meegenomen in de uitwerking van de resultaten.

Tijdens de eerste test met 3 intacte membranen zijn er geen NV-merkers teruggevonden in het permeaat en is een maximale LRV aangetoond van > 2,6 voor NV2247 en > 2,4 voor NV2310. Verlaging van de flux van 15 (test 1) naar 10 L/m<sup>2</sup>\*uur (test 2) geeft hetzelfde resultaat, geen NV-merkers zijn teruggevonden in het permeaat en een maximale LRV is aangetoond van > 3,7 voor NV2247 en > 3,6 voor NV2310. Deze LRV ligt hoger dan in test 1 doordat de concentraties NV-merkers in het voedingswater hoger waren. De geleidbaarheid van het RO-permeaat verandert welk, deze is hoger bij de lagere flux van 10 L/m<sup>2</sup>\*uur (18%).

Na verwijdering van de O-ring in test 3 gaat de geleidbaarheid van het RO-permeaat omhoog van 12 naar 166  $\mu$ S/cm. In het permeaat zijn vergelijkbare NV-concentraties gemeten als in de voeding. Dit resulteert in een lage LRV van 0,1 voor de NV-merkers. De verwijdering van één O-ring uit één van de drie geteste membranen zorgt ervoor dat de integriteit van de gehele pilot afneemt tot 0,1 LRV.

Nadat gaatjes zijn geboord in de epoxy laag van het membraan (test 4) gaat de geleidbaarheid van het RO-permeaat omhoog van 13 naar 227  $\mu$ S/cm. In het permeaat zijn nu dezelfde concentraties NV-merkers gemeten als in de voeding. Het boren van gaatjes in de epoxy laag van één van de drie geteste membranen zorgt ervoor dat de integriteit van de gehele pilot afneemt tot 0 LRV.

Nadat gedurende 22 uur de membranen (2 i.p.v. 3 modules) zijn blootgesteld aan (vrij) chloor (test 5) is de geleidbaarheid van het RO-permeaat iets hoger. De LRV is vergelijkbaar met de gevonden LRV tijdens de eerste twee testen met intacte membranen. Er is een LRV aangetoond van 2,7 voor NV2247 en > 2,6 voor NV2310. Wel is NV2247 teruggevonden in het RO-permeaat. Autopsie na afloop van de testen laat zien dat het membraanoppervlak van één van de twee modules op enkele plekken licht beschadigd is (op basis van de Fujiwara test, niet vermeld in de memo).

De tijdens dit onderzoek aangebrachte membraanschade als gevolg van verwijderen van een O-ring of boren van gaatjes in de epoxy laag van het membraan leiden tot een totale verlies aan integriteit van de gehele pilot. Terwijl het effect van chloorblootstelling nauwelijks is aangetoond. Aanbevolen wordt om in een vervolgonderzoek inkepingen in de O-ring aan te brengen in plaats van deze te verwijderen. Ook wordt aanbevolen om kleinere gaten te boren en deze niet te diep in het membraan te laten doordringen of MTA testen met de SEPA cel uit te voeren waarbij met behulp van lasertechnieken gaatjes in het membraanoppervlak worden aangebracht. Om het effect van chloorblootstelling beter te bestuderen is het aan te bevelen om de contacttijd tussen membraan en chloor te vergroten door bijvoorbeeld de doseerconcentratie te verhogen of langer te doseren. Deze aanbevelingen zijn meegenomen tijdens het onderzoek met de 2,5'' RO-modules (paragraaf 5.1.3)

### 5.1.5 Baanhoek pilot Evides

Bij productielocatie Baanhoek (Dordrecht) van Evides wordt pilotonderzoek gedaan naar een nieuw zuiveringsconcept voor de drinkwaterproductie uit oppervlaktewater. De pilottrein bestaat uit een conventionele voorzuivering gebaseerd op flotatie, gevolgd door actiefkoolfiltratie (AKF) en membraanfiltratie. Een belangrijke onderzoeksvraag is, hoe dicht de membranen moeten zijn om 1) biologisch stabiel drinkwater te produceren en 2) voldoende barrière te creëren tegen antropogene stoffen. Om die vraag te beantwoorden worden parallel nanofiltratie (NF) en omgekeerde osmose (RO) beproefd.

De desinfectiecapaciteit van NF- en RO-membranen is in theorie zeer hoog, maar in de praktijk kunnen lekkages optreden aan de membranen of de installatie daaromheen (pakkingen etc.), die de daadwerkelijke verwijdering verlagen. Met de beschikbare methoden voor online bewaking van de membraanintegriteit, zoals sulfaatmetingen, kan slechts een beperkte logverwijdering (LRV 2-3) worden bepaald. Dit geldt in het bijzonder voor NF, gezien de partiële retentie van sulfaat en geleidbaarheid. Ook met periodieke grootvolumemetingen (1000 l) van indicatororganismen zoals *E. coli* of somatische colifagen, voor en na membraanfiltratie, is de aantoonbare verwijdering zeer beperkt (LRV <2) door de lage concentraties in het voedingswater. Daarom is bij Baanhoek onderzoek gedaan naar de toepassing van de NV-methode als mogelijke alternatieve indicator voor de membraanintegriteit en (virus)verwijdering door NF/RO. Het onderzoek uitgevoerd door Evides is uitgewerkt in een memo (zie Bijlage 5).

## 5.2 Bepalen membraanintegriteit van RO-praktijkinstallaties met behulp van de NV methode

In de periode december 2019 tot en met november 2023 is de membraanintegriteit, door middel van het bepalen van de LRV, van verschillende RO-praktijkinstallaties van de projectpartners bepaald met behulp van de NV-methode.

De doelstelling van het meten van de LRV van praktijkinstallaties met behulp van de NV-methode waren:

- Bepalen van de invloed van membraanveroudering (door tijd, chemicaliën en mechanische slijtage) op de integriteit van RO-praktijkinstallaties.
- Vergelijken NV-methode met bestaande integriteitsmethoden (sulfaatmetingen bij WPB Heemskerk, PWN).

In staat Tabel 5-3 weergegeven op welke locaties NV metingen zijn uitgevoerd en welke onderzoeksvraag op de desbetreffende locatie is onderzocht.

Tabel 5-3. Locaties monsternamen RO-praktijkinstallaties en onderzoeksvragen

Partner	Locatie	Installatie	Onderzoeksvraag
Oasen	Zs Schuwacht	RO	Tijdseffect + CIP effect
PWN	WPB Heemskerk	RO	Tijdseffect + vergelijken integriteitsmethoden

De drie NV-merkers ontwikkeld voor oppervlaktewater (NV2247, NV2310 en NV2314, zie ook hoofdstuk 2) zijn in de eerste meetronde gemeten om te bepalen of een voldoende hoge LRV kon worden aangetoond. Op basis van de resultaten van deze nulmetingen is vervolgens bepaald hoe het onderzoek op de praktijkinstallaties voor RO verder vorm te geven.



### 5.2.1 Bepalen membraanintegriteit (LRV) RO-installatie WPB Heemskerk (PWN)

#### 5.2.1.1 Opzet eerste NV metingen RO-installatie WPB Heemskerk

In paragraaf 4.3.3.1 is het zuiveringsschema van WPB Heemskerk (PWN) beschreven. Na de UF volgt de RO. De RO-installatie bestaat uit 8 skids met ieder 2 trappen. Iedere skid bevat 36 drukbuizen (24 eerste trap, 12 tweede trap) en in elke drukbuis zitten 7 modules die worden gevoed met verzameld UF-permeaat. In totaal zijn er 2016 RO-membranen. De installatie is sinds 1999 in gebruik. De installatie bevat Hydranautics Espa 3 (324S) RO-membranen. De specificaties van de membranen zijn weergegeven in Tabel 5-4

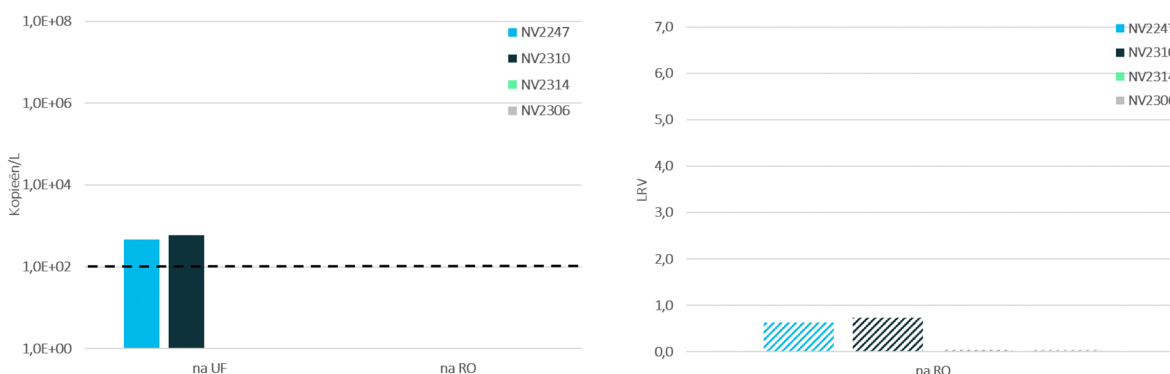
Tabel 5-4 Specificaties Hydranautics Espa 3 RO-membraan

Type	Skids	Aantal drukbuizen per skid	Aantal Membranen per drukbuis	Totaal aantal membranen	membraan oppervlakte (element/totaal) (m <sup>2</sup> )	MWCO (kDa)
Hydranautics Espa 3 (324S)	8	36 (24 1ste trap, 12 2de trap)	7	2016	37,2 / 74917	< 0,1

Er zijn monsters genomen voor en na de RO (zie voor de omschrijving monsterpunten (Tabel 4-14) om te bepalen hoeveel NV er aanwezig zijn voor en na de RO- membraaninstallaties.

#### 5.2.1.2 Resultaten eerste NV metingen RO-installatie WPB Heemskerk

Monstername op WPB Heemskerk heeft plaatsgevonden op 17 juni 2020 (gelijktijdig met de overige NV-monsters van WPB Heemskerk, zie paragraaf 4.3.3.2). In Figuur 5-11 zijn de resultaten van de NV metingen voor en na de RO weergegeven.



Figuur 5-11 Concentratie (links) en LRV ten opzichte van vorige processtap (rechts) NV van de RO-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk tijdens eerste meting op 17 juni 2020. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekent LRV >.

Uit de resultaten van de eerste NV metingen van de RO-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk weergegeven in Figuur 5-11 blijkt dat:

- Alleen NV2247 en NV2310 zijn teruggevonden voor de RO.
- In het verzamelde effluent na de RO geen van de NV-merkers meer zijn teruggevonden.
- Maximaal 0,6 – 0,7 LRV door de RO worden aangetoond met de NV-merkers omdat er voor RO nog maar lage concentraties NV-merkers aanwezig zijn.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

#### 5.2.1.3 Opzet monstercampagne RO-installatie WPB Heemskerk

Tijdens de monstercampagne van de RO-installatie op WPB Heemskerk is ervoor gekozen om op twee momenten, namelijk in de zomer en winter een uitgebreide monstername uit te voeren. Naast de invloed van de winter en zomer op de membraanintegriteit zijn er op WPB Heemskerk ook verschillende integriteitmethoden (zie ook Tabel 4-3) met elkaar vergeleken.

Naast de continue monitoring van de RO-blokken met de sulfaatmonitor meet PWN viermaal per jaar de individuele drukbuizen de geleidbaarheid (EGV) van het RO permeaat om "lekkage" per drukbuis te meten. Op deze manier wordt gecontroleerd of geen grote problemen met de membranen zijn ontstaan die niet door de sulfaatmonitor worden gesignaleerd.

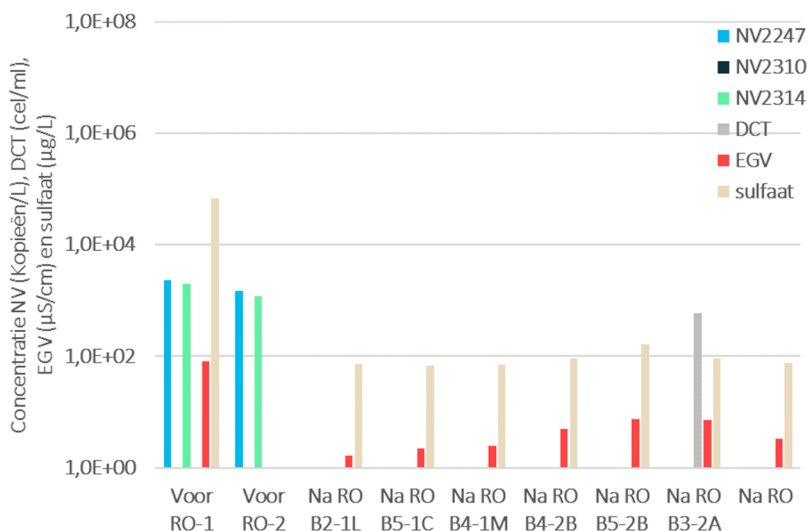
Monsternamen zijn plaatsgevonden op 12 januari (winter) en 1 september (zomer) 2021. Waarbij naast de door PWN toegepaste sulfaatmeting (onderste analysegrens 50 µg/L) en EGV (onderste analysegrens 1 µS/cm) als integriteitsmethoden ook de NV-methode (onderste analysegrens 120 - 130 Kopieën/L) en Directe Cel Telling (DCT; onderste analysegrens 600 cel/ml) zijn toegepast om de membraanintegriteit te meten. De volgende monsterpunten zijn bemonsterd, voor RO, 6 (12 januari) of 4 (1 september) individuele RO-drukbuizen en na RO. De selectie van de drukbuizen is gemaakt op basis van de uitkomsten van de EGV metingen. Enkele drukbuizen zijn gekozen met een lage EGV. Daarnaast zijn de drukbuizen met de hoogst gemeten EGV meegenomen tijdens de monsternamen. In Tabel 5-5 zijn de geselecteerde drukbuizen inclusief het de gemeten EGV weergegeven.

Tabel 5-5 Geselecteerde drukbuizen op basis van geleidbaarheid tijdens monstercampagne RO-praktijkinstallatie WPB Heemskerk

12-1-2021		1-9-2021	
Drukbus	EGV (µS/cm)	Drukbus	EGV (µS/cm)
Voor RO-1	80,23	Voor RO	64,4
Voor RO-2			
Na RO B2-1L	1,67	Na RO B4-1Mbi	1,38
Na RO B5-1C	2,24	Na RO B2-1Lbi	1,91
Na RO B4-1M	2,51	Na RO B6-2lbi	6,59
Na RO B4-2B	5,01	Na RO B8-2Cbi	13,15
Na RO B5-2B	7,43		
Na RO B3-2A	7,08		
Na RO	3,33	Na RO	

5.2.1.4 Resultaten monstercampagne RO-installatie WPB Heemskerk

De concentraties van de gemeten EGV, Sulfaat, NV-merkers en de directe cel telling voor RO, de verschillende RO-blokken en na RO gemeten tijdens de monsternamen op 12 januari 2021 (winter) zijn weergegeven in Figuur 5-12.



Figuur 5-12 Concentratie van alle gemeten EGV, sulfaat, NV-merkers en DCT monsters ten opzichte van vorige processtap van de RO-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk tijdens monsternamen op 12-1-2021. Onderste analysegrens sulfaat 50 µg/L, onderste analysegrens EGV 1 µS/cm, NV-merkers 120 - 130 Kopieën/L en onderste analysegrens DCT 600 cel/ml.

Vervolgens is de LRV van behandelingsstappen berekend waarbij voor de concentraties voor de RO het gemiddelde van de twee gemeten monsters is genomen. De op basis van de gevonden concentraties berekende LRV zijn weergegeven in

Tabel 5-6.

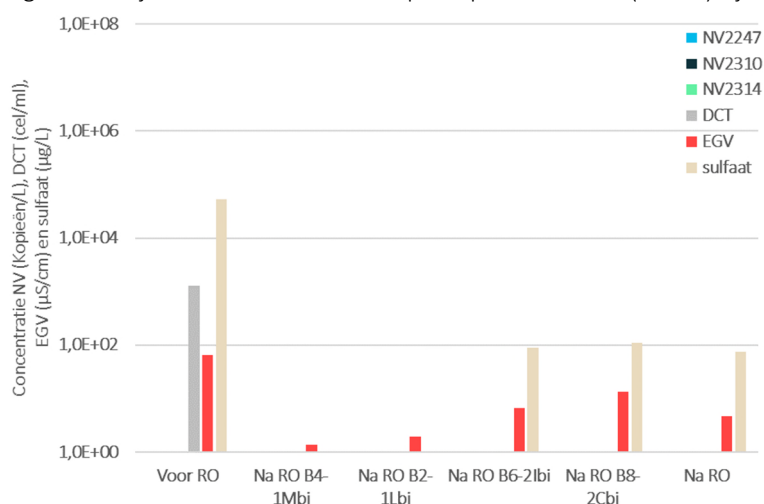
Tabel 5-6 Berekende LRV verschillende integriteitsmethoden tijdens monstername op 12-1-2021 RO-praktijkinstallatie WPB Heemskerk

Codering	EGV	sulfaat	NV2247	NV2310	NV2314	DCT
	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV
Na RO B2-1L	1,7	3,0	> 1,1	n.v.t	> 1,0	n.v.t
Na RO B5-1C	1,6	3,0	> 1,1	n.v.t	> 1,0	n.v.t
Na RO B4-1M	1,5	3,0	> 1,1	n.v.t	> 1,0	n.v.t
Na RO B4-2B	1,2	2,9	> 1,0	n.v.t	> 1,0	n.v.t
Na RO B5-2B	1,0	2,6	> 1,1	n.v.t	> 1,0	n.v.t
Na RO B3-2A	1,1	2,9	> 1,1	n.v.t	> 1,0	n.v.t
Na RO	1,4	3,0	> 1,2	n.v.t	> 1,1	n.v.t

Uit de grafiek (Figuur 5-12) waarin de concentraties van alle gemeten NV-merkers en DCT van de verschillende processtappen en de daaruit volgende LRV ten opzichte van de vorige processtap blijkt dat:

- NV2310 en DCT niet boven de detectielimiet zijn aangetoond voor de RO.
- Geen van de NV-merkers in het RO-permeaat boven de detectielimiet zijn gedetecteerd.
- Met de NV methode een maximale LRV van 1 is aangetoond voor NV2247 en NV2314.
- Met sulfaat een LRV van 3 is aangetoond.
- In één monster (na RO B3-2A) DCT boven de detectiegrens is gemeten.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

De concentraties van de gemeten EGV, Sulfaat, NV-merkers en de DCT voor RO, de verschillende RO-blokken en na RO gemeten tijdens de monstername op 1 september 2021 (zomer) zijn weergegeven in Figuur 5-13.



Figuur 5-13 Concentratie van alle gemeten EGV, sulfaat, NV-merkers en DCT monsters ten opzichte van vorige processtap van de RO-praktijkinstallatie van WPB Heemskerk tijdens monstername op 1-9-2021. Onderste analysegrens sulfaat 50 µg/L, onderste analysegrens EGV 1 µS/cm, NV-merkers 120 - 130 Kopieën/L en onderste analysegrens DCT 600 cel/ml.

Uit de grafiek (Figuur 5-13) waarin de concentraties van alle gemeten NV-merkers en DCT van de verschillende processtappen en de daaruit volgende LRV ten opzichte van de vorige processtap blijkt dat:

- De geanalyseerde NV-merkers in geen van de monsters boven de detectiegrens zijn aangetoond.
- Met de DCT methode een maximale LRV van 0,3 is aangetoond
- Met sulfaat een LRV van 3 is aangetoond.

- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

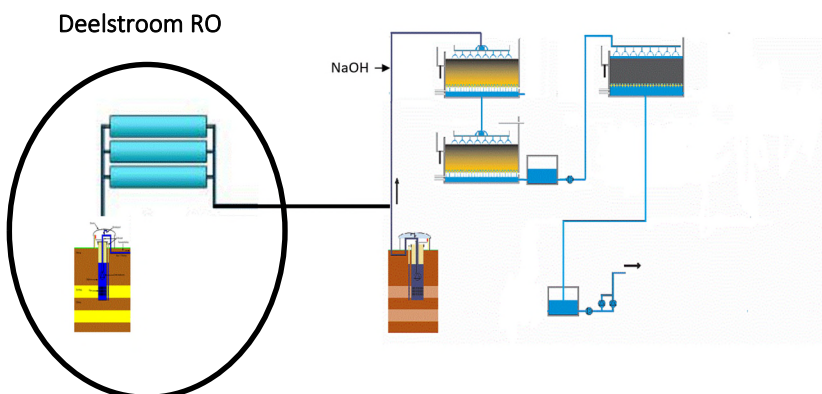
Op basis van de metingen die zijn uitgevoerd in de winter- en de zomerperiode van 2021 om de integriteit van de RO-installatie en individuele drukbuizen van zijn de volgens observaties gemaakt:

- In de winter zijn NV-merkers gemeten in het water voor de RO. Dit is niet het geval in de zomer.
- Alleen in de zomer zijn cellen gemeten met behulp van DCT in het water voor de RO gevonden (64 cel/ml).
- Zowel in de winter als in de zomer een LRV van 3 door de RO is aangetoond gebruikmakend van sulfaat als integriteitsmonitor.
- Alle genoemde resultaten hebben alleen betrekking op het moment van monstername.

**5.2.2 Bepalen membraanintegriteit (LRV) RO installatie ZS Schuwacht (Oasen)**

**5.2.2.1 Opzet eerste NV metingen RO-installatie ZS Schuwacht**

Op ZS Schuwacht (Oasen) is een drinkwaterzuivering met behulp van deelstroom RO. Oevergrondwater (winning Tiendweg) wordt achtereenvolgens behandeld met antiscalant dosering, RO en menging met water uit de huidige zuivering. Het zuiveringsschema van ZS Schuwacht is weergegeven in Figuur 5-14.



Figuur 5-14 Zuiveringsschema ZS Schuwacht

De RO installatie bestaat uit 4 skids. Iedere skid bevat 18 drukbuizen en in elke drukbuis zitten 6 modules. In totaal zijn er 432 RO- membranen. De installatie is sinds 2016 in gebruik. De installatie bevat Hydranautics Espa 2 RO- membranen. De specificaties van de membranen zijn weergegeven in Tabel 5-7.

Tabel 5-7 Specificaties Hydranautics Espa 2 RO-membraan

Type	Skids	Aantal drukbuizen per skid	Aantal Membranen per drukbuis	Totaal aantal membranen	membraan oppervlakte (element/totaal) (m <sup>2</sup> )	MWCO (kDa)
Hydranautics Espa 2-LD	4	18	6	432	37,2 / 16070	< 0,2

Om de concentratie NV-merkers te bepalen in het ruwe water en in het water voor en na de membraaninstallaties is voor ZS Schuwacht eerst de NV concentraties van het oevergrondwater (winning Tiendweg), de voeding voor de RO (na antiscalant dosering) en na de RO gemeten. In Tabel 5-8 is een overzicht weergegeven van de monsterpunten voor NV-merker analyses in de zuivering van ZS Schuwacht. Al de monsters zijn geanalyseerd op de de NV-merkers NV2247, NV2310, NV2314 en NV2306.

Tabel 5-8 monsterpunten voor NV analyses zuivering ZS Schuwacht

Codering	Opmerkingen
oevergrondwater	winning Tiendweg
Voeding voor RO	na antiscalant dosering
Na RO	verzameld permeaat

#### 5.2.2.2 Resultaten eerste NV metingen ZS Schuwacht

Monsternamen op ZS Schuwacht heeft plaatsgevonden op 17 juni 2020. Geen van de NV-merkers zijn boven de detectielimiet aangetoond in de bron, oevergrondwater (winning Tiendweg), en ook niet in de overige bemonsterde punten in de zuivering. Dit heeft als gevolg dat geen LRV is aangetoond door de RO-installatie met behulp van de NV-methode gebruikmakende van NV-merkers voor oppervlaktewater.

#### 5.2.2.3 Opzet monstercampagne RO installatie ZS Schuwacht

Om de invloed van tijd, chemicaliën en mechanische slijtage (door deeltjes in de voeding) op de integriteit van membranen te bepalen is er op ZS Schuwacht ook een monstercampagne uitgevoerd. Voor de monstercampagne zijn op verschillende momenten in het jaar monsters genomen op verschillende plekken in de zuivering van ZS Schuwacht. De volgende monsterpunten zijn bemonsterd, de bron (winning Tiendweg), Voor RO (na antiscalant dosering) en na RO zijn 2 van de 4 skids bemonsterd omdat tijdens een monsternamen altijd maar twee van de vier skids in bedrijf waren. Daarnaast is nog het verzameld RO bemonsterd. In Tabel 5-9 is een overzicht gegeven van de monsterpunten en datums van monsternamen tijdens de monsternamen campagne bij ZS Schuwacht.

Tabel 5-9 Gegevens monstercampagne ZS Schuwacht

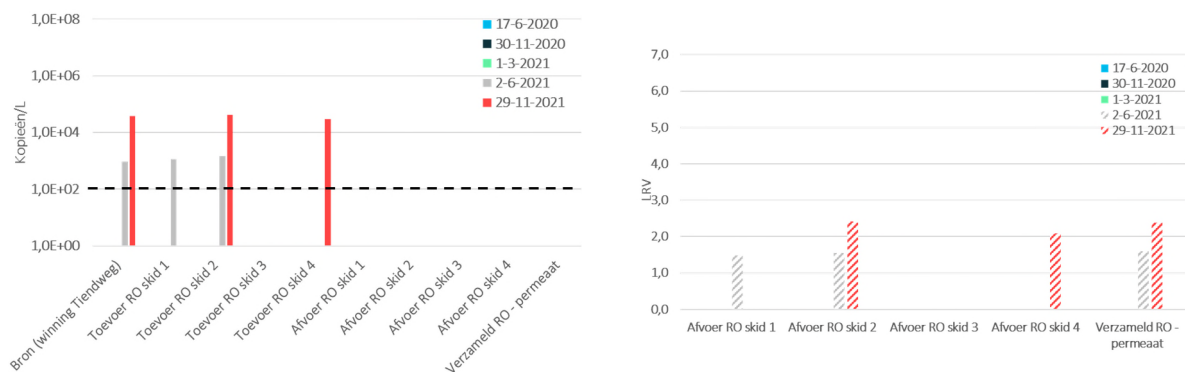
Monsterpunten	Monsterdatum
winning Tiendweg	30-11-2020
Voor RO; 2 van de 4 skids (na antiscalant dosering)	1-3-2021
Na RO; 2 van de 4 skids	2-6-2021
Verzameld RO	29-11-2021

Deze monsternamen campagne is uitgevoerd ondanks het feit dat geen van de NV-merkers voor oppervlaktewater in de bron zijn terug gemeten. De DNA-extracten van de monsters zijn echter bewaard gebleven zodat deze retrospectief konden worden doorgemeten indien een geschikte NV-merkers beschikbaar kwam als gevolg van het onderzoek naar nieuwe NV-merkers (zie paragraaf 2.2). Dit onderzoek heeft ertoe geleid dat een NV-merker in de bron van Zs Schuwacht is gevonden (GR7) die in hogere concentratie voorkomt dan de NV-merkers voor oppervlaktewater. Deze nieuwe NV-merker is daarom gebruikt om de monsters van de meetcampagne te analyseren.

#### 5.2.2.4 Resultaten monsternamen campagne RO installatie ZS Schuwacht

Het bronwater van Zs Schuwacht kan hogere concentraties ijzer bevatten wat een versturende werking heeft op de analyse van de NV-merkers. Ammoniumoxalaat wordt in het laboratorium gebruikt om het ijzer te verwijderen voordat de analyse begint (zie paragraaf 2.1.3), echter is het rendement van de analyse in dit geval te laag gebleken (1%) om de resultaten te kunnen gebruiken. Dit betekent dat de detectielimiet voor deze monsters hoger ligt dan gebruikelijk. Ook is gebleken dat de specifieke analyse voor GR7 minder goed presteert waardoor de detectiegrens voor deze specifiek NV-merkers ook hoger ligt. Dit heeft als gevolg gehad dat in veel van de monsters geen NV-merkers zijn aangetroffen boven de detectielimiet.

In Figuur 5-15 zijn de resultaten van de GR7 metingen weergegeven. Naast de resultaten van de monsters die zijn genomen tijdens de monstercampagne zijn ook resultaten van GR7 van de monsters van juni (voor de eerste serie testen) meegenomen.



**Figuur 5-15** Concentratie (links) en LRV (rechts) ten opzichte van vorige processtap van NV-merkers van de RO-praktijkinstallatie van ZS Schuwacht tijdens de monstercampagne. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekent LRV >.

Uit de resultaten van de monstercampagne gebruikmakende van de nieuw ontwikkelde NV-merker GR7 voor grondwater van de RO-praktijkinstallatie van ZS Schuwacht weergegeven in Figuur 5-15 blijkt dat:

- De hoogste concentratie GR7 gemeten voor de RO 4,3 x 10<sup>4</sup> kopieën/L is
- De maximaal aantoonbare LRV 2,4 is met GR7.
- De monsters van Zs Schuwacht kunnen ijzer bevatten wat de analyse op de NV-merkers verstoort.
- Geen van de andere NV-merkers zijn in de monsters van Zs Schuwacht aangetoond (boven de detectielimiet).

## 6 Vertaling onderzoeksresultaten naar de praktijk

### 6.1 NV-merkers voor toepassing in de praktijk

Dit onderzoek heeft bevestigd dat de analysemethode voor NV-merkers op basis van qPCR geschikt is, de detectielimiet is in de meeste gevallen laag genoeg en de analyse is robuust en reproduceerbaar. Belangrijkste variabelen zijn de concentraties NV-merkers in het water, het volume water dat wordt (kan worden) geconcentreerd en de eventuele aanwezigheid van storende componenten in het water (bijvoorbeeld binnen dit onderzoek, ijzer).

Van belang is dat de juiste NV-merker wordt geselecteerd voor iedere toepassing op basis van de waterbron die wordt gebruikt en de zuiveringsstappen die worden toegepast. Initiële meetcampagnes moeten uitwijzen welke NV-merker of NV-merkers voor een bepaalde locatie het meest geschikt zijn. Bijvoorbeeld, gebleken is dat wanneer oppervlaktewater wordt geïnfilteerd, de NV-merkers voor oppervlaktewater vergaand worden verwijderd. Het is dan nodig een andere NV-merker (bv. voor grondwater) te selecteren om een volgende zuiveringsstap te kunnen monitoren. Dit is bijvoorbeeld terug te zien bij Ps Ouddorp, waar de NV-merkers voor oppervlaktewater na infiltratie vergaand zijn verwijderd (zie paragraaf 4.3.2.1) en bij de monitoring van de pilot nieuw Baanhoek waar tijdelijk een andere bron wordt gebruikt waarin de NV-merkers in veel lagere concentraties aanwezig zijn (zie Bijlage 5). Wanneer een wijziging optreedt in de waterbron of andere zuiveringsstappen worden toegevoegd/verwijderd, zal het daarom van belang zijn te controleren of de gebruikte NV-merker(s) nog geschikt is (zijn). Ook kan het zijn dat de concentraties sporadisch te laag worden in de bron waardoor de LRV niet meer accuraat (genoeg) kan worden bepaald. Mogelijk dat in dergelijke gevallen grotere volumes permeaat kunnen worden onderzocht of een concentraat van de benodigde NV-merkers alsnog aan het te behandelen water kan worden gedoseerd.

Voor de NV-merkers voor oppervlaktewater zijn in verschillende bronnen in hoge concentraties aangetroffen in Nederland en in België. Vanuit onderzoek dat buiten dit project wordt uitgevoerd is bij KWR bekend dat dit ook het geval is in monsters genomen in het Verenigd Koninkrijk en Frankrijk. Deze NV-merkers lijken hiermee breed voor te komen in hoge concentraties. Van de overige NV-merkers is dit nog niet zo bekend. Voor grondwater is bovendien duidelijk geworden de ontwikkelde NV-merkers niet algemeen zijn voor grondwater. Dit is niet verrassend wanneer wordt bedacht dat de condities van het grondwater ook zeer variabel zijn, met name ten aanzien van de redoxcondities (aeroob, nitrificerend, sulfaatreducerend, etc.). Dit is zeer bepalend voor de aanwezige micro-organismen en daarmee ook de bijbehorende virussen. Door beter inzicht te krijgen in condities van het grondwater en de bijbehorende NV-merkers wordt het allicht mogelijk bijpassende NV-merkers te identificeren voor verschillende typen grondwater. Het zou bovendien waardevol zijn om verdere inzicht te krijgen in de mate van fluctuatie van de NV-merkers in tijd en ruimte in een diversiteit aan watertypen.

De praktijkmetingen die zijn uitgevoerd hebben aangetoond dat de concentratie NV-merkers kan variëren in tijd en ruimte. Dit is niet verrassend aangezien bekend is dat ook concentraties bacteriën kunnen variëren als gevolg van veranderende condities in het water, bijvoorbeeld als gevolg van temperatuur, regenval, etc. Ook is variatie gevonden in verwijdering van NV-merkers (LRV) door membranen, ook al worden NV-merkers voor en na een zuiveringsstap gedetecteerd. Bijvoorbeeld bij WPC De Gavers is dit te zien. Onduidelijk is vooralsnog wat hiervoor de onderliggende redenen zijn. Mogelijk heeft het te maken met de hypothese dat, onder bepaalde condities, de natuurlijke virussen in hogere concentraties voorkomen in de gastheercellen en daarmee beter worden verwijderd.

Mogelijk adsorberen de virussen onder bepaalde condities beter aan vaste deeltjes en worden daarmee beter verwijderd. Ook is bekend dat eigenschappen van het voedingswater (temperatuur, pH, etc.) een effect kan hebben op de structuur en prestaties van membranen (Xu, Gao et al. 2024) en daarmee dus ook op de verwijdering van virussen. Meer inzicht verkrijgen in de eigenschappen van de natuurlijke virussen zal helpen om dergelijke fluctuaties beter te kunnen duiden en bepalen of het een effect is van membraanintegriteit en/of NV-eigenschappen.

Om de integriteit te monitoring van membraansystemen in de praktijk is het nodig de analyses hoogfrequent en laagdrempelig op locatie uit te voeren. On-site qPCR technieken zijn commercieel beschikbaar die dit mogelijk maken. Het is nodig deze door te ontwikkelen zodat ze geschikt zijn voor de NV-methode.

## 6.2 Ultrafiltratie

### 6.2.1 LRV van lab naar praktijkschaal (UF)

#### Membraanveroudering UF

De invloed van membraanveroudering (door tijd, chemicaliën en mechanische slijtage) op de integriteit van UF-praktijkinstallaties is weergegeven in Figuren 4-11 en 4-17. Na de vervanging van de UF-membranen (Pentair Aquaflex 40 single-bore) bij De Gavers (De Watergroep) trad er een verbetering op in de virusverwijdering van LRV 2 (Figuur 4-11). Echter een vervanging van oude UF-membranen (Norit X-Flow S-225) met nieuwe UF-membranen (Pentair Xiga 40) in Ps Ouddorp (Evides) liet geen verbetering in de virusverwijdering zien (Figuur 4-17). Dit laatste bleek zowel uit praktijkschaal testen met de GR5 grondwater NV-merker (figuur 4-18) als uit een lab-schaal onderzoek waarbij kleine UF-modules zijn gemaakt van zowel de oude als de nieuwe UF-membranen.

Vezelbreuk resulteert in een significante daling van de LRV (zie 6.2.2). Het is aannemelijk dat de oude UF-membranen bij WPC De Gavers (De Watergroep) te maken hadden met een significante vezelbreuk, en dat daardoor een vervanging met nieuwe UF-membranen heeft geresulteerd in een verbetering van de NV LRV. In Ps Ouddorp was vervanging nodig vanwege de ouderdom van de UF-membranen, en was vezelbreuk vermoedelijk minder een probleem (wellicht door regelmatige vezelreparatie). Het is interessant dat de integriteit van oude ongebroken UF-membraanvezels vergelijkbaar is met nieuwe UF-membraanvezels, wat bleek uit de laboratoriumexperimenten. Het is bekend dat na verloop van tijd het hydrofiele PVP (polyvinylpyrrolidon) uit de PES/PVP UF-matrix loogt dat zorgt voor het bros worden van het UF-membraan (Pellegrin et al, 2013). Blijkbaar heeft dit geen of weinig effect op de retentie van virussen zolang de vezels niet breken.

#### Membraantype UF

Er zijn verschillende Pentair UF-membraantypen op lab-, pilot en praktijkschaal met de NV-methode doorgemeten (Tabel 6.1). Op praktijkschaal zijn bij WPC De Gavers (De Watergroep), Ps Ouddorp (Evides) en WPB Heemskerk (PWN), respectievelijk Aquaflex 40 single-bore, X-Flow S-225 (oud) en Xiga 40 membranen gebruikt. De gemeten LRV voor deze membranen waren respectievelijk 1,8-4,1, 3,5-4,0 en 3,3-5,8 en gaven een significante variatie. Deze variatie kan deels worden toegeschreven aan de verschillende membraantypen en structuren. Opener (en oude) Norit S-225 UF-membranen hebben een lagere LRV-range dan dichtere (en nieuwere) Pentair XIGA-40 membranen (Tabel 6-1). Het probleem met deze vergelijking is echter dat LRV-waarden werden gemeten op een verschillende schaal met andere watertypen, in verschillende installaties en tijdens verschillende perioden in de tijd. Voor UF-membranen met dezelfde MWCO van 150 kDa werd tijdens lab- en pilottesten een LRV gemeten van 5-5,5, terwijl voor UF-membranen met dezelfde MWCO op praktijkschaal (bijvoorbeeld bij WPC De Gavers) een LRV-range werd gevonden van 1,8-4,1. Dit heeft echter niet te maken met het membraantype, maar met andere oorzaken die hieronder worden besproken. We kunnen daarom geen rechtstreekse vergelijking maken van LRV-waarden tussen de verschillende UF-membraantypen bepaald op verschillende locaties, in verschillende installaties en op verschillende experimentele schaal.



Tabel 6-1. overzicht van de verschillende onderzocht UF-membranen op lab-, pilot- en praktijkschaal (voor alle merkers)

Leverancier	Type membraan	MWCO (kDa)	Porie (nm)	LRV (-)	Test
Pentair	RX300	150	20	5,5	Lab-schaal
Pentair	Aquaflex 64	150	20	5,0	Pilot-schaal
Pentair	Aquaflex 40 sb	150	20	1,8-4,1 <sup>5</sup>	WPC De Gavers (oud)
Pentair	Aquaflex 64	150	20	5,0-5,1	WPC De Gavers (nieuw)
Suez	Multibore	100-150	?	2,8-3,5 <sup>3</sup>	WPC De Gavers
Pentair/Norit	S-225	150-200	25	3,5-4,0 <sup>6</sup>	Ps Ouddorp (oud)
Pentair	XIGA-40	150	20	3,4-5,8 <sup>7</sup>	Ps Ouddorp (nieuw)
Pentair	XIGA-40	150	20 (15-35)	3,3-4,3	WPB Heemskerk

Bij WPC De Gavers (De Watergroep) bestaat de praktijkschaal installatie uit UF-skids met verschillende membranen van twee verschillende leveranciers (Pentair en Suez). Dit biedt ons een uitstekende gelegenheid om de invloed van verschillende UF-membraantypen te vergelijken, aangezien de locatie, de installatie en de schaal hetzelfde is. Bemonstering heeft in parallel plaatsgevonden zodat ook geen verschil in periode en NV-merker een rol kon spelen. De invloed van het membraantype op de membraanintegriteit bepalen bij WPC De Gavers (De Watergroep) is weergegeven in Figuur 4-11. De LRV door de UF skids met de Pentair UF-membranen ligt tussen de 1,6 – 1,9 (voor skid 1) en met de Suez UF-membranen tussen de 2,8 – 3,5 tijdens de verschillende monsternamemomenten (in juli 2020). De dichtere Suez UF-membranen vertonen aanvankelijk een hogere LRV, echter na membraanvervanging van de Pentair UF-membraan was het verschil niet langer significant.

### Vergelijking integriteitsmethoden UF

Er bestaan verschillende methoden om de integriteit van UF-membranen in de praktijk te bepalen. Deze methoden worden verdeeld in directe integriteitsmethoden zoals druktesten, akoestische sensortesten, vloeistof-porosimetrie en indirecte integriteitsmethoden zoals deeltjestellingen, deeltjesmonitoring, troebelheidsmetingen en surrogaat challenge testen (bijvoorbeeld met poederkool, MS2-fagen, goud-nanodeeltjes). Voor meer informatie over deze directe en indirecte integriteitsmethoden wordt verwezen naar een overzichtsartikel van Guo et al. (2010).

Een aantal van deze bestaande methoden is vergeleken met de nieuwe NV-methode, zoals directe deeltjes/cel tellingen bij WPB Heemskerk (PWN) in de praktijk. De resultaten van deze vergelijking staan vermeld in paragraaf 5.2.1. De hoogste LRV na UF is aangetoond met de NV-methode 5,1-5,4 (winter) en 4,0-4,2 (zomer). Directe cel tellingen gaven LRV-waarden van >2,9 (winter) en >3,3 (zomer). Een andere vergelijking is gemaakt met troebelheidsmetingen tijdens lab- en pilotonderzoek. De resultaten van deze vergelijking staan vermeld in paragrafen 4.2.1 en 4.2.2. Voor intacte UF-membranen werden LRV-waarden van 5,5 en 5,0 gevonden met de NV-methode voor respectievelijk het lab- en pilotonderzoek. De LRV-waarden bepaald met troebelheidsmetingen waren respectievelijk 2,2 en 1,5. In beide voorbeelden (directe cel tellingen en troebelheid) werden hogere LRV-waarden gevonden met de NV-methode.

### 6.2.2 Vertaling naar indicatie van vezelbreuk in de praktijk

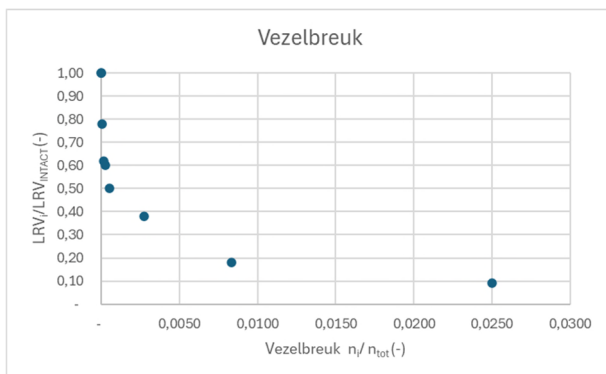
Vezelbreuk in functie van de LRV gebaseerd op de NV-methode is systematisch onderzocht op lab- en pilotschaal waarbij een aantal vezels is beschadigd (zie 4.2.1 en 4.2.2). Op lab-schaal zijn één en drie vezels beschadigd in een

<sup>5</sup> LRV Alle merkers gemeten tijdens monstercampagne (paragraaf 4.3.1.4).

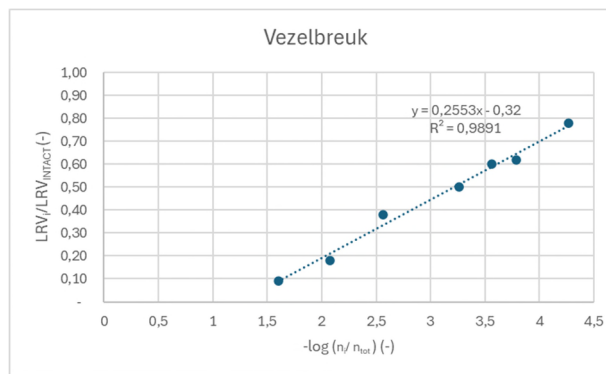
<sup>6</sup> LRV GR5,2 van de 4 skids vervangen. Monstername 1 liter in plaats van grote volumes.

<sup>7</sup> LRV GR5, grootvolume monstername.

RX300 met daarin 120 vezels, en op pilot-schaal zijn 1, 3, 5, 10 en 50 vezels doorgeknipt in een Aquaflex 64 UF-module met 18.360 vezels. De fractie aan beschadigde vezels wordt kan worden berekend uit het aantal beschadigde vezels ( $n_i$ ) ten opzichte van het totale aantal vezels ( $n_{tot}$ ). Deze fractie is bepaald voor alle lab- als pilotschaal experimenten en uitgezet tegen de fractie van de gemeten LRV van de beschadigde module ( $LRV_i$ ) tot opzichte van de gemeten LRV van de intacte module ( $LRV_{intact}$ ). Bijvoorbeeld in het lab-schaal experiment worden drie vezels beschadigd van de 120 vezels en bedraagt de beschadigde vezelfractie daarom 0,025 (of 2,5%). De LRV-waarde daalt hierdoor van 5,5 naar 0,5 en bedraagt de LRV-fractie 0,09 (9%). Deze berekening is voor elk vezelbreukexperiment uitgevoerd en de gegevens zijn geplot (Figuur 6-1).



Figuur 6-1a. LRV fractie uitgezet tegen de vezelbreukfractie voor alle vezelbreukexperimenten



Figuur 6.1b. LRV fractie uitgezet tegen de negatieve logaritme van de vezelbreukfractie voor alle vezelbreukexperimenten

Bij een toename van de vezelbreukfractie  $n_i/n_{tot}$  zal de LRV-fractie dalen, immers hoe meer vezels beschadigd raken hoe lager de LRV zal worden (Figuur 6.1a). Als de negatieve logaritme van de vezelbreukfractie wordt uitgezet tegen de LRV-fractie ontstaat een lineair verband. Dit lineaire verband heeft een hoge determinatiecoëfficiënt van 98,9% wat een sterke lineaire regressie vertegenwoordigt. Het lineaire verband is:

$$\frac{LRV_i}{LRV_{intact}} = -0,255 \cdot \log\left(\frac{n_i}{n_{tot}}\right) - 0,32$$

Waarin  $LRV_i$  de LRV-waarde is van de beschadigde module (of installatie),  $LRV_{intact}$  de LRV-waarde is van de intacte module (of installatie),  $n_i$  het aantal beschadigde vezels and  $n_{tot}$  het totale aantal vezels in de module (of installatie). Met deze lineaire correlatie kan voor een module of een totale installatie worden berekend hoeveel de LRV daalt als een aantal vezels worden beschadigd. Andersom kan uit de LRV-daling de hoeveel vezels worden berekend die zijn beschadigd. Hiervoor geldt de volgende relatie:

$$\frac{n_i}{n_{tot}} = 10^{-3,92\left(\frac{LRV_i}{LRV_{intact}}\right) - 1,25}$$

Hieronder voorbeelden van de hoeveelheid beschadigde vezels bij de drie locaties (WPC De Gavers, Ps Ouddorp en WPB Heemskerk) voor een gegeven LRV-daling uitgaande van UF-modules met 11,475 vezels (40 m<sup>2</sup> modules) (Tabel 6-2).

Tabel 6-2. Rekenvoorbeelden vezelbreuk in functie van LRV-daling (voor LRV = 5 en UF-module (N) met 11,475 vezels)

LRV <sub>i</sub>	LRV <sub>i</sub> /LRV <sub>intact</sub>	$-\log(n_i/n_{tot})$	$n_i/n_{tot}$	Aantal beschadigde vezels		
(-)	(-)	(-)	(-)	WPC De Gavers (N=120)	Ps Ouddorp (N=192)	WPB Heemskerk (N=768)
4,99	1,0	5,16	$6,75 \cdot 10^{-6}$	9	15	61
4,8	0,96	5,01	$9,69 \cdot 10^{-6}$	13	21	85
4,5	0,90	4,78	$1,66 \cdot 10^{-5}$	23	37	147
4,0	0,80	4,39	$4,1 \cdot 10^{-5}$	56	90	362
3,5	0,70	4,00	$1,01 \cdot 10^{-4}$	139	223	891
3,0	0,60	3,60	$2,49 \cdot 10^{-4}$	343	549	2195

Als bijvoorbeeld de LRV daalt van 5,0 naar 4,0 dan zijn er in WPC De Gavers 56 vezels beschadigd. Op basis van dit aantal beschadigde vezels kan worden besloten of de module(s) gerepareerd of vervangen moeten worden. Dit gaat er wel vanuit dat LRV-daling alleen wordt veroorzaakt door vezelbreuk. In de praktijk kan de LRV-daling in UF-installaties ook veroorzaakt worden door andere mechanismen, zoals O-ring schade, schade aan connecties,...

### 6.3 RO/Omgekeerde osmose

#### Membraanveroudering RO

De invloed van membraanveroudering (door chemicaliën en mechanische slijtage) op de integriteit van RO-modules op pilotschaal is beschreven in 5.1.3 en 5.1.4. Aangebrachte mechanische schade aan de RO-module, zoals O-ring en/of permeaatbuis kan leiden tot een significante LRV-daling tot 1-5 LRV afhankelijk van de ernst van de aangebrachte schade (figuur 5-6). Als gevolg van deze modulebeschadiging kan voedingswater direct in contact komen met de permeaatstroom. Aangebrachte schade aan de toplaag van het RO-membraan, door bijvoorbeeld chlooroxidatie of schuring door scherpe SiC-deeltjes resulteert niet in een vermindering van de LRV-waarde. Weliswaar raakt de toplaag van het RO-membraan beschadigd door de genoemde effecten, het resulteert niet in een verhoogde passage van virussen. De reden hiervan is vermoedelijk de support laag die nog steeds voldoende virussen kan tegenhouden. De support laag van een RO-membraan bestaat uit een UF-membraan, waarvan bekend is dat deze virussen vergaand kan verwijderen (zie 6.2).

Verouderingsverschijnselen konden niet bestudeerd worden op praktijkschaal bij WPB Heemskerk (PWN) en Zs Schuwacht (Oasen). Bij WPB Heemskerk waren onvoldoende virussen beschikbaar na voorbehandeling met een UF-installatie (zie 6.2), en bij Zs Schuwacht was de methode niet gevoelig genoeg om tot hoge LRV-waarden te komen (zie 5.2.2). Het is te verwachten dat verouderingsverschijnselen aan de toplaag niet te bepalen zijn met NV-metingen omdat de UF-support laag nog voldoende virussen kan verwijderen. Wel kan veroudering van O-ringen en permeaatbuizen in RO-modules en installaties worden bewaakt met behulp van de NV-methode. Indien door slijtage of door foutieve membraanvervanging deze onderdelen beschadigd raken, kan dat met de NV-methode goed worden opgevolgd. Wel is dan nodig om voldoende virussen in het RO-voedingswater te hebben, wat met name een probleem kan zijn na UF-voorbehandeling.

#### Membraantype RO

Er zijn verschillende RO-membraantypen op lab-, pilot en praktijkschaal met de NV-methode doorgemeten (Tabel 6-3). Op praktijkschaal zijn bij WPB Heemskerk (PWN) en Zs Schuwacht (Oasen) respectievelijk ESPA3 en ESPA2 8-inch Hydranautics RO-membranen gebruikt. De te meten LRV voor deze membranen waren relatief beperkt en

respectievelijk 0,6 en 2,4. Deze relatief lage meetbare LRV-waarden zijn te verklaren door zeer lage virusconcentraties in de RO-voeding na UF-voorbehandeling (bij WPB Heemskerk) en het gebruik van een alternatieve NV-merker GR7 op grondwater met een hoge detectielimiet vanwege de aanwezigheid van ijzer (bij Zs Schuwacht) (zie 5.2.2.4).

Op lab- en pilotschaal zijn hogere LRV-waarden (ca. 5,0) verkregen met verschillende typen RO-membranen. Deze hogere LRV-waarden liggen voor de hand, gezien de zeer dichte structuur van RO-membranen (op een UF-support laag). Een vergelijking tussen verschillende RO-membranen geeft geen verschil in LRV met NV-methode. Verschillen tussen RO-membranen zijn gericht op verschillen in de retentie van opgeloste stoffen, bijvoorbeeld zouten en organische microverontreinigingen (OMV). Scheiding van deze opgeloste componenten vindt plaats door een verschil in transportsnelheid door de toplaag van het membraan. Deze toplaag kan worden gekarakteriseerd met opgeloste stoffen, en niet door methoden gebaseerd op deeltjes. Deze toplaag kan dus niet worden gekarakteriseerd door de NV-methode. De NV-methode heeft hierdoor weinig meerwaarde voor de integriteitsbewaking van RO-membranen (echter wel voor RO-modules).

Tabel 6-3. Overzicht van de verschillende onderzocht RO-membranen op lab-, pilot- en praktijkschaal

Leverancier	Type membraan	NaCl-retentie (%)	NV LRV (-)	Test	Andere methoden
DOW	Filmtec FT30	99	5,0	Lab-schaal	Cond., Fluor.
Hydranautics	ESPA 2514	99,4	5,0	Lab-schaal	Cond., Fluor.
Trisep	TW30 2,5-inch	99,5	5,0	Pilot-schaal @ KWR	Cond., Sulf.
Hydranautics	ESPA2 4-inch	99,6	>3,7	Pilot-schaal @ Oasen	Cond.
Hydranautics	ESPA3 8-inch	98,5	>0,6->1,1	Praktijk (WPB Heemskerk)	Cond., DCT, Sulf.
Hydranautics	ESPA2 8-inch	99,6	>2,4 (GR7)	Praktijk (Zs Schuwacht)	Cond.

Cond. (geleidbaarheidsmeting), Fluor. (fluorescentiemeting) met Rhodamine WT en Pyranine, Sulf. (sulfaatmeting) en DCT (directe cel tellingen)

### Vergelijking integriteitsmethoden RO

Er bestaan verschillende methoden om de integriteit van RO-membranen in de praktijk te bepalen. Deze methoden worden verdeeld in directe integriteitsmethoden zoals vacuüm decay, MS-2 fagen en Rhodamine WT dosering en indirecte integriteitsmethoden zoals geleidbaarheid-, sulfaat- en TOC-metingen. Ook worden surrogaatmetingen voor virussen genoemd zoals het gebruik van gadolinium (Gd), natuurlijke deeltjes, zilver nanodeeltjes en organische stoffen (DOM, COD<sup>8</sup>). Voor meer informatie over deze directe en indirecte integriteitsmethoden wordt verwezen naar een overzichtsartikel van Pype et al. (2016).

Een aantal van deze bestaande methoden is op lab-, pilot- en praktijkschaal vergeleken met de nieuwe NV-methode (Tabel 6-3). Geleidbaarheidsmetingen worden in alle studies meegenomen, en in alle studies wordt hiervoor een LRV van 2,0 gevonden voor de geleidbaarheid. Sulfaatmetingen worden toegepast bij WPB Heemskerk (PWN) en bij de pilottesten met 2,5-inch RO-modules bij KWR, en in deze studies wordt een LRV van 2,8-3,2 gevonden voor sulfaat. Fluorescentiemetingen zijn alleen onderzocht op lab-schaal in testcellen, waarbij een LRV van 1,4-2,2 voor Pyranine en een LRV van 1,8-3,3 voor Rhodamine WT gevonden is (Venkataswamy Gowda et al. 2023). Directe cel tellingen zijn uitgevoerd bij WPB Heemskerk (PWN) waarbij een maximale LRV van 0,3 is gevonden. De vergelijking met de LRV met de NV-methode is lastig te maken. Tijdens lab- en pilottesten is een LRV

<sup>8</sup> DOM is dissolved organic matter and COD chemical oxygen demand als lump-sum parameter voor aanwezige organische stoffen in water

gevonden van 5,0, terwijl op praktijkschaal de aantoonbare LRV laag was  $>1,1$  (WPB Heemskerk) en  $>2,4$  (Zs Schuwacht) waarbij de verklaring hierboven is gegeven.

Schade aan O-ringen en permeaatbuizen wordt nauwkeuriger bepaald met NV-methode dan met sulfaat, fluorescentie en geleidbaarheid.

## 7 Conclusies en aanbevelingen

### 7.1 Conclusies

#### 7.1.1 NV-merkers

Een samenvatting van een aantal eigenschappen van de verschillende NV-merkers verkregen binnen dit onderzoek wordt gegeven in Tabel 7-1. Een nadere toelichting is gegeven in de tekst onder het tabel.

Tabel 7-1. Samenvatting van de tot nu toe bekende eigenschappen van de NV-merkers.

NV-merker	Hoge concentraties aangetoond in <sup>(1)</sup>	Gemiddelde concentratie (kopieën/L) <sup>(1)</sup>	Grootte (nm)	Lading in oppervlaktewater	qPCR analyse geschikt
NV2247	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oppervlaktewater (meerdere bronnen)</li> <li>Zeewater (1 bron)</li> <li>Brak opp. water (1 bron)</li> <li>Rioolwater (1 bron)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1,9E+08 (n=67)</li> <li>2,2E+07 (n=2)</li> <li>7,7E+06 (n=2)</li> <li>3,1E+07 (n=2)</li> </ul>	50-80	pH 7: sterkst positief pH 5,5: positief pH 4: positief	Ja
NV2310	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oppervlaktewater (meerdere bronnen)</li> <li>Zeewater (1 bron)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>5,5E+07 (n=67)</li> <li>9,7E+06 (n=2)</li> </ul>	50-80	pH 7: positief pH 5,5: sterkst positief pH 4: sterkst positief	Ja
NV2314	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oppervlaktewater (meerdere bronnen)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>8,4E+06 (n=62)</li> </ul>	50-80	pH 7: sterkst positief pH 5,5: positief pH 4: (bijna) neutraal	Niet geschikt
CrAssphage	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rioolwater (1 bron)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1,5E+09 (n=2)</li> </ul>	Niet bepaald	Niet bepaald	Ja
SEA1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zeewater (1 bron)</li> <li>Brak oppervlaktewater (1 bron)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2,2E+08 (n=2)</li> <li>7,7E+06 (n=2)</li> </ul>	Niet bepaald	Niet bepaald	Ja, verder testen
GR5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grondwater Ouddorp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2,5E+06 (n=8)</li> </ul>	Niet bepaald	Niet bepaald	Ja, verder testen
GR7	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grondwater Schuwacht</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3,5E+05 (n=6)</li> </ul>	Niet bepaald	Niet bepaald	Optimalisatie nodig

<sup>(1)</sup> alleen ruw water getest binnen dit onderzoek zijn genoemd

- De NV-merker NV2247 komt in hoge concentraties voor in geteste oppervlaktewatermonsters en is getest voor integriteitsmonitoring gedurende het onderzoek. De NV-merker en bijbehorende qPCR analyse zijn geschikt voor gebruik in de praktijk. NV2247 is ook in hoge concentraties aangetoond in zeewater en rioolwater, met deze waterbronnen zijn geen testen uitgevoerd met membraansystemen, daarom is nog onbekend of de NV-merker ook voor deze waterbronnen geschikt is. Wel is gebleken dat de concentraties NV2247 vrij sterk kunnen variëren in oppervlaktewater in tijd en ruimte, waarschijnlijk onder invloed van seizoenen en/of watertype. EM-ISH experimenten ondernomen om deze NV-merker te visualiseren waren nog niet succesvol.
- De NV-merker NV2310 komt in hoge concentraties voor in geteste oppervlaktewatermonsters, al zijn de concentraties meestal (maar niet altijd) iets lager dan NV2247. De NV-merkers is uitvoerig getest voor integriteitsmonitoring gedurende het onderzoek. De NV-merker en bijbehorende qPCR analyse zijn geschikt voor gebruik in de praktijk. NV2310 is ook in hoge concentraties aangetoond in zeewater, met deze waterbron zijn geen testen uitgevoerd met membraansystemen, daarom is nog onbekend of de NV-merker ook voor deze waterbron geschikt is. De lading van NV2310 vertoont een andere trend in vergelijking met NV2247 en NV2310,

dit kan mogelijk betekenen dat de verwijdering ook een andere trend laat zien. De concentraties lijken in de tijd en ruimte meer stabiel te zijn dan NV2247 waarmee het mogelijk geschikter is voor toepassing in de praktijk.

- De NV-merker [NV2314](#) komt ook in relatief hoge concentraties voor in geteste oppervlaktewatermonsters, al zijn de concentraties in bijna alle gevallen lager dan die van NV2247 en NV2310. Deze NV-merker is minder geschikt om toegepast te worden binnen de NV-methode dan NV2247 en NV2310, met name omdat de concentraties lager zijn en de qPCR minder robuust is.
- [NV2306](#) is minder geschikt om als merker te gebruiken voor oppervlaktewater, met name door de lagere concentraties en minder robuuste qPCR analyse.
- Uit het onderzoek is gebleken dat de NV-merker [crAssphage](#) in de hoogste concentraties voorkomt in rioolwater. Voor deze bekende NV-merker bestaat reeds een door KWR gevalideerde qPCR analyse. Het wordt in de praktijk ook al gebruikt, bijvoorbeeld binnen rioolwater surveillance en voor bronopsporing van fecale verontreinigingen. Omdat rioolwater niet wordt gebruikt als alternatief bron van drinkwater of proceswater is het de verwachting dat deze NV-merker niet zo snel zal worden gebruikt voor integriteitsmonitoring van membraansystemen. Wanneer de merker ook kan worden toegepast voor AWZI-effluent, wordt het interessant voor hergebruik toepassingen.
- Een nieuwe NV-merker voor zeewater ([SEA1](#)) is ontwikkeld die in hoge concentraties is gemeten in zeewater. Het moet nog blijken of deze NV-merker in de praktijk kan worden toegepast om bijvoorbeeld de integriteit van ontziltinstallaties te monitoren. SEA1 is ook gemeten in brak oppervlaktewater (bij Kamperland), al is het in lagere concentraties gemeten dan in zeewater (ongeveer factor 100 lager).
- Een nieuwe NV-merker (GR5) is ontwikkeld die in relatief hoge concentraties is gemeten in grondwater van Ps Ouddorp. De concentraties zijn lager dan van NV-merkers voor oppervlaktewater, rioolwater en zeewater. Gebleken is dat de NV-merker niet universeel is voor grondwater aangezien het niet voorkomt in grondwater van Zs Schuwacht. Nader onderzoek moet bepalen of de NV-merker breder voorkomt in andere typen grondwater of dat nog meer NV-merkers voor grondwater nodig zijn. Met deze NV-merker was het mogelijk de LRV van de UF-stappen consistent te bepalen bij Ps Ouddorp. Verdere testen moeten uitwijzen of de merker ook voor andere grondwaterbronnen en zuiveringsprocessen kan worden toegepast.
- Een nieuwe NV-merker ([GR7](#)) is ontwikkeld die in relatief hoge concentraties is gemeten in grondwater van Zs Schuwacht. De concentraties zijn de laagst gemeten van de NV-merkers. Gebleken is dat de NV-merker niet universeel is voor grondwater aangezien het niet voorkomt in grondwater van Ps Ouddorp. De qPCR analyse voor deze NV-merker moet worden geoptimaliseerd en de detectielimiet van de methode verlaagd voordat verdere testen hiermee worden uitgevoerd.

Een standaardprotocol voor de analyse van één liter water is opgesteld en wordt nu gehanteerd voor deze NV-merkers, hierdoor zou bij implementatie op andere locaties consistente resultaten verwacht mogen worden. Wel zullen de concentraties NV-merkers variëren over tijd en ruimte. Voor NV2310 was dat bijvoorbeeld bij WPC de Gavers ongeveer 1 log over 1 jaar en voor NV2247 meer dan 3 log.

De toepassing van een concentratiestap met centricon filters laat minimale verliezen zien van de natuurlijke virussen (getest tot 1L) en is effectief om de detectielimiet van de analyses te verlagen. Aanpassingen aan de methode voor grootvolumemonsters (hemoflow) en een voorbehandeling met ammoniumoxalaat en eventuele effecten hiervan op de NV-methode moeten nader worden onderzocht.

NV-merkers moeten altijd getest worden op een nieuwe locatie om inzicht te krijgen in de concentraties en in hoeverre deze variëren in de tijd. Ook is van belang om te bepalen of de NV-merker geschikt is voor een specifieke zuiveringsstraat. Zo is bijvoorbeeld gebleken dat NV-merkers voor oppervlaktewater niet meer bruikbaar zijn na een infiltratiestap in de bodem. Ook wanneer een RO-stap volgt op een UF-stap is gebleken dat de concentraties NV-merkers na UF te laag is om een accurate LRV van de RO-stap te kunnen bepalen.

### 7.1.2 Verkenning van de mogelijkheden om de NV-methode op locatie uit te voeren

De verkennende testen twee systemen voor on-site qPCR analyses (Genecount en Udetect) laten zien dat de DNA-isolatie methoden en qPCR apparaten bruikbaar zijn om NV-merkers in water te meten. Doorontwikkeling, optimalisatie en validatie van de systemen is echter noodzakelijk om de benodigde gebruiksvriendelijkheid en lage detectielimieten te kunnen realiseren voor routinematige toepassing in de praktijk. Om een lage detectielimiet te behalen is het met name van belang een on-site concentratiemethode te ontwikkelen, anders kan slechts een klein volume water (<1 ml) worden geanalyseerd.

### 7.1.3 Ultrafiltratie

- Intacte UF-modules hebben een LRV van 5,0 - 5,5 gebaseerd op de NV-methode op lab- en pilotschaal. De maximale aantoonbare LRV van UF-praktijkinstallaties was 3,3, > 5,8 en 5,4 voor respectievelijk WPC De Gavers (De Watergroep), PS Oudorp (Evides) en WPB Heemskerk (PWN). De maximale aantoonbare LRV is seizoens- en NV-merker afhankelijk. De werkelijke LRV van UF is op praktijkschaal lager (1,8 tot 4,3) dan in lab/proefinstallaties, met uitzondering van de installaties met nieuwe membranen bij Ouddorp en De Gavers.
- Vezelbreuk in een UF-module of UF-installatie resulteert in een significante daling van de LRV. Een daling van 1 LRV (tot LRV 4,0) is gemeten voor één vezelbreuk in een praktijkschaal UF-module (met 18.360 vezels). Er bestaat een lineair verband tussen de negatieve logaritme van de vezelbreukfractie en de daling van de LRV. Uit dit verband kan het aantal gebroken vezels worden bepaald op basis van de LRV-daling. Op basis van dit aantal beschadigde vezels kan worden besloten of de module(s) gerepareerd of vervangen moeten worden.
- De invloed van het membraantype op de LRV was bepaald bij De Gavers (De Watergroep). Dichtere UF-modules (Suez) vertonen aanvankelijk een hogere LRV dan opener UF-modules (Pentair), echter na membraanvervanging van Pentair UF-modules was het verschil niet langer significant. Een rechtstreekse vergelijking tussen LRV van de verschillende UF-membraantypen bepaald op verschillende locaties, in verschillende installaties en op verschillende experimentele schaal is niet mogelijk.
- Oudere UF-modules breken vaker, wat resulteert in een daling in de LRV. De oude UF-modules bij WPC De Gavers (De Watergroep) hadden significante vezelbreuk, en vervanging van de UF-modules resulteerde in een hogere LRV. In Ps Ouddorp was vervanging nodig vanwege ouderdom van de UF-modules, en was vezelbreuk onder controle door regelmatige vezelreparatie. Oudere intacte UF-vezels vertoonden nog een hoge LRV.
- Een aantal alternatieve integriteitsmethoden is vergeleken met de NV-methode, zoals directe cel tellingen bij WPB Heemskerk (PWN) en troebelheidsmeting tijdens lab- en pilotonderzoek. In beide gevallen (directe cel tellingen en troebelheid) werden hogere LRV-waarden gevonden met de NV-methode. De NV-methode is een uitstekende methode om de integriteit van UF-membranen te bepalen en te bewaken.

### 7.1.4 RO/omgekeerde osmose

- Intacte RO-membranen hebben een hoge LRV (ca. 5,0) voor verschillende typen RO-membranen. Deze hoge LRV konden niet worden gemeten op praktijkschaal en is te verklaren door te weinig virussen in de RO-voeding na UF-voorbehandeling (WPB Heemskerk) of een hoge detectielimiet van een alternatieve NV-merker GR7 op grondwater (Zs Schuwacht).
- Aangebrachte mechanische schade aan de RO-module, zoals O-ring en/of permeaatbuis schade kan leiden tot een significante LRV-daling tot 1-5 LRV. Aangebrachte schade aan de toplaag van het RO-membraan, door bijvoorbeeld chlooroxidatie of schuring door scherpe SiC-deeltjes resulteert niet in een vermindering van de LRV-waarde. De NV-methode is geschikt voor integriteitsbewaking van RO-modules, echter niet voor integriteitsbewaking van het RO-membraan zelf.
- Een vergelijking tussen verschillende RO-membraantypen geeft geen verschil in LRV met de NV-methode. RO-membranen worden gekarakteriseerd met opgeloste stoffen, en niet door methoden gebaseerd op deeltjes zoals de NV-methode. De NV-methode heeft hierdoor weinig meerwaarde voor de karakterisering van RO-membranen.



- In Baanhoek zijn zowel NF- en RO-modules onderzocht. Het blijkt dat de LRV van de NF-modules hoger waren dan die van de RO-modules (respectievelijk 3,5 en 3,0). Het lijkt erop dat dit eerder te maken heeft met pakkingen/O-ringen dan met het membraantype zelf.
- Verouderingsverschijnselen konden niet bestudeerd worden op praktijkschaal. Het is te verwachten dat verouderingsverschijnselen aan de toplaag niet te bepalen is met NV-metingen, omdat de UF-support laag nog voldoende virussen kan verwijderen.
- Een aantal alternatieve integriteitsmethoden op lab-, pilot- en praktijkschaal vergeleken met de nieuwe NV-methode, zoals directe cel tellingen, geleidbaarheid-, sulfaat- en fluorescentiemetingen. In alle gevallen werden hogere LRV-waarden gevonden met de NV-methode. De NV-methode is een uitstekende methode om de integriteit van RO-modules te bepalen en te bewaken, echter niet voor RO-membranen.

Er is een seizoenafhankelijke LRV gevonden voor UF-modules op praktijkschaal. Bij WPC De Gavers (De Watergroep) en WPB Heemskerk (PWN) zijn hogere LRV gevonden in de winterperiode (december) dan in de zomerperiode (juni/juli). Deze variatie is mogelijk gelinkt aan de viruskarakteristieken die afhankelijk zijn van de periode, of van membraaneigenschappen die variëren in de periode, mogelijk gerelateerd aan de temperatuur van het voedingswater. Een sluitende verklaring hiervoor hebben we echter niet kunnen geven, en lijkt een interessant en zinvol onderwerp voor verdere studie. Immers vezelbreuk kan alleen nauwkeurig in kaart worden gebracht als de basis LRV-waarde min of meer constant blijft.

## 7.2 Aanbevelingen

- NV-methode voor oppervlaktewater is goed toepasbaar voor de integriteitsmonitoring van UF en RO membraansystemen (minder geschikt voor RO na UF omdat de concentraties voor RO dan te laag zijn). Het is waardevol om langdurig en hoogfrequent een dergelijke praktijkinstallatie te monitoren om ervaring hiermee op te doen en of het daadwerkelijk kan worden gebruikt voor integriteitsbewaking in de praktijk en om inzicht te krijgen in de fluctuaties in tijd en ruimte en het effect hiervan op de LRV. Een eerste indicatie hiervan is verkregen bij Evides in Baanhoek, waarbij NF/RO-modules een LRV-waarde hadden van 3,0-3,5 na conventionele voorzuivering en actieve koolfiltratie. Hoe vaak een proces/zuivering moet worden doormeten om de integriteit te kunnen waarborgen is gebaseerd op een risicobeoordeling die afhangt van de kans op falen, het test interval en de monitoringsfrequentie. Deze zaken zullen moeten worden bestudeerd om een degelijke risicobeoordeling te kunnen opstellen. Hoe variëren concentraties in de tijd? Wat is het effect van veroudering op de integriteit van membranen? Hiervoor is het waardevol om een NV-methode op basis van qPCR door te ontwikkelen dat op locatie gebruikt kan worden voor (hoog)frequente/bijna continue monitoring van de integriteit van zuiveringsprocessen.
- Dit TKI-project is sterk gefocust op (de integriteit van) membraaninstallaties, vooral ultrafiltratie en omgekeerde osmose. Maar interessant is om te beoordelen of de NV-merker methode bruikbaar is voor monitoring van andere zuiveringsprocessen die worden gebruikt in de verwijdering van virussen, te denken valt aan actiefkoolfiltratie, zandfiltratie, coagulatie-flocculatie-sedimentatie processen. Mogelijk ook inactivatie processen (zoals UV, peroxide, ozon...), al is de verwachting dat de qPCR methode hiervoor minder geschikt is. Onderbelichte membraanprocessen zijn microfiltratie en nanofiltratie. Vooral dat laatste proces is de laatste jaren sterk in opkomst, en heeft nog weinig aandacht gekregen in het huidige project.
- Nieuwe ontwikkelde NV-merkers testen op lab-, pilot en praktijkschaal om te beoordelen in hoeverre deze geschikt zijn voor integriteitsbewaking. Hiervoor zuiveringsinstallaties nodig die gebruikmaken van deze waterbronnen, zoals bijvoorbeeld ontziltingsinstallaties.
- De NV-merkers kunnen worden gebruikt om de *integriteit* van zuiveringsprocessen te monitoren, maar kunnen mogelijk ook worden gebruikt als indicator voor eventuele pathogene virussen. Onderzocht wordt in hoeverre de NV-merkers goede indicatoren zijn voor pathogene virussen. Het is mogelijk hiervoor laboratorium- en pilotproeven uit te voeren om hier inzicht in te verkrijgen.

- Beoordelen welke andere waterbronnen worden gebruikt als (mogelijke) drinkwaterbron en/of industriewater waarbij de NV-merkers van toegevoegde waarde kunnen zijn (bv. AWZI effluent, brak grondwater). Indien nodig voor deze bronnen nieuwe NV-merkers ontwikkelen en testen.
- Nadere karakterisering van de NV-merkers (grootte, vorm, lading etc.), waar nodig optimalisatie van de qPCR analyses en de NV-methode (bv. ook t.a.v. grootvolumemonsters). Nader inzicht krijgen in de relatie tussen de gastheercel en natuurlijke virussen die als NV-merker worden gebruikt om beter inzicht te krijgen of dit een effect heeft op de concentraties en/of fluctuaties in tijd en ruimte. Wanneer de natuurlijke virussen *in* de gastheercel zitten bijvoorbeeld, heeft dit waarschijnlijk een effect op de bepaling van de LRV met de NV-methode omdat de gastheercel groter is dan de virussen en daarmee eenvoudiger te verwijderen door membraansysteem. Beter inzicht in de lading, grootte en vorm van de virussen onder verschillende condities kan ook helpen te verklaren waarom in sommige gevallen de ene beter lijkt te worden verwijderd dan de andere.
- In het onderzoek zijn drie verschillende virustypen gebruikt voor oppervlaktewater, maar de vraag dient zich aan welke het meest geschikt is en of dit type dan ook generiek geschikt gaat zijn op andere oppervlaktewaterlocaties.
- Bepalen in hoeverre aanpassingen aan het standaardprotocol een effect hebben op de NV-methode. Bijvoorbeeld voor het in behandeling nemen van grootvolumemonsters en/of voorbehandeling met ammoniumoxalaat om ijzer te verwijderen uit bronwater.

### 7.3 Project output

Harmsen, D.J.H., Beerendonk, E.F., Hornstra, L.M., Heijnen, L., Cornelissen, E.R, *'Using Natural Virus Markers to Safeguard the Integrity of Membranes in Water Treatment Plants'* Euromembrane 2022, 20-24 November 2022, Sorrento (Napels, Italy)

Danny Harmsen, Emile Cornelissen, Han Vervaeren, Stefan Koel *'Nieuwe meetmethode voor kwaliteitsbewaking van UF-membraansystemen'* Water Matters No.15 December 2022, pag 8 - 11  
Ook naar het Engels vertaald (New measuring method for quality assurance of UF membrane systems)

Dwani Venkataswamy Gowda, Danny Harmsen, Arnout D'Haese, Emile R. Cornelissen, *'Membrane integrity monitoring on laboratory scale: Impact of test cell-induced damage on membrane selectivity'* Journal of Membrane Science 669 (2023) 121281

In voorbereiding: peer reviewed artikel *'Monitoring UF hollow fiber membrane integrity with novel microbial monitoring method'* Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024A

In voorbereiding: peer reviewed artikel *"Impact of membrane module damage, hypochlorite exposure, and abrasive particle recirculation on virus removal and integrity in RO membranes"* Dwani Venkataswamy Gowda et al. 2024B

# Literatuur

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.

Antipov, D., M. Raiko, A. Lapidus and P. A. Pevzner (2020). "MetaviralSPAdes: assembly of viruses from metagenomic data." *Bioinformatics* **36**(14): 4126-4129.

Armanious, A., M. Aeppli, R. Jacak, D. Refardt, T. Sigstam, T. Kohn and M. Sander (2016). "Viruses at Solid–Water Interfaces: A Systematic Assessment of Interactions Driving Adsorption." *Environmental Science & Technology* **50**(2): 732-743.

Cmarko, D. and K. Koberna (2007). "Electron microscopy in situ hybridization: tracking of DNA and RNA sequences at high resolution." *Methods Mol Biol* **369**: 213-228.

Foortan, A., R. Sjöback, J. Björkman, B. Sjögreen, L. Linz and M. Kubista (2017). "Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)." *Biomol Detect Quantif* **12**: 1-6.

Harmsen, D. J. H., E. Beerendonk, L. M. Hornstra, L. Heijnen and E. R. Cornelissen (2022). *Using Natural Virus Markers to Safeguard the Integrity of Membranes in Water Treatment Plants (Abstract)*. Euromembranes.

Harmsen, D. J. H., E. R. Cornelissen, H. Vervaeren and S. Koel (2022). Nieuwe meetmethode voor kwaliteitsbewaking van UF-membraansystemen. *Water Matters*: 8-11.

Hornstra, L. M., T. Silva, B. Blankert, L. Heijnen, E. Beerendonk, E. Cornelissen and G. Medema (2019). "Monitoring the integrity of reverse osmosis membranes using novel indigenous freshwater viruses and bacteriophages." *Environmental Science: Water Research & Technology* **5**.

Kralik, P. and M. Ricchi (2017). "A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything." *Front Microbiol* **8**: 108.

Krishnamurthy, S. R. and D. Wang (2017). "Origins and challenges of viral dark matter." *Virus Research* **239**: 136-142.

Kumar, M., S. Adham and J. DeCarolis (2007). "Reverse osmosis integrity monitoring." *Desalination* **214**(1): 138-149.

Ostarcevic, E. R., J. Jacangelo, S. R. Gray and M. J. Cran (2018). "Current and Emerging Techniques for High-Pressure Membrane Integrity Testing." *Membranes* **8**(3): 60.

Rensen, E., S. Pietropaoli, F. Mueller, C. Weber, S. Souquere, S. Sommer, P. Isnard, M. Rabant, J. B. Gibier, F. Terzi, E. Simon-Loriere, M. A. Rameix-Welti, G. Pierron, G. Barba-Spaeth and C. Zimmer (2022). "Sensitive visualization of SARS-CoV-2 RNA with CoronaFISH." *Life Sci Alliance* **5**(4).

Santiago-Rodriguez, T. M. and E. B. Hollister (2022). "Unraveling the viral dark matter through viral metagenomics." *Frontiers in Immunology* **13**.

Tang, C. Y., Z. Yang, H. Guo, J. J. Wen, L. D. Nghiem and E. Cornelissen (2018). "Potable Water Reuse through Advanced Membrane Technology." *Environ Sci Technol* **52**(18): 10215-10223.

Venkataswamy Gowda, D., D. Harmsen, A. D'Haese and E. R. Cornelissen (2023). "Membrane integrity monitoring on laboratory scale: Impact of test cell-induced damage on membrane selectivity." *Journal of Membrane Science* **669**: 121281.

Vilsker, M., Y. Moosa, S. Nooij, V. Fonseca, Y. Ghysens, K. Dumon, R. Pauwels, L. C. Alcantara, E. Vanden Eynden, A.-M. Vandamme, K. Deforche and T. de Oliveira (2018). "Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data." *Bioinformatics* **35**(5): 871-873.

Visa, N., F. Puvion-Dutilleul, F. Harper, J. P. Bachellerie and E. Puvion (1993). "Intranuclear distribution of poly(A) RNA determined by electron microscope in situ hybridization." *Exp Cell Res* **208**(1): 19-34.

Wilrich, C. and P. T. Wilrich (2009). "Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method." *J AOAC Int* **92**(6): 1763-1772.

Xu, B., W. Gao, B. Liao, H. Bai, Y. Qiao and W. Turek (2024). "A Review of Temperature Effects on Membrane Filtration." *Membranes* **14**(1): 5.

# Bijlage 1. Bepalen limiet van detectie (LOD) en kwantificatie (LOQ) onder praktijkcondities

## Bepaling van de LOD en LOQ

Resultaten van de analyses op drinkwatermonsters waaraan verschillende concentraties natuurlijke virussen zijn toegevoegd.

NV2247																				
Kopieën/reactie	0		0.7		1.5		3		6		12		25		50		100		1000	
	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën
	N/A	0,0	N/A	0,0	39,1	3,0	37,3	1,5	35,6	9,7	36,0	7,5	34,7	18,2	33,5	44,1	32,0	120,7	28,8	1174,0
	N/A	0,0	N/A	0,0	37,7	2,3	37,7	1,2	36,3	6,2	35,3	12,4	34,7	19,1	33,7	38,5	31,9	136,0	28,9	1094,6
	N/A	0,0	N/A	0,0	N/A	4,9	36,6	2,5	36,6	5,1	35,3	12,0	34,8	17,5	33,0	60,7	31,8	137,4	28,7	1195,8
	N/A	0,0	40,0	0,5	38,0	6,2	36,3	3,1	36,4	5,6	35,5	10,8	34,4	23,6	33,2	52,8	32,1	114,7	28,7	1187,2
	N/A	0,0	39,6	0,6	38,7	1,3	38,5	0,7	36,2	6,6	35,3	12,6	34,6	20,8	33,3	48,8				
	N/A	0,0	N/A	0,0	39,2	2,0	37,9	1,0	36,1	7,0	34,9	16,8	34,4	23,1	33,4	47,5				
	N/A	0,0	N/A	0,0	39,2	3,4	37,1	1,7	36,2	6,7	35,0	14,9								
	N/A	0,0	N/A	0,0	38,3	3,6	37,1	1,8	37,4	3,0	35,0	15,5								
	N/A	0,0	N/A	0,0	N/A	3,9	36,9	2,0												
	N/A	0,0	N/A	0,0	37,2	1,4	38,4	0,7												
			N/A	0,0	N/A	3,2	37,2	1,6												
			39,7	0,6	39,5	5,1	36,6	2,6												
Kopieën gem.		0,0		0,1		3,4		1,7		6,2		12,8		20,4		48,7		127,2		1162,9
SD		0,0		0,3		1,5		0,8		1,9		3,0		2,5		7,6		11,3		46,4
VC (%)				182,2		45,0		45,0		30,8		23,1		12,5		15,6		8,9		4,0
Gemeten concentratie		0,0		0,9		1,8		3,6		7,3		14,5		29,1		58,1		116,3		1162,9
(verdunning hoogste conc.)																				

NV2310																				
Kopieën/reactie	0		0,7		1,5		3		6		12		25		50		100		1000	
	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën	Ct	Kopieën
	N/A	0,0	N/A	0,0	38,4	2,1	36,5	7,4	35,4	15,7	36,0	10,3	34,5	28,3	33,3	62,7	32,2	131,7	29,0	1095,0
	N/A	0,0	39,7	0,9	N/A	0,0	38,7	1,8	36,7	6,6	35,8	12,1	34,8	23,5	33,8	45,0	32,1	140,7	28,9	1173,0
	N/A	0,0	38,7	1,8	36,2	8,9	37,0	5,3	35,4	16,0	35,3	16,7	34,6	26,2	33,2	66,6	32,3	122,7	28,7	1308,0
	37,8	1,8	N/A	0,0	39,5	1,0	37,1	5,1	36,3	8,4	34,8	22,9	34,2	34,5	33,0	75,4	32,1	138,6	28,8	1253,0
	N/A	0,0	N/A	0,0	37,2	4,8	36,0	10,2	36,0	10,2	35,1	18,9	34,7	24,1	33,6	50,9				
	N/A	0,0	38,5	2,0	38,7	1,8	36,5	7,5	35,9	11,0	35,6	13,8	34,4	29,7	33,5	55,0				
	N/A	0,0	N/A	0,0	38,3	2,3	36,9	5,7	36,0	10,2	34,7	24,8								
	N/A	0,0	N/A	0,0	36,4	8,1	37,9	2,9	35,9	10,9	35,6	13,2								
	N/A	0,0	N/A	0,0	N/A	0,0	37,3	4,5												
	N/A	0,0	N/A	0,0	39,5	1,1	36,9	5,8												
			N/A	0,0	38,5	2,0	37,4	4,2												
			N/A	0,0	37,5	4,0	36,5	7,7												
Kopieën gem.		0,2		0,4		3,0		5,7		11,1		16,6		27,7		59,3		133,4		1207,3
SD		0,6		0,7		2,9		2,3		3,2		5,2		4,1		11,1		8,1		93,1
VC (%)				192,1		97,3		40,2		29,2		31,5		14,8		18,7		6,1		7,7
Gemeten concentratie		0,0		0,9		1,9		3,8		7,5		15,1		30,2		60,4		120,7		1207,3
(verdunning hoogste conc.)																				

Gegevens gebruikt om de LOD te bepalen.

Concentratie (DNA kopieën/qPCR)*	Totaal aantal reacties	Aantal positieve reacties
NV2247		
0	10	0
0,5	12	3
0,9	12	9
1,8	12	12
3,6	8	8
NV2310		
0	10	1 <sup>(1)</sup>

0,9	12	3
1,9	12	10
3,8	12	12
7,5	8	8

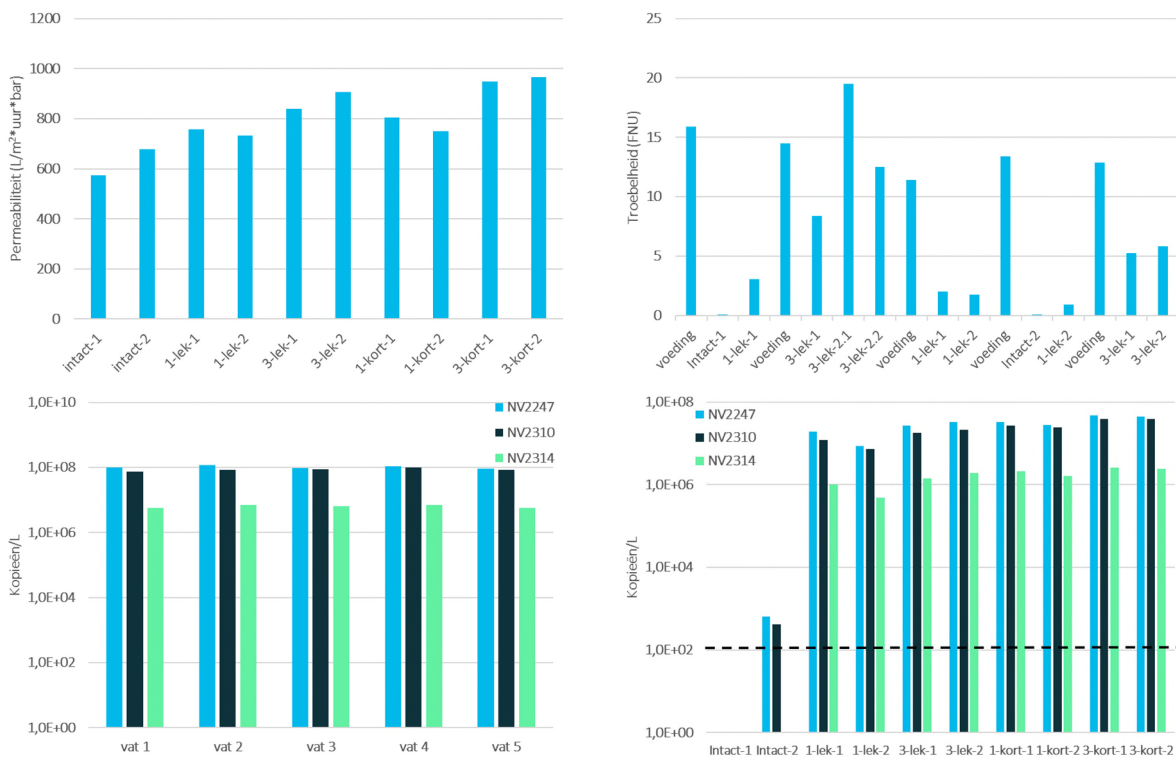
<sup>(1)</sup> Lage concentratie NV2310 aangetoond, dit monster is voor het bepalen van de LOD buiten beschouwing gelaten.

### Bepaling effect van centricon concentratiestap op kwantificatie

Meting:	1	2	3	4	Gem	SD	VC	Opbrengst t.o.v. direct*
<b>NV2247</b>								
300 µl (zonder centricon)	1,3E+08	1,4E+08	1,3E+08	1,4E+08	1,4E+08	6,1E+06	4,5	
50 ml (met centricon)	1,2E+08	1,3E+08	1,2E+08	1,2E+08	1,2E+08	4,6E+06	3,8	88,3%
1000 ml (met centricon)	9,5E+07	9,7E+07	1,1E+08	1,1E+08	1,0E+08	8,3E+06	8,0	75,9%
<b>NV2310</b>								
300 µl (zonder centricon)	1,3E+08	1,3E+08	1,4E+08	1,5E+08	1,4E+08	9,4E+06	6,8	
50 ml (met centricon)	1,3E+08	1,2E+08	1,2E+08	1,2E+08	1,2E+08	3,0E+06	2,4	90,2%
1000 ml (met centricon)	7,4E+07	9,5E+07	9,7E+07	9,2E+07	9,0E+07	1,1E+07	11,8	65,5%
<b>NV2314</b>								
300 µl (zonder centricon)	5,4E+06	6,0E+06	6,4E+06	7,2E+06	6,2E+06	7,7E+05	12,4	
50 ml (met centricon)	7,3E+06	8,0E+06	7,6E+06	6,5E+06	7,4E+06	6,3E+05	8,6	118,6%
1000 ml (met centricon)	6,0E+06	6,1E+06	7,1E+06	6,8E+06	6,5E+06	5,3E+05	8,2	104,5%

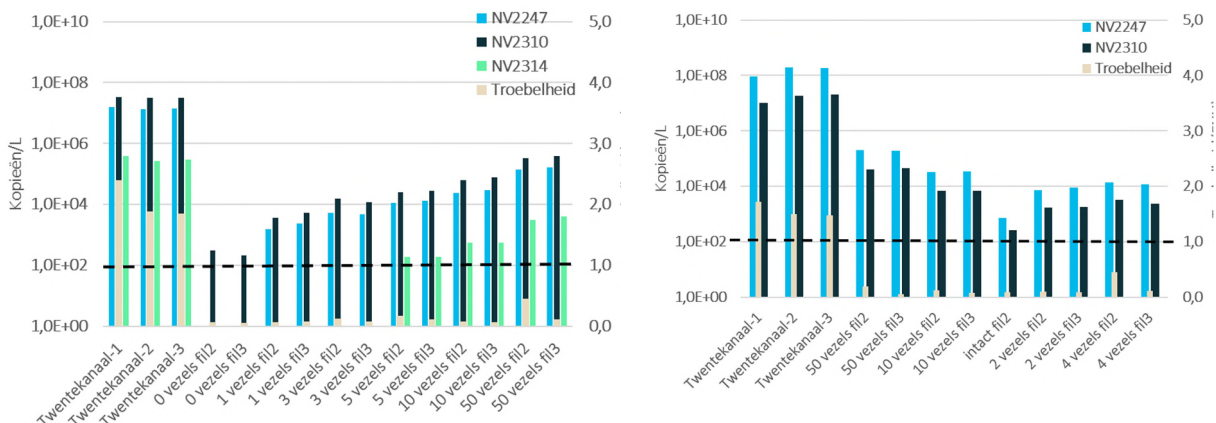
# Bijlage 2. Grafieken met resultaten invloed vezelbreuk op integriteit UF-membraan op lab- en pilotschaal

## Laboratoriumtesten met TRX300 module



**Figuur B2-1** Gemeten en geanalyseerde data tijdens testen invloed vezelbreuk op membraanintegriteit met TRX300 module. Linksboven: gemeten SWF, Rechtsboven: Gemeten troebelheid, Linksonder: Concentraties NV in voeding, Rechtsonder: Concentraties NV permeaat, gestreepte lijn is de onderste analysegrens voor de NV concentraties

## Pilottesten met 8'' UF module



**Figuur B2-2** Gemeten en geanalyseerde data tijdens testen met een 8'' UF-module waarbij eerste vezels zijn beschadigd, vervolgens gerepareerd en daarna weer beschadigd. Gestreepte lijn is de onderste analysegrens voor de NV concentraties

# Bijlage 3. Memo Invloed membraanbeschadiging en reiniging op integriteit 4" spiraalgewonden RO-membranen (onderzoek Oasen)

## 1 Inleiding:

Omgekeerde osmose kan virussen en bacteriën in hoge mate verwijderen (desinfectie), omdat de poriën veel kleiner zijn dan de afmeting van een virus. Membraansystemen kunnen echter falen, bijvoorbeeld door onderbroken lijmnaden in membraanmodules, lekkages bij interconnectoren of endcaps, of door schade aan het membraanoppervlak. Oasen wil experimenten uitvoeren waarbij in 5 situaties de voeding en het permeaat van een RO installatie geanalyseerd wordt met gPCR op vier targets Natuurlijke Virussen (NV). Het gaat om een 'nulmeting' waarbij het membraan intact is en 4 situaties waarbij er een 'beschadiging' is aangebracht aan het membraan. Hiermee wil Oasen de logverwijdering bepaald hebben bij elke situatie van het RO systeem aan de hand van de NV-metingen.

In dit memo, wordt uitgevoerde testen beschreven en vervolgens resultaat ervan kort geïnterpreteerd.



23 juli 2020

Status  
ter informatie

## 2 Test opstelling

Om de test uit te voeren gaan we onderstaande 4" RO pilot opstelling gebruiken, waarin drie 4 inch membranen parallel zijn geplaatst:



### 2.1. Pilot instellingen

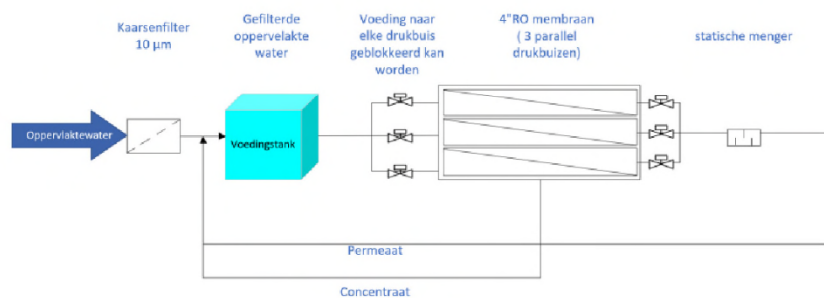
- One-stage RO met 3 parallel drukbuizen en elke drukbuis bevat een element.
- Membraan type : ESPA2 MAX 4"
- Productie debiet: 112 l/uur per membraan element
- Druk : (zal wel PN16 zijn, is voldoende)
- Flux : 15 LMH
- Recovery : 70-72%
- Voedingstank inhoud: 720 l

**oasen**  
drinkwater

23 juli 2020

Status  
ter informatie

Figuur 1. Pilot opstelling inclusief waterstromen



#### Opmerkingen bij pilot:

- 1) Zoals te zien is in bovenstaande pilot schema, worden drie drukbuizen parallel gevoed met 700 l gefilterde oppervlaktewater, met een gezamenlijke permeaat afvoer. Permeaat monster zijn genomen van verzameld monsterpunt na statische menger om een **om een goede mengen** tussen permeaat van alle buizen te garanderen.
- 2) Tijdens het uitvoeren van de test wordt permeaat debiet van iedere drukbuis apart gemeten om ervoor te zorgen dat **permeaat debiet van beschadigde drukbuis gelijk blijft als andere drukbuizen** na iedere manipulaties.



Daarmee wordt het voorkomen dat de beschadigde module meer aan de totale waterstroom van drie modules bijdraagt.

## 2.2. bron

### 700 l gefilterde oppervlakte water uit het gracht:

Water uit gracht ( oppervlaktewater) wordt gefilterd met een 10 micrometer kaarsenfilter en daarna wordt het in de voedingstank opgeslagen en permeaat e concentraat worden gecirculeerd. Er zijn echter gedurende test periode iedere dag metingen uitgevoerd en zijn er 5 keer NV monsters genomen daarom werd tank tussentijd bijgevuld met 10 l water om water niveau in voedingstank constant te houden.

## 2.3. Metingen

- Bij KWR wordt er een aantal natuurlijke virussen geselecteerd, die als procesmarker voor virusverwijdering door drinkwaterprocessen worden gebruiken. Door de aantallen virussen te meten voor en na de behandelstap, kun je de afname van de virussen bepalen, en zo de logreductie van deze virussen vaststellen. De aanname is dat de verwijdering van deze virussen een goede maat is voor de verwijdering van humaan pathogene virussen. Op deze wijze kan een drinkwaterproductieproces worden geëvalueerd voor virusverwijdering.
- Dagelijks handmatig meten van geleidbaarheid in voeding en permeaat water.



23 juli 2020

Status  
ter informatie

## 3 Experimenten

### 3.1.1. Stabiliteit test

Test 1: Voordat we RO gaan beschadigen wordt er NV monsters genomen van voeding en verzameld permeaat. Dit wordt gebruikt als nulmeting.

### 3.1.2. Water kwaliteit verandering controleren

Onderstaande testen zijn bedoeld om membranen stap voor stap te 'beschadigen' waardoor de kwaliteit van het gezamenlijke permeaat negatief beïnvloed wordt. De logverwijdering van het RO systeem kan bij elke verandering (testen 2 t/m 5) worden bepaald door natuurlijke virussen in voeding en permeaat te meten.

Test 2:

Manipuleren van permeaat kwaliteit door pilot instelling te veranderen, bijvoorbeeld op een hogere recovery/ lagere flux laten draaien waarmee de permeaat kwaliteit (licht) negatief wordt beïnvloed.

Test 3:

Afhalen van de o-ring (o-ring in de permeaat afvoer op de endcap) in drukbuis 1. Daarmee introduceren we een lekkage in de system.

Test 4:

Fysieke beschadiging van membraan in drukbuis 2 door er een gatje in te boren.

Test 5:

Beschadigen van alle membranen door chloorbleekloog in het voedingswater te doseren? Door het chloor wordt de membraantoplaag beschadigd. Naar verwachting is geen grote dosering van chloor nodig. Het membraan is al snel beschadigd. Dit kan makkelijk door chloorbleekloog in de voedingstank toe te voegen.



23 juli 2020

Status  
ter informatie

## 4 Resultaat:

### 4.1. Logboek

Om een beeld te geven over activiteiten gedurende test periode hebben we een logboek bijgehouden van belangrijke werkzaamheden.

Tabel 1. Logboek test periode

Test ID	Datum	Tijd	Werkzaamheden
1	27-5-2020	11:30	Nieuw kaarsenfilter geplaatst
1	27-5-2020	12:00	Voedingstank gevuld met water uit gracht voorbehandeld met 10 µm kaarsenfilter
1	27-5-2020	13:00	Start stabilisatie test
1	29-5-2020	11:00	Monster 1 naar KWR
1	2-6-2020	00:00	Eind stabilisatie test
2	2-6-2020	10:45-11:45	Voedingswater verversen : Om tempratuur en bedrijfsvoering van RO installatie zo stabiel mogelijk te houden is afvoer en toevoer tegelijk opengemaakt zodat water geleidelijk verversen met lage debiet.
2a	2-6-2020	11:55-12:00	RO instelling veranderen : Flux 15 l/mh naar 10 l/mh
2a	2-6-2020	11:45-12:30	Voedingstank bij verversen per ongeluk leeggelopen -> leegloop klep niet helemaal dicht gedaan!
2a	2-6-2020	12:30-12:35	Voedingstank was bijna leeg om uitvallen van installatie te voorkomen is voedingstank met een hoge debiet bijgevuld. -> Dit leed tot een tijdelijke tempratuur verhoging in de system daarna is tempratuur verlaagd door koelingselement.
2a	3-6-2020	08:15	Monster 2 naar KWR
2b	3-6-2020	08:30	RO instelling veranderen : Flux 10 l/mh naar 15 l/mh
3a	3-6-2020	14:30-15:10	O-ring wordt uitgehaald -> lekkage van concentraat in permeaat
3a	4-6-2020	11:30	Monster 3 naar KWR
3b	4-6-2020	12:20-12:42	O-ring teruggezet -> Terug naar oorspronkelijke situatie
4a	5-6-2020	10:45-11:00	2 gaatjes van 4 mm met een diepte van 3cm in een membraan geboord.
4a	5-6-2020	14:15	voedingstank bijgevuld met 10 l water uit gracht voorbehandeld met 10 µm kaarsenfilter
4a	8-6-2020	10:05	Monster 4 naar KWR
4b	8-6-2020	10:10	beschadigde RO membraan uitgeschakeld -> van 3 drukbuizen naar 2 drukbuizen en flux 15 l/mh
5	8-6-2020	13:15	30 ml chloor toegevoerd in voedingstank -> 2,5 mg/l vrij chloor
5	9-6-2020	10:45	Monster 5 naar KWR



23 juli 2020

Status ter informatie

#### 4.2. Aanpassing van testplan

Tijdens uitvoeren van testen zijn er paar aanpassingen toegebracht in oorspronkelijke test plan:

- 1) Voedingswater blijft gedurende test hetzelfde en na test 2 is er geen verversen van voedingswater plaatsgevonden. Dit om te voorkomen dat voedingswaterkwaliteit veranderd tijdens uitvoeren van test aangezien dat waterkwaliteit in de gracht kan veranderd worden.
- 2) Om effect van elke test apart te kunnen onderzoeken hebben we na elke test pilot opstelling naar oorspronkelijke situatie teruggebracht voordat we met volgende test gaan beginnen. Verder zat minimaal 4 uur tijd tussen veranderingen zodat permeaat waterkwaliteit gestabiliseerd wordt.
- 3) Bij terug naar oorspronkelijke situatie is bedoeld:  
Stabilisatie test 1 -> test 2: flux van 15 l/mh naar 10 LMH -> terug naar 15 l/mh -> test 3: O-ring uitgehaald -> O-ring terugzetten -> gaatjes ingeboord -> beschadigde membraan geblokkeerd -> toevoegen van chloor in voedingswater.
- 4) Toegevoegde chloor limiteren: op die manier worden membranen niet helemaal beschadigd zoals het was beschrijven in testplan. Hoeveelheid chloor wordt berekend op basis van ingeschatte TOC met de doel om 2,5 mg/l vrij chloor in voedingswater te hebben. Berekening van hoeveelheid NaOCl was als volgt:

Tabel 2. Berekening van NaOCl

Dichtheid NaOCl	1200	g/l
NaOCl	12,5%	% (g/g)
NaOCl	150	g/l
Molaire massa NaOCl	74,44	g/mol
Molaire massa Cl	35,5	g/mol
Molaire massa Cl <sub>2</sub>	71	g/mol
Ingeschade TOC waarde in voedingswater	6,7	g/l
Chloordosering (mg/l) = [0,72 x TOC (mg/l C)] + 0,97	5,79	mg/l
benodigde hoeveelheid in 1 l water	0,039	ml
benodigde hoeveelheid in 700 l water	27	ml



23 juli 2020

Status  
ter informatie

Omdat TOC waarde is ingeschat op basis van metingen van vorig jaar hebben we proef vriendelijk hoeveelheid vrij chloor bij verschillende doses van NaOCl in voedingswater getest. in totaal 3 metingen gehad:

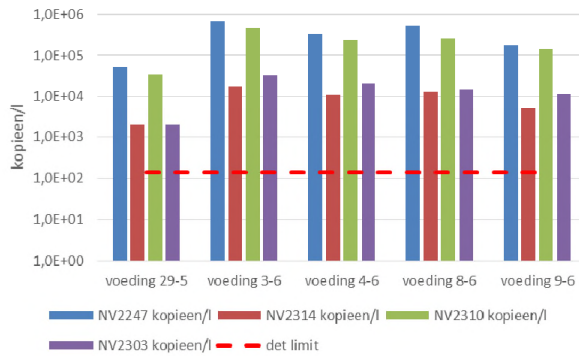
Hoeveelheid chloor dosering in 1 l water (µl)	vrij chloor meting lab (mg/l)
200	16
100	11
40	2,5

Dus bij 0,04 ml chloor in een liter water -> 2,5 mg/ vrij chloor -> 700 l water hebben we  $700 \times 0,04 = 28$  ml chloor nodig om 2,5 mg/l vrij chloor in water blijft dat komt overheen met berekende waarde op basis van ingeschatte TOC.

4.3. Resultaat per test

Opmerkingen bij interpretatie resultaten:

NV : Voor deze analyse zijn de volgende virusmerkers geselecteerd: NV2247, NV2303, NV2310 en NV2314. Virusmerkers NV2247, NV2310 en NV2314 worden in de tot nu toe geteste oppervlaktewateren altijd aangetroffen in hoge concentratie, en zijn daarmee goede procesmarkers. NV2303 is tot nu toe minder getest, maar komt ook voor in oppervlaktewater, en is daarom in dit onderzoek meegenomen.



- Virusmerkers NV2247 en NV2310 komen in de hoogste concentratie voor in alle voedingswatermonsters. De merkers NV2314 en NV2303 zijn in aantal een ruime logeenheid lager dan NV2247 en NV2310. Opvallend is dat het voedingswater op 29-05 duidelijk minder virussen bevat dan het voedingswater van de andere data. Dit was omdat water na test 1 een keer is verversd daarom waterkwaliteit veranderd. Verder zijn de virusaantallen van alle merkers laag ten opzichte van wat normaalgesproken in oppervlaktewater wordt gevonden. Waarschijnlijk komt dit door recirculatie van het water waardoor mogelijk een deel van virussen op membraan oppervlakte blijven hangen en worden niet gecirculeerd naar voedingstank.
- Om de verwijdering van de RO te bepalen worden de virusaantallen in het voedingswater vergeleken met de virusaantallen na de RO. **Hoe hoger de concentratie in het water voor de RO is, hoe groter de logverwijdering is die kan worden bepaald.** Daarom zijn de virussen NV2247 en NV2310 in dit geval informatiever dan virussen NV2314 en NV2303, want daarvan is het verschil tussen voedingswater en de detectiegrens kleiner.



23 juli 2020

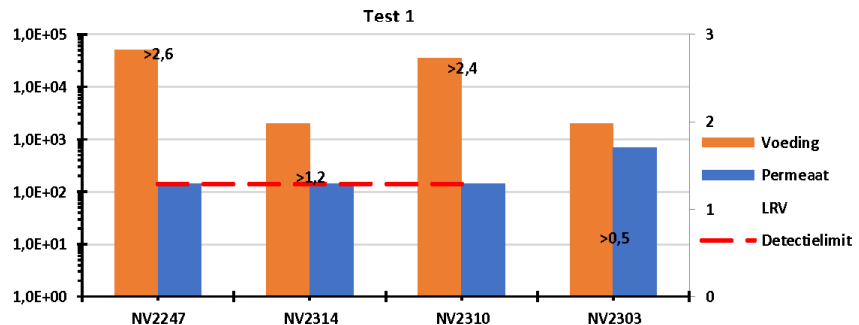
Status ter informatie

Test 1: Stabilisatie

Tussen periode van 27-05 tot 2-6 is pilot gedraaid zonder verandering in instelling en bedrijfsvoering.

Figuur 2 laat het resultaat van natuurlijke virussen na stabilisatie van pilot zien. De natuurlijke virusmerkers worden in het voedingswater aangetroffen, echter in een lagere concentratie dan gebruikelijk. Mogelijk omdat door recirculatie een deel van virussen op membraan oppervlakte achterblijven. Daarom een max logverwijdering van 2.6 was aantoonbaar.

Figuur 2. Natuurlijke virussen gemeten op 29-05-2020 na stabilisatie van pilot

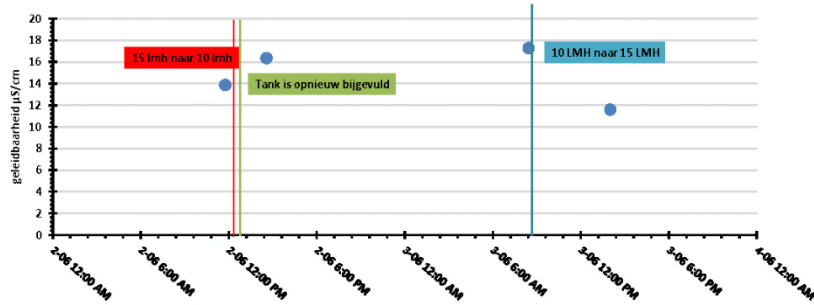


Opmerking 1. Detectiegrens ligt bij dit virus op 6,9E +02

**Test 2: Flux verlaging**

Het verversen van de inhoud van de tank in combinatie met het deels open laten staan van leeglopenklep van de voedingstank waardoor tank leeggelopen en op een hoge debiet bijgevoerd moest worden leidt tot een grote verandering van de watertemperatuur en lichte verandering in de waterkwaliteit van voedingswater. Daarom is het Effect van flux verlaging niet duidelijk te zien. Het is echter bij teruggaan naar 15 LMH is de verbetering van permeaat kwaliteit in geleidbaarheid metingen.

*Figuur 3. Geleidbaarheid van permeaat tijdens test 2 (instellingen manipuleren)*

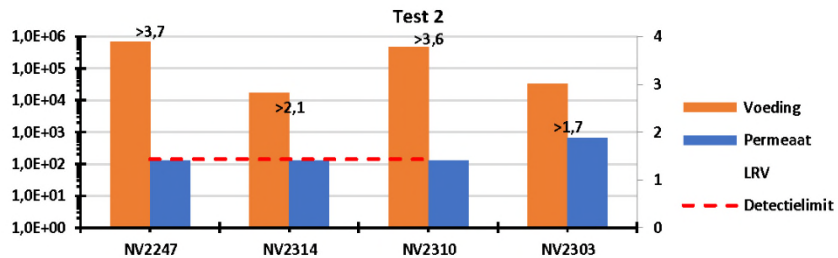


De effect van verlaging van flux van 15 lmb naar 10 lmb echter is niet aantoonbaar met NV metingen aangezien dat het resultaat naast verandering in flux ook beïnvloed door waterkwaliteit verandering als gevolg van verversen van water. De monsters van 29-5 en 3-6 verwijderen de virussen tot onder de detectiegrens, waarbij de LRV (Log Reduction Value) op 3-6 groter is, omdat er meer virussen in het voedingswater aanwezig zijn.

*Figuur 4. Natuurlijke virussen gemeten op 03-06-2020 na instelling test (flux van 15 na 10 lmb)*



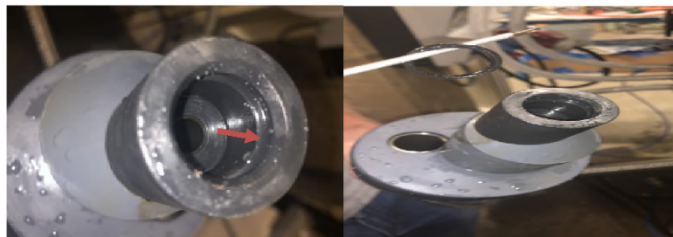
23 juli 2020  
Status ter informatie



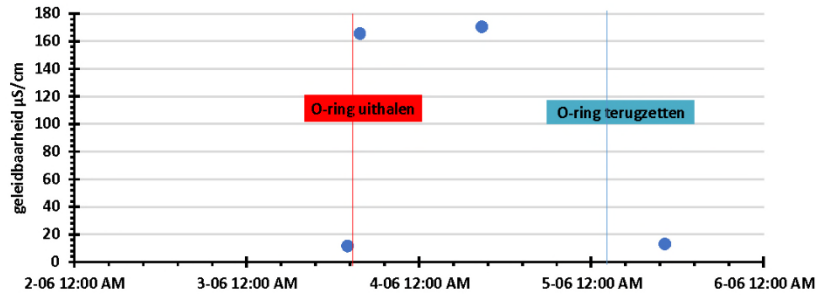
**Test 3: O-ring uithalen**

Om de O-ring van een drukbuis uit te halen is een betreffende drukbuis geïsoleerd waardoor de RO-installatie tijdelijk op 2 membraan filters draaide en na verwijderen van O-ring is die weer bijgeschakeld. Deze manipulatie had een grote effect op geleidbaarheid van permeaat.

*Figuur 5. Uithalen van O-ring op 3-6.*



Figuur 6. Geleidbaarheid van permeaat tijdens test 3



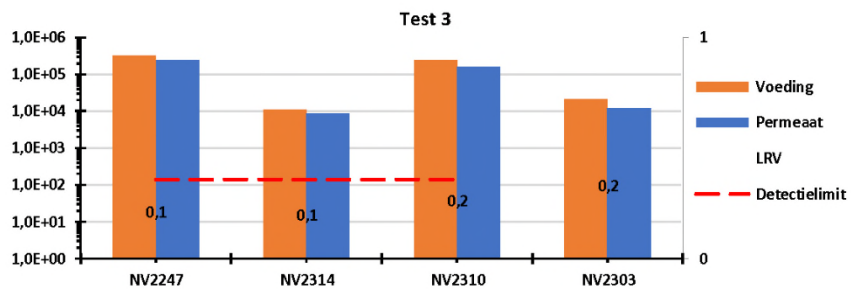
Resultaat van natuurlijke virussen laat een zeer geringe verwijdering van 0,1-0,2 log te zien. Wat hier wel opvallend is, is dat de resultaten laten nagenoeg geen virusverwijdering zien terwijl permeaat water was mix van permeaat uit 3 membraan waarvan we alleen 1 membraan beschadigde dus mix water moest in principe toch lagere aantal virussen bevatten door de menging met permeaat van 2 andere NIET beschadigde membranen! Op basis ervan kunnen we concluderen dat als een membraan in een stack beschadigd is gaat enorme doorslag van virussen geven ondanks mengen met permeaat van andere membranen! Aangezien dat monster na statische menging genomen is kan het ook niet op onvoldoende menging liggen. Op geleidbaarheid hebben we wel gezien dat die geleidbaarheid van permeaat gelijk is gestegen na bijgeschakelen van membraan zonder O-ring maar het was ongeveer 1/4 van voedingswater geleidbaarheid.

Figuur 7. Natuurlijke virussen gemeten op 04-06-2020 na uithalen van O-ring



23 juli 2020

Status ter informatie



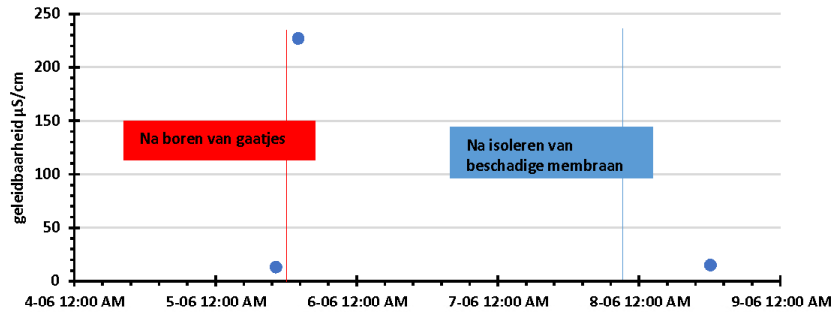
**Test 4: Gaatjes boren in membraan**

Om membraan te beschadigen is een drukbuis geïsoleerd waardoor de RO-installatie tijdelijk op 2 membraan filters draaide en na boren van 2 gaatjes van 4mm met een diepte van 4 cm is die weer bijgeschakeld. Deze manipulatie had een grote effect op geleidbaarheid van permeaat.

Figuur 8. Gaatjes in membraan 2 op 5-6-2020



Figuur 9. Geleidbaarheid van permeaat tijdens test 4



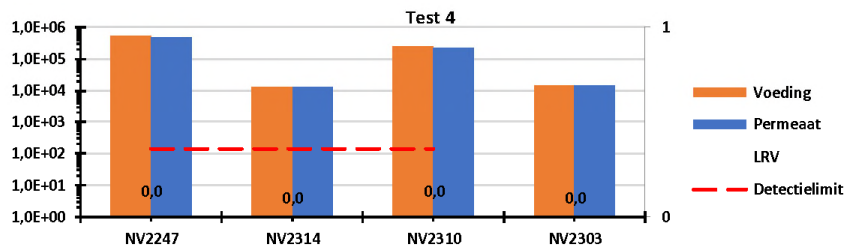
Resultaat van natuurlijke virussen laat geen logverwijdering te zien. Dit bevestigt vorige resultaat van test 3 waarin als een membraan in een stack beschadigd is gaat enorme doorslag van virussen geven ondanks mengen met permeaat van andere membranen! Naast verzameld permeaat, is permeaat van beschadigde membraan gemeten. De geleidbaarheid van permeaat van beschadigde membraan was gelijk met voedingswater wat betekent dan membraan met gaatjes doet helemaal niks meer. Op geleidbaarheid van verzameld permeaat hebben we gezien dat die geleidbaarheid van permeaat gelijk is gestegen na bijshakelen van beschadigde membraan maar het was 1/3 van voedingswater geleidbaarheid.

Figuur 10. Natuurlijke virussen gemeten op 08-06-2020 na beschadigen van een membraan



23 juli 2020

Status ter informatie



**Test 5: Chloor doseren**

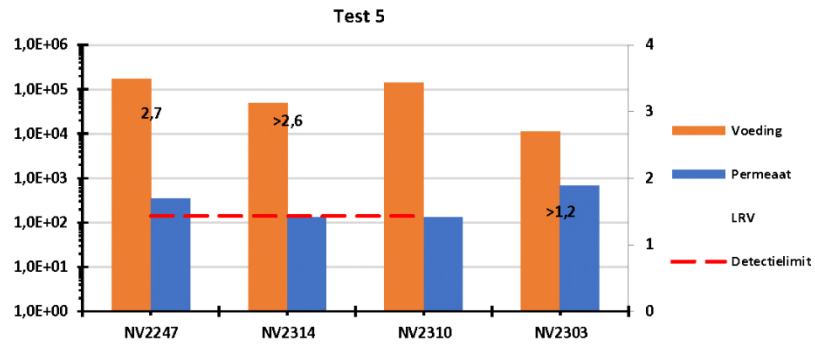
Contact met chloor leidt tot beschadigen van membraantoplaag en het verlies van integriteit van de membranen. Door mogelijke verslechtering van het scheidende vermogen van de membranen, kan een kwaliteitsverlies van het behandelde water optreden(BTO 2005.060).

om effect van chloor op permeaat kwaliteit te kunnen testen is 30 ml NaOCl is toegevoegd in voedingstank met inhoud van 700l.

Natuurlijke virussen monster is een dag later op 9 juni genomen. Het resultaat laat voor NV2247 een **bijna** volledige, en voor NV2310, NV2314 en NV2303 een volledige virusverwijdering zien. Inzomen in permeaat waarde voor NV2247 laat een lichte verslechtering van permeaat waterkwaliteit zien. Het is echter in voedingswater van pilot, het aantal virussen i.v.m. afgelopen dag gedaald wat kan waarschijnlijk verklaard worden door desinfectie effect van chloor.



Figuur 11. Natuurlijke virussen gemeten op 09-06-2020 na beschadigen van een membraan



23 juli 2020

Status  
ter informatie

## 5 Conclusie

- De natuurlijke virusmarkers worden in het voedingswater aangetroffen, echter in een lagere concentratie dan gebruikelijk. De monsternamen tijdens test 1 en 2 laten een volledige virusverwijdering zien. De monsternamen tijdens test 3 en 4 laten nagenoeg geen en helemaal geen virusverwijdering zien. De monsternamen van test 5 laten een kleine doorslag van het meest voorkomende aanwezige virusmarker in voedingswater, in permeaat te zien.
- Resultaat van natuurlijke virussen laat geen verwijdering te zien in test 3 en 4 wat betekent als een membraan in een stack beschadigd wordt gaat enorme doorslag van virussen geven ondanks mengen met permeaat van andere membranen in stack! Dat is terwijl geleidbaarheid deels verhoogd in verzameld permeaat.
- In resultaat van test 5 is een lichte verslechtering in permeaat waterkwaliteit waargenomen zoals er verwacht wordt. Effect van chloor doseren was echter heel klein vanwege korte doseertijd/contacttijd tussen chloor en membraan oppervlakte. Dit is omdat concentratie van actief chloor door de tijd afzakt.



23 juli 2020

Status  
ter informatie

## 6 Discussie en aanbevelingen

- 1) Het voedingswater bevatte relatief weinig virussen. In bijna alle eerder geanalyseerde oppervlaktewatermonsters waren de aantallen 1 tot 2 log hoger. De eerste gedachten zijn dat dit door recirculatie van voedingswater komt omdat een deel van virussen blijven op RO membraan zitten en komen niet naar Voedingstank terug. Om dit verder te onderzoeken wordt er aanbevelen dat in een vervolg onderzoek ook een direct oppervlaktewatermonster nemen, om te bepalen of de virussen ook geleidelijk afnemen door het circuleren in de installatie of niet.
- 2) Bij uitgevoerde beschadigingen in dit onderzoek is het effect van manipulatie uitgevoerd in test 3 en 4 onderschat waardoor beschadiging leidde tot bijna 100% fictionaliteit verlies van membraan. Daarom bij vervolg onderzoeken wordt er aanbevelen dat beschadiging minimaliseren zodat het beter vergelijkbaar zou zijn met praktijk situatie. het onderstaande testen kan wordt uitgevoerd:
  - O-ring klein beetje beschadigen door bijvoorbeeld een stukje ervan knippen en die weer terugzetten. Op die manier wordt er extreme lekkage van concentraat naar permeaat voorkomen.
  - In plaats van boren van 2 gat, 1 gaat me minimum diepte en kleinere diameter in membraan te boren.
- 3) Om effect van chloor on membraan beschadiging beter te zien wordt er aanbevelen dat contacttijd tussen membraan en chloor vergroten om bijvoorbeeld doseer hoeveelheid verhogen of langer gaan doseren.



23 juli 2020

Status  
ter informatie

Bijlage : Resultaat per virusmarkers

Opgenomen monsters:

- 29-05 -> geen beschadiging -> nul meting
- 3-06 -> alleen instelling wordt veranderd -> van 15 l/mh naar 10 l/mh
- 4-06 -> instelling terug gezet naar 15 l/mh en O-ring van een membraan uitgehaald
- 8-06 -> O-ring teruggezet en in een van die membranen geboord
- 9-06 -> chloor toegevoegd in voedingswater

Datum	Code
Monstername	Opdrachtgever
29-5-2020	voeding
29-5-2020	permeaat RO
3-6-2020	voeding
3-6-2020	permeaat RO
4-6-2020	voeding
4-6-2020	permeaat RO
8-6-2020	voeding
8-6-2020	permeaat RO
9-6-2020	voeding
9-6-2020	permeaat RO

Resultaten:

Tabel 1: Resultaten van alle testen uitgevoerd tussen 27-5 en 9-6-2020

Datum	Code	NV2247	NV2314	NV2310	NV2303
Monstername	Opdrachtgever	kopieen/l	kopieen/l	kopieen/l	kopieen/l
29-5-2020	voeding	5,1E+04	2,0E+03	3,5E+04	2,0E+03
29-5-2020	permeaat RO	<1,4E+02	<1,4E+02	<1,4E+02	<6,9E+02
3-6-2020	voeding	6,7E+05	1,7E+04	4,7E+05	3,3E+04
3-6-2020	permeaat RO	<1,3E+02	<1,3E+02	<1,3E+02	<6,4E+02
4-6-2020	voeding	3,2E+05	1,1E+04	2,4E+05	2,1E+04
4-6-2020	permeaat RO	2,4E+05	8,5E+03	1,6E+05	1,2E+04
8-6-2020	voeding	5,2E+05	1,3E+04	2,5E+05	1,5E+04
8-6-2020	permeaat RO	4,8E+05	1,3E+04	2,3E+05	1,5E+04
9-6-2020	voeding	1,7E+05	4,9E+03	1,4E+05	1,1E+04
9-6-2020	permeaat RO	3,5E+02	<1,3E+02	<1,3E+02	<6,8E+02

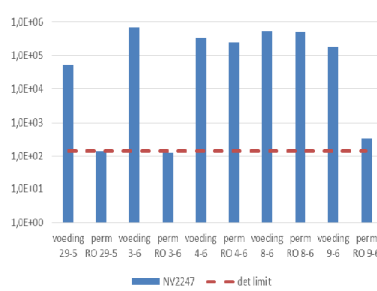


23 juli 2020

Status ter informatie

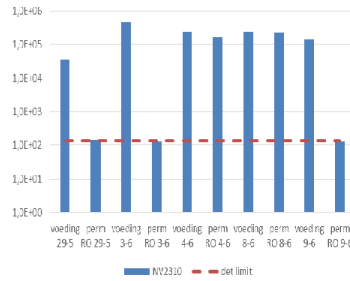
< betekent: onder de detectie grens.

NV2247:



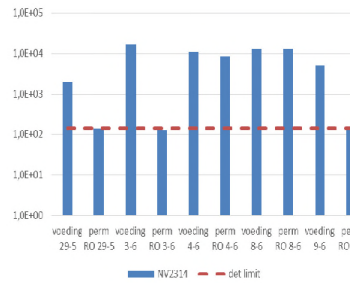
Code	NV2247	NV2247	
Opdrachtgever		log	Verwijdering
voeding 29-5	5,1E+04	4,7	
perm RO 29-5	1,4E+02	2,1	> 2,6
voeding 3-6	6,7E+05	5,8	
perm RO 3-6	1,3E+02	2,1	> 3,7
voeding 4-6	3,2E+05	5,5	
perm RO 4-6	2,4E+05	5,4	0,1
voeding 8-6	5,2E+05	5,7	
perm RO 8-6	4,8E+05	5,7	0,0
voeding 9-6	1,7E+05	5,2	
perm RO 9-6	3,5E+02	2,5	2,7
onder det grens			

**NV2310:**



Code	NV2310	NV2310	
Opdrachtgever		log	Verwijdering
voeding 29-5	3,5E+04	4,5	
perm RO 29-5	1,4E+02	2,1	> 2,4
voeding 3-6	4,7E+05	5,7	
perm RO 3-6	1,3E+02	2,1	> 3,6
voeding 4-6	2,4E+05	5,4	
perm RO 4-6	1,6E+05	5,2	0,2
voeding 8-6	2,5E+05	5,4	
perm RO 8-6	2,3E+05	5,4	0,0
voeding 9-6	1,4E+05	5,2	
perm RO 9-6	1,3E+02	2,1	> 3,0
onder det grens			

**NV2314:**



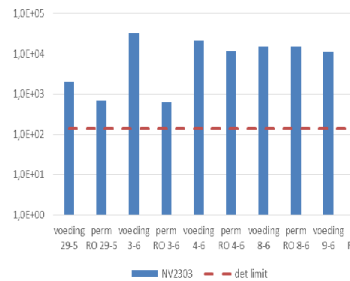
Code	NV2314	NV2314	
Opdrachtgever		log	Verwijdering
voeding 29-5	2,0E+03	3,3	
perm RO 29-5	1,4E+02	2,1	> 1,2
voeding 3-6	1,7E+04	4,2	
perm RO 3-6	1,3E+02	2,1	> 2,1
voeding 4-6	1,1E+04	4,0	
perm RO 4-6	8,5E+03	3,9	0,1
voeding 8-6	1,3E+04	4,1	
perm RO 8-6	1,3E+04	4,1	0,0
voeding 9-6	4,9E+03	3,7	
perm RO 9-6	1,3E+02	2,1	> 1,6
onder det grens			



23 juli 2020

Status ter informatie

**NV2303:**



Code	NV2303	NV2303	
Opdrachtgever		log	Verwijdering
voeding 29-5	2,0E+03	3,3	
perm RO 29-5	6,9E+02	2,8	> 0,5
voeding 3-6	3,3E+04	4,5	
perm RO 3-6	6,4E+02	2,8	> 1,7
voeding 4-6	2,1E+04	4,3	
perm RO 4-6	1,2E+04	4,1	0,3
voeding 8-6	1,5E+04	4,2	
perm RO 8-6	1,5E+04	4,2	0,0
voeding 9-6	1,1E+04	4,1	
perm RO 9-6	6,8E+02	2,8	> 1,2
onder det grens			

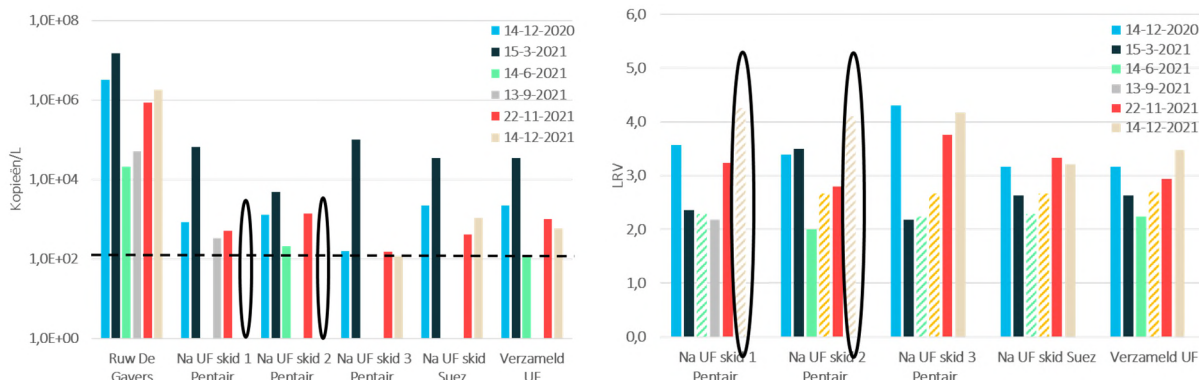
detectiegrens ligt bij dit virus op 6,9E +02

**Verwijdering van de verschillende experimenten:**

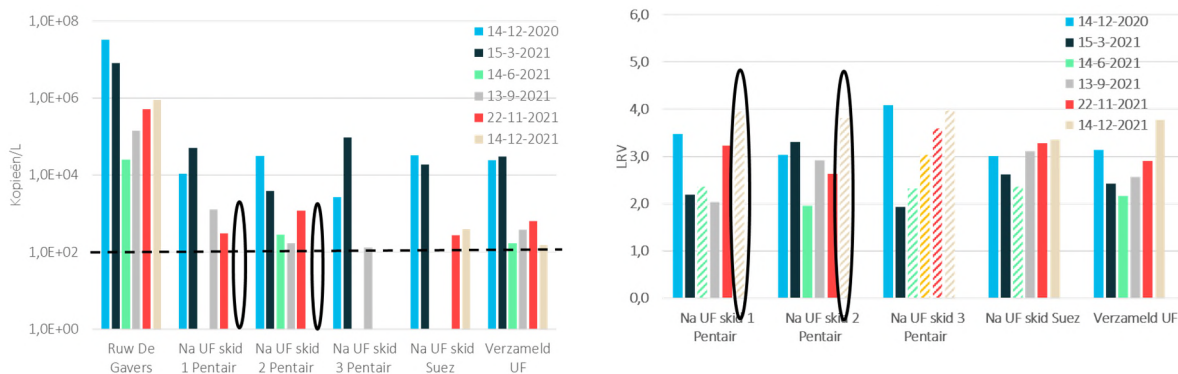
	NV2247	NV2314	NV2310	NV2303
	Verwijdering	Verwijdering	Verwijdering	Verwijdering
voeding 29-5				
perm RO 29-5	> 2,6	> 1,2	> 2,4	> 0,5
voeding 3-6				
perm RO 3-6	> 3,7	> 2,1	> 3,6	> 1,7
voeding 4-6				
perm RO 4-6	0,1	0,1	0,2	0,3
voeding 8-6				
perm RO 8-6	0,0	0,0	0,0	0,0
voeding 9-6				
perm RO 9-6	2,7	> 1,6	> 3,0	> 1,2

# Bijlage 4. Grafieken met NV resultaten monstercampagne UF-praktijkinstallaties

WPC De Gavers

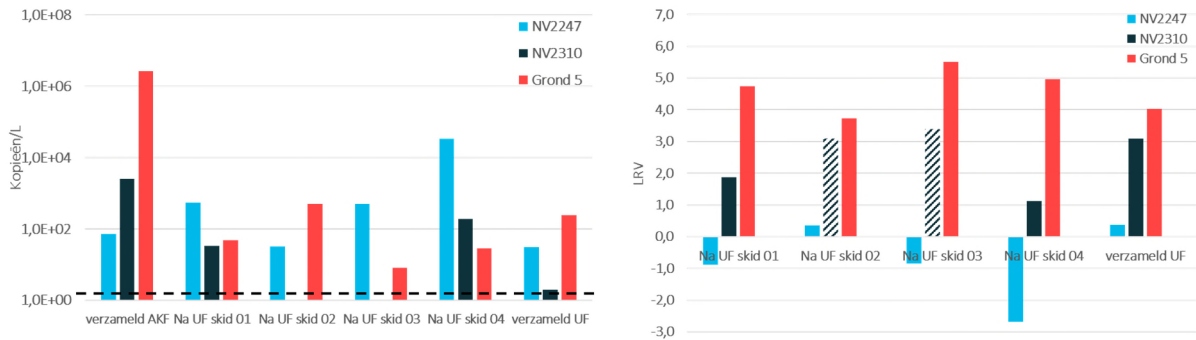


Figuur B3-1 Concentratie (links) en LRV NV 2247 ten opzichte van vorige processtap (rechts) NV van UF-praktijkinstallatie van WPC De Gavers tijdens monstercampagne. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekend LRV >. Omcirkelde balken zijn metingen na vervanging membranen.



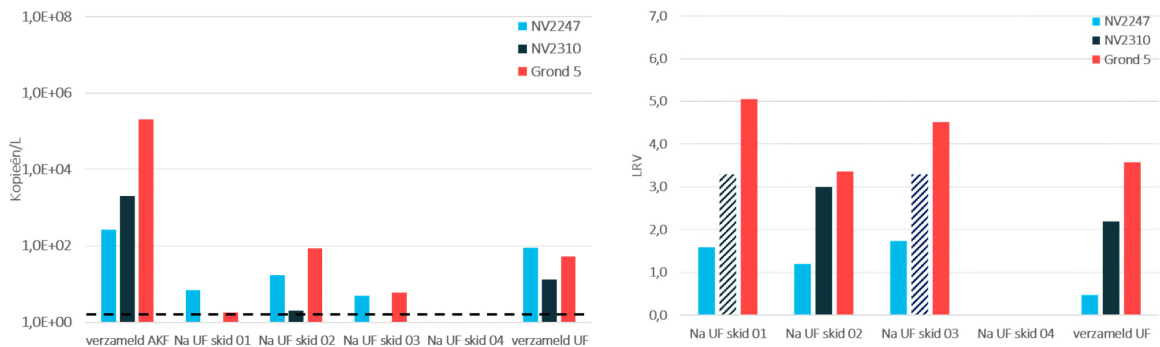
Figuur B3-2 Concentratie (links) en LRV NV 2314 ten opzichte van vorige processtap (rechts) NV van UF-praktijkinstallatie van WPC De Gavers tijdens monstercampagne. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekend LRV >. Omcirkelde balken zijn metingen na vervanging membranen.

PS Ouddorp



Figuur B3-3 Concentratie (links) en LRV van alle gemeten merkers ten opzichte van vorige processtap (rechts) van UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp tijdens monstercampagne 7\_8-7-2021. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekent LRV >.

Opvallend is dat tijdens de eerste monsternameronde in juli 2021 de LRV voor NV2247 negatief uitvalt (zie Figuur B3-3). Echter, doordat de concentraties NV2247 gemeten na UF skid 4 vrij hoog zijn (1 x 10<sup>4</sup> kopieën/L) en daarmee hoger dan gemeten in AKF verzameld tot nu toe, bestaat het vermoeden dat het hier gaat om een analysefout en worden de resultaten voor NV2247 van deze ronde buiten beschouwing gelaten.



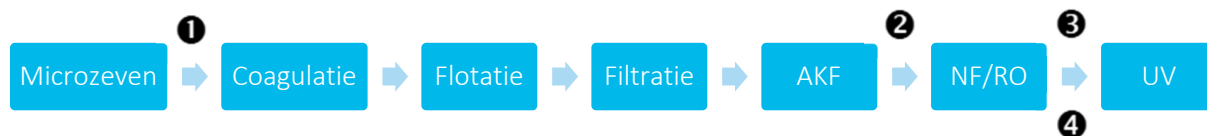
Figuur B3-4 Concentratie (links) en LRV van alle gemeten merkers ten opzichte van vorige processtap (rechts) van UF-praktijkinstallatie van PS Ouddorp tijdens monstercampagne 6-9-2021. Na skid 4 is niet gemeten. Gestreepte lijn links is de onderste analysegrens voor de NV concentratie. Gearceerde balken rechts betekent LRV >

## Bijlage 5. Memo Evides: Natuurlijke virussen voor integriteitsbewaking NF/RO

Aan: Projectgroep TKI Natuurlijke Virussen  
Van: Leonie Marang  
Nummer: TB-00551  
Datum: 18-01-2024  
Betreft: Meetresultaten natuurlijke virussen voor integriteitsbewaking NF/RO (pilot Baanhoek)

### Inleiding

Bij productielocatie Baanhoek (Dordrecht) wordt pilotonderzoek gedaan naar een nieuw zuiverings-concept voor de drinkwaterproductie uit oppervlaktewater. De pilotrein (Figuur 1) bestaat uit een conventionele voorzuivering gebaseerd op flotatie, gevolgd door actiefkoolfiltratie (AKF) en membraanfiltratie. Een belangrijke onderzoeksvraag is, hoe dicht de membranen moeten zijn om 1) biologisch stabiel drinkwater te produceren en 2) voldoende barrière te creëren tegen antropogene stoffen. Om die vraag te beantwoorden worden parallel nanofiltratie (NF) en omgekeerde osmose (RO) beproefd.



**Figuur 1. Schema zuiveringstrein pilot Baanhoek, inclusief monsterpunten t.b.v. bepaling natuurlijke virussen. De NF- en RO-installatie staan parallel opgesteld en worden gevoed met hetzelfde water. Zowel het NF- als het RO-permeaat is bemonsterd.**

De desinfectiecapaciteit van NF- en RO-membranen is in theorie zeer hoog, maar in de praktijk kunnen lekkages optreden, aan de membranen zelf of de installatie daaromheen (pakkingen etc.), die de daadwerkelijke verwijdering verlagen. Met de beschikbare methoden voor online bewaking van de membraanintegriteit, zoals sulfaatmetingen, kan slechts een beperkte logverwijdering (2-3 log<sub>10</sub>) worden gegarandeerd. Dit geldt in het bijzonder voor NF, gezien de partiele retentie van sulfaat en geleidbaarheid. Ook met periodieke grootvolumemetingen (1000 l) van indicatororganismen zoals *E. coli* of somatische colifagen, voor en na membraanfiltratie, is de aantoonbare verwijdering zeer beperkt (<2 log<sub>10</sub>) door de lage concentraties in het voedingswater. Daarom wordt bij Baanhoek onderzoek gedaan naar de verwijdering van natuurlijke virussen (NV), als mogelijke alternatieve indicator voor de membraanintegriteit en (virus)verwijdering door NF/RO.

### Meetprogramma

Vanaf januari 2023 zijn het ruwwater (1, Figuur 1), voedingswater van NF/RO (na kaarsenfilter, 2), NF-permeaat (3) en RO-permeaat (4) maandelijks bemonsterd ter bepaling van de concentratie natuurlijke virussen – NV2247, NV2310 en NV2314. Het monstervolume bedroeg op alle punten 1 liter.

De pilot wordt over het algemeen gevoed met oppervlaktewater uit de spaarbekken in de Biesbosch (BB). Van september t/m november 2023 is echter een test uitgevoerd met water uit het lokale bekken; Grote Rug (GR). De metingen lopen door in 2024 om de seizoensvariatie en eventuele membraanveroudering goed in beeld te kunnen brengen.

De membraaninstallaties bestaan beide uit drie stages en hebben een maximale capaciteit van 11 m<sup>3</sup>/uur. De flux kan gevarieerd worden tussen de 15 en 25 l/m<sup>2</sup>/uur bij een recovery tussen 80% en 87,7%. De NF-membranen



hebben een 'molecular weight cut-off' (MWCO) van 200-300 Da en zijn van het type FilmTec™ NF270-400/34i (stage 1) of NF270-4040 (stage 2 en 3), DuPont. De RO-membranen hebben een MWCO van <200 Da en zijn van het type FilmTec™ ECO Pro-400i (stage 1) of LC LE-4040 (stage 2 en 3), eveneens DuPont.

## Resultaten

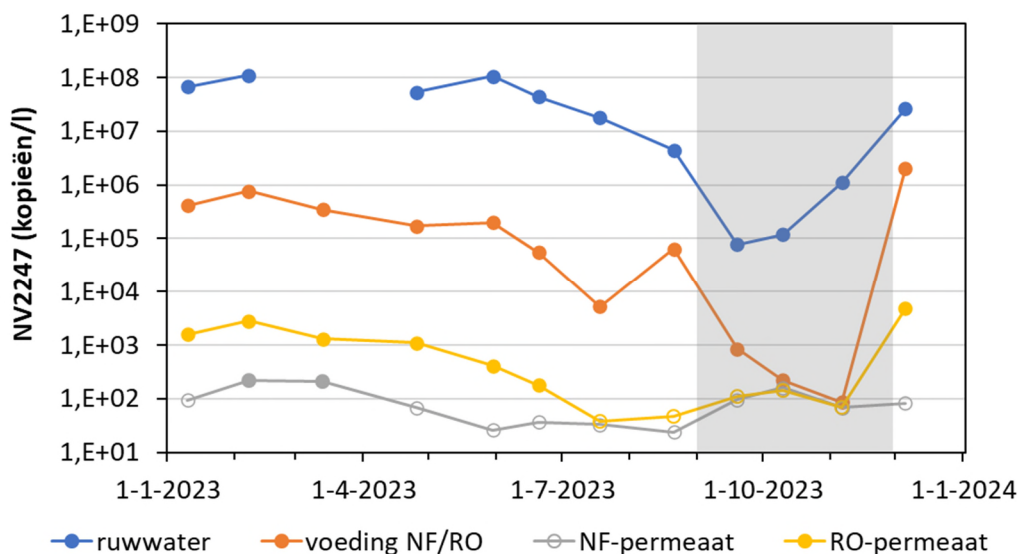
### Ruwwater

De natuurlijke virussen, met name NV2247 en NV2310, zijn in zeer hoge concentratie aanwezig in het ruwwater uit de Biesbosch-bekkens ( $10^7$  kopieën/l, Tabel 1). De concentratie van NV2247 is gemiddeld het hoogst, maar lijkt meer te variëren over het jaar dan de concentratie NV2310 (Figuur 2 en 3). De concentratie van NV2314 ligt ca.  $1,5 \log_{10}$  lager ( $10^6$  kopieën/l, Tabel 1); dit is ook bij andere studies waargenomen.

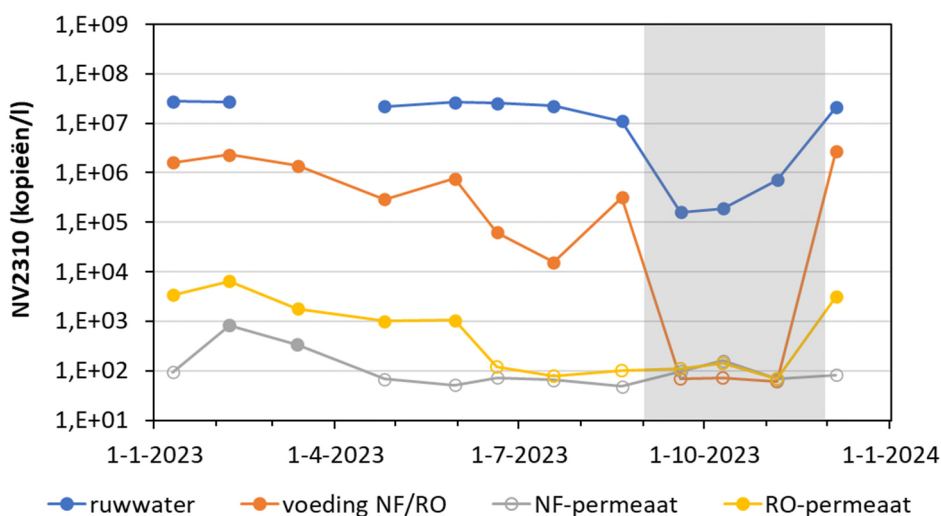
Tabel 1. Gemiddelde concentratie natuurlijke virussen ( $\pm$ standaarddeviatie; kopieën/l) – NV2247, NV2310 en NV2314 – gemeten over de zuiveringslijn van de pilot, en de berekende gemiddelde logverwijdering ( $\log_{10}$ ). Getallen zijn gebaseerd op de 9 meetronden bij gebruik van Biesbosch-water (BB), tussen januari en december 2023.

Concentratie (kopieën/l)	Ruwwater (BB)	Voeding NF/RO	NF permeaat	RO permeaat
NV2247	$5,3 \times 10^7$ $\pm 3,9 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$ $\pm 5,9 \times 10^5$	$88 \pm 77^*$	$1.364 \pm 1.573$
NV2310	$2,3 \times 10^7$ $\pm 0,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$ $\pm 0,9 \times 10^6$	$180 \pm 252^*$	$1.906 \pm 2.124$
NV2314	$1,1 \times 10^6$ $\pm 0,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$ $\pm 1,8 \times 10^4$	$62 \pm 34^*$	$63 \pm 34^*$
Verwijdering ( $\log_{10}$ )		VZ + AKF	NF	RO
NV2247		2,4 ( $\pm 0,7$ )	>3,4 ( $\pm 0,6$ )	2,5 ( $\pm 0,3$ )
NV2310		1,7 ( $\pm 0,8$ )	>3,6 ( $\pm 0,7$ )	2,8 ( $\pm 0,3$ )
NV2314		2,1 ( $\pm 0,7$ )	>2,2 ( $\pm 0,5$ )	>2,2 ( $\pm 0,5$ )

\* Meerdere/alle metingen onder detectiegrens. Bij berekening van de gemiddelde concentratie en logverwijdering is gerekend met de gerapporteerde detectiegrens (worst-case benadering).



Figuur 2. Concentratie NV2247 (kopieën/l) gemeten in het ruwwater (blauw), voedingswater NF/RO (oranje), NF-permeaat (grijs) en RO-permeaat (geel), tussen januari en december 2023. In de periode van september t/m november (grijs gearceerd) werd de pilot gevoed met lokaal bekkenwater i.p.v. BB-water. Bij meetresultaten onder de rapportagegrens is de indicatieve waarde/detectiegrens weergegeven met een open bolletje.



Figuur 3. Concentratie NV2310 (kopieën/l) gemeten in het ruwwater (blauw), voedingswater NF/RO (oranje), NF-permeaat (grijs) en RO-permeaat (geel), tussen januari en december 2023. In de periode van september t/m november (grijs gearceerd) werd de pilot gevoed met lokaal bekkenwater i.p.v. BB-water. Bij meetresultaten onder de rapportagegrens is de indicatieve waarde/detectiegrens weergegeven met een open bolletje.

Van september t/m november 2023 is de pilot gevoed met water uit het lokale bekken, Grote Rug. De concentratie van alle drie de natuurlijke virussen lag hierin aanzienlijk (ca.  $2 \log_{10}$ ) lager dan in het water uit de Biesbosch-bekken (zie Figuur 2 en 3, grijs gearceerde periode).

### Virusverwijdering in voorzuivering en actiefkoolfilters

De voorzuivering (coagulatie/flotatie/filtratie) en actiefkoolfilters zorgen – bij inzet van BB-water – samen voor een gemiddelde virusverwijdering van  $2,1 (\pm 0,7) \log_{10}$ . De mate van verwijdering verschilt per virus: NV2247 lijkt het best verwijderd te worden ( $2,4 \pm 0,7 \log_{10}$ , Tabel 1) en NV2310 het slechtst ( $1,7 \pm 0,8 \log_{10}$ ). De verwijdering van NV2314 ligt hier tussenin (Tabel 1). Door deze verschillen is in het voedingswater van NF/RO niet NV2247, maar NV2310 in de hoogste concentratie aanwezig.

De virusverwijdering door de voorzuivering en actiefkoolfilters varieert over het jaar aanzienlijk (Figuur 4). Dit hangt, tenminste deels, samen met variaties in de toegepaste ijzerdosering voor coagulatie. Tijdens inzet van BB-water varieerde de ijzerdosering tussen de 5 en 10 mg/l, tijdens de inzet van GR-water bedroeg de ijzerdosering 20 mg/l. Deze hoge ijzerdosering vertaalt zich in een hogere virusverwijdering door de voorzuivering/AKF tijdens inzet van GR-water ( $3,3 \pm 0,8 \log_{10}$ ). Naast de ijzerdosering zou ook bijv. de (water)temperatuur hierbij een rol kunnen spelen. Dit moet nog verder onderzocht worden.

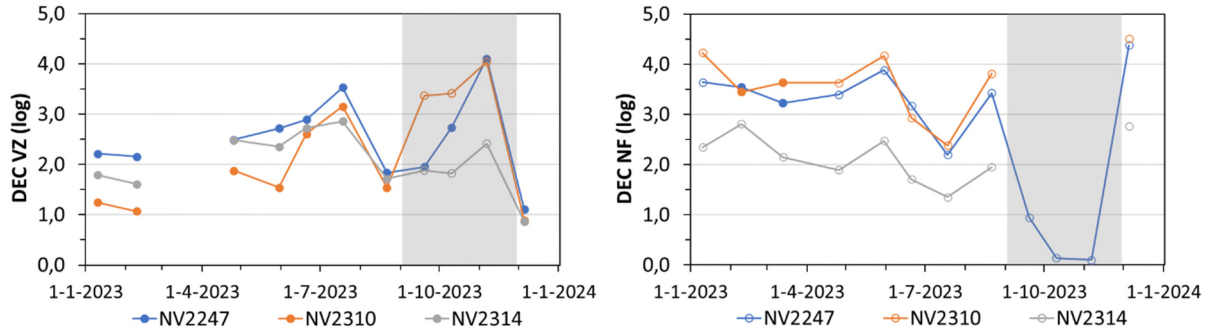
### Virusverwijdering door NF

Bij gebruik van Biesbosch-water is de concentratie natuurlijke virussen in het voedingswater van de membranen nog steeds voldoende hoog om met een klein monstervolume (1 liter) een hoge verwijderingsgraad aan te kunnen tonen. De aantoonbare verwijdering van natuurlijke virussen door NF is gemiddeld  $3,5 (\pm 0,6) \log_{10}$ , op basis van de metingen voor NV2247 en NV2310 (Tabel 1 en Figuur 4). In het NF-permeaat ligt de concentratie natuurlijke virussen in vrijwel alle monsters onder de detectiegrens.

Ook de reguliere indicatororganismen *E. coli* en somatische colifagen zijn bij géén van de monsternames (14x) aangetroffen in het NF-permeaat. Hun concentratie in het voedingswater van de NF/RO is echter laag (gemiddeld, respectievelijk, 0,02 kve/l en 0,45 pve/l), waardoor maar een beperkte verwijdering aangetoond kan worden. Bovendien werden in ongeveer de helft van de groot-volumemonsters (ca. 1000 l) van het voedingswater van de NF al geen *E. coli* of somatische fagen meer aangetroffen.

Bij inzet van GR-water lagen – door de lagere concentratie natuurlijke virussen in het ruwwater (Figuur 2 en 3) en hogere virusverwijdering in de voorzuivering/AKF (Figuur 4) – de concentraties NV2310 en NV2314 in het voedingswater van NF/RO reeds onder de detectiegrens. NV2247 werd nog wel aangetroffen, maar in zeer lage

concentratie ( $10^2$  kopieën/l). De huidige set natuurlijke virussen lijkt dus niet geschikt om de integriteit van de membranen te bewaken tijdens inzet van GR-water (Figuur 4), aangenomen dat de hogere ijzerdosering inderdaad noodzakelijk is.



Figuur 4. Decimale eliminatiecapaciteit (DEC) van de voorzuivering incl. AKF (VZ) en de NF ( $\log_{10}$ ) o.b.v. de gemeten concentratie NV2247 (blauw), NV2310 (oranje) en NV2314 (grijs) tussen januari en december 2023. In de periode van september t/m november (grijs gearceerd) werd de pilot gevoed met lokaal bekkenwater (GR) i.p.v. BB-water. Bij meetresultaten onder de rapportagegrens is de aantoonbare verwijdering weergegeven met een open bolletje.

### Virusverwijdering door RO

Anders dan bij de NF, zijn in het permeaat van de RO wel structureel natuurlijke virussen (NV2247 en NV2310; Figuur 2 en 3) aangetroffen in het permeaat. De verwijdering door RO ligt dan ook consequent lager; gemiddeld  $2,6 (\pm 0,3) \log_{10}$ . Dit duidt op een verminderde integriteit van de RO-installatie. Het opnieuw laden van de RO-membranen (op 7-8-2023) heeft geresulteerd in een toename van de virusverwijdering van gemiddeld  $2,5 (\pm 0,2) \log_{10}$  naar  $3,0 (\pm 0,3) \log_{10}$ . Doordat kort na het herladen de test met GR-water begon, en daarbij de NV-concentratie in het voedings-water van de RO al onder de detectiegrens lag, is deze laatste waarde vooralsnog gebaseerd op slechts twee metingen. Wanneer beide membraansystemen integer zijn, zou de virusverwijdering door NF en RO vergelijkbaar moeten zijn. Dit lijkt ook na het herladen nog niet het geval. Wel lijkt de analyse van natuurlijke virussen een gevoelige meetmethode, waarmee verminderde integriteit goed opgespoord kan worden. Doordat de RO-membranen nog steeds ca.  $2,5 \log_{10}$  verwijdering gaven, werd met de andere bewakingsmethoden geen duidelijke afwijking opgemerkt. Analyse van de natuurlijke virussen lijkt daarmee ook een goede methode om na de plaatsing/vervanging van membranen of andere werkzaamheden aan de membraaninstallatie de integriteit te controleren.

### Conclusies en vooruitblik

Analyse van de natuurlijke virussen lijkt een zeer nuttige methode voor het bepalen van de (virus-) verwijdering door NF/RO en het bewaken van de membraanintegriteit. Bij inzet van de reguliere bron, Biesbosch-water, ligt de aantoonbare verwijdering voor natuurlijke virussen (veel) hoger dan voor de reguliere indicatororganismen, terwijl de monsternamen (1 liter i.p.v. 1000 liter hemoflow) en analyse (qPCR i.p.v. kweek) eenvoudiger en goedkoper zijn. Bij inzet van het lokale bekken zijn de concentraties natuurlijke virussen lager en, zeker in combinatie met een hogere ijzerdosering, ontoereikend. Mogelijk kunnen grotere volumes bemonsterd worden, of kan gezocht worden naar alternatieve natuurlijke virussen die nog wel in hoge concentratie aanwezig zijn in het voedingswater van de membranen.

Bepaling van de concentratie natuurlijke virussen is mogelijk ook interessant in relatie tot de virusverwijdering in voorzuivering, al spelen daar behalve de grootte ook andere eigenschappen een belangrijke rol. Er zal dan nader bepaald moeten worden hoe representatief de verwijdering van deze natuurlijke virussen is voor de verwijdering van de menspathogene virussen.

Ook in 2024 zal maandelijks de concentratie natuurlijke virussen bepaald worden in het ruwwater, voedingswater van NF/RO en het permeaat van beide installaties om de seizoensvariatie en eventuele membraanveroudering in beeld te brengen. Daarnaast zullen enkele metingen worden uitgevoerd in de reguliere zuivering Baanhoek om het effect van UV (i.c.m. AKF) op de waargenomen concentratie natuurlijke virussen te bepalen. Aangezien het een

moleculaire analyse (qPCR) betreft, waarbij de aanwezigheid van DNA wordt bepaald en niet de levensvatbaarheid, is de methode mogelijk ook geschikt om na eventuele UV-desinfectie nog verwijdering aan te kunnen tonen.

## Afkortingen

AKF	actiefkoolfiltratie
BB	Biesbosch
DEC	decimale eliminatiecapaciteit
GR	Grote Rug (lokaal bekken)
kve	kolonievormende eenheden
MWCO	molecular weight cut-off
NF	nanofiltratie
NV	natuurlijke virussen
pve	plaquevormende eenheden
RO	omgekeerde osmose

## Bijlage 6. Electron Microscopy in situ hybridization of viruses on river water samples

In the present project the *in situ* hybridization (ISH) technique was applied at the level of resolution of electron microscopy (EM) in order to develop a valid method to detect the presence of certain viruses in the river water. An additional challenge is to discriminate the presence of some concrete type of viruses by using probes complementary to their DNA or RNA content.

The size of the viruses is in the range of 20-200 nm and this is the reason why the electron microscopy high resolution is needed to visualize them. On the other hand, the best method to discriminate different types of viruses is ISH since a precise and differential DNA or RNA sequence could be detected with EM using a complementary DNA/RNA probe that will hybridize to the DNA/RNA region of interest under certain conditions. The probe should be tagged with a molecule like biotin or digoxigenin which will be later detected by a colloidal gold conjugated antibody against them. The gold particles are very dense under the electrons and they are very clearly visible. For this study we used digoxigenin to tag the probes and 10 nm gold particles coupled to anti-digoxigenin antibodies.

For the preparation of the sample, a permissive weak chemical fixation was used based on 4% paraformaldehyde. This fixative forms cross-links but is reversible by washing which allows the detection of the sequences by hybridization later. Once fixation was performed, the next step was to remove the water by gradual dehydration using methanol and following a PLT (progressive lowering temperature) method in order to preserve the ultrastructure and nucleic acids strands as best as possible. The next step was the embedding of the pellets in an acrylic resin called Lowicryl K4M able to retain around 10% of water allowing better preservation of molecule conformation and higher accessibility to the target sequences.

Once the resin blocks are polymerized, ultrathin sections of 50-70 nm are made in an ultramicrotome with the help of a diamond knife and the staining with uranyl acetate is performed on the sections to provide density under the electrons to the biological material.

The observation was performed in a transmission electron microscope FEI Tecnai T 12 of 120 kv and image acquisition was performed with an Eagle 4kx4k CCD camera.

### Samples and probes:

1. Concentrated river water with NV2247 (<0.08 $\mu\text{m}$ ) and MS2
2. Concentrated river water with NV2247 (<0.45 $\mu\text{m}$ ) and MS2
3. High concentrations of MS2
4. Negative control sample - Drinking water

### Probes:

- MS2 (control virus with the highest concentration in the samples): 55.3  $\mu\text{g/ml}$  (91 pmol/ml)
- NV2301 (Natural surface water virus): 10  $\mu\text{g/ml}$  (171 pmol/ml)
- NV2247 (Natural surface water virus): 19.1 ng/ $\mu\text{l}$  (327 pmol/ml)

## Methods and Results

### Samples

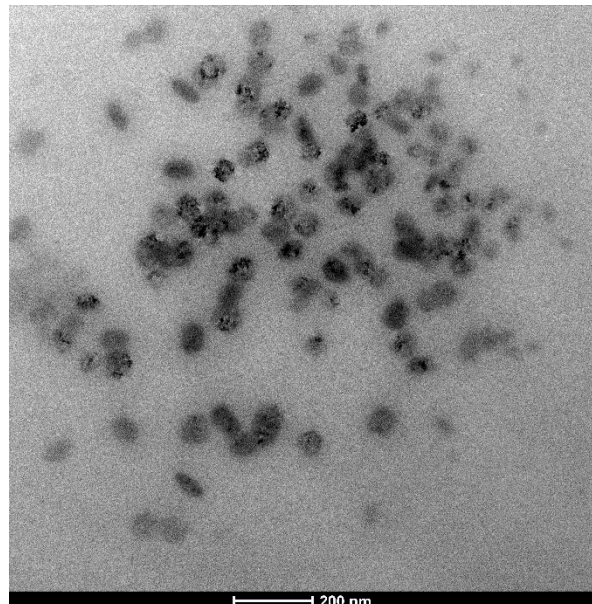
	possible NV2247 concentration per 500 $\mu$ l	possible MS2 concentration per 500 $\mu$ l
1. Concentrated river water with NV2247 (<0.08 $\mu$ m) and MS2	6,6E+07	8,2E+12
2. Concentrated river water with NV2247 (<0.45 $\mu$ m) and MS2	6,7E+07	7,8E+12
3. High concentrations of MS2	0	8,9E+12
4. Negative control sample - Drinking water	0	0

Samples 1 + 2 embedded in Lowicryl K4M resin.

After staining sections of these samples with 4% uranyl acetate in water, images were made by TEM (transmission electron microscope).

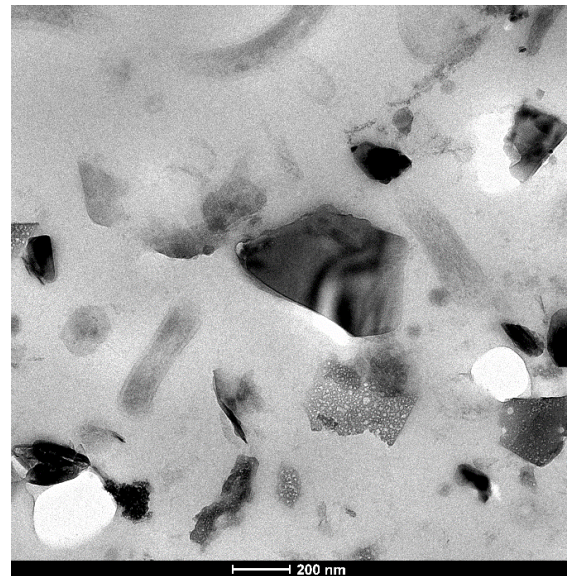
Location files: R:\T12ICORR\20231108\_wj.vandewetering\KWR

Sample 1. Concentrated river water with NV2247 (<0.08  $\mu$ m) and MS2



Sample 2. Concentrated river water with NV2247 (<0.45  $\mu\text{m}$ ) and MS2

This sample shows kind of plastics very abundant.  
Due to size of the filter?



### ***In situ* hybridization**

*In situ* hybridization is performed on sample 1 Concentrated river water with NV2247 (<0.08  $\mu\text{m}$ ) and MS2

Probes:

- MS2 (control virus with the highest concentration in the samples): 55.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (91 pmol/ml)
- NV2301 (Natural surface water virus): 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (171 pmol/ml)
- NV2247 (Natural surface water virus): 19.1 ng/ $\mu\text{l}$  (327 pmol/ml)

All the probes are digoxigenin tagged.

#### 1<sup>st</sup> condition

Sample: Concentrated river water with NV2247 (<0.08  $\mu\text{m}$ ) and MS2

Probe: MS2 virus specific DNA + DIG

Final concentration MS2 probe in ISH solution: 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$

After examination sample in the microscope, no labeling was seen.

#### 2<sup>nd</sup> condition

Sample: Concentrated river water with NV2247 (<0.08  $\mu\text{m}$ ) and MS2

Probe: MS2 virus specific DNA + DIG

Final concentration probes in ISH solution

*MS2: 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$*

*NV2247: 3.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$*

*NV2301: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$*

MS2: no label seen in microscope

NV2247: no label seen in microscope

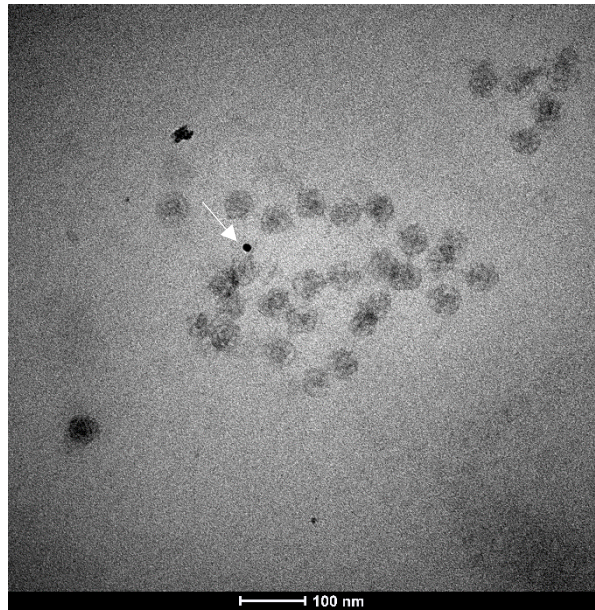
NV2301: some gold particles seen in microscope, not specific

Location files: R:\T12NKI\20240313\_wj.vandewetering

Sample 1. Concentrated river water with NV2247 (<math><0.08 \mu\text{m}</math>) and MS2

Probe: NV2301

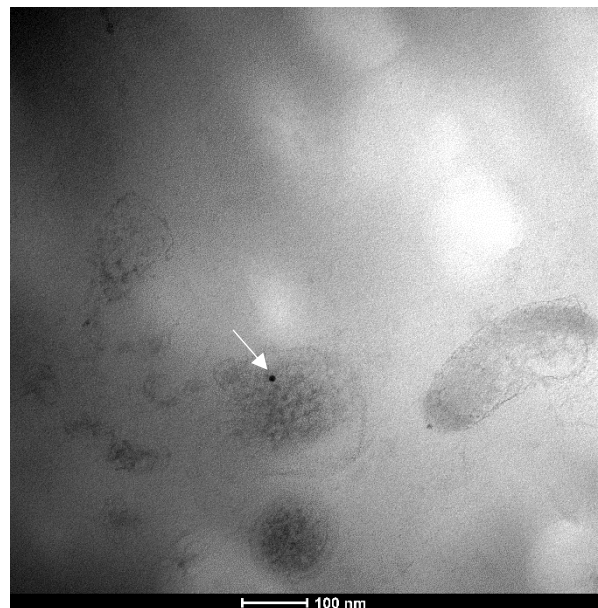
Arrow: gold particle



Sample 1. Concentrated river water with NV2247 (<math><0.08 \mu\text{m}</math>) and MS2

Probe: NV2301

Arrow: gold particle



**Protocol 1: Embedding K4M Lowicryl**



<b>Process number:</b> 74	<b>Date:</b> 16-10-2023
<b>User name:</b> KWR	
<b>Sample type:</b> Concentrated river water with NV2247	<b>Number of Samples:</b> 2

**Chemical fixation:** fixative: 4% PFA in 0.1M PB time: °C

**Cryoprotection:** reagent: no time: °C

**Freezing:** system:

Samples	Dewar+Canister	Cane	Cryovial
1. Concentrated river water with NV2247 (<0.08 µm) and MS2	n/a	n/a	n/a
2. Concentrated river water with NV2247 (<0.45 µm) and MS2	n/a	n/a	n/a

#### Freeze-Substitution:

Reagent	Time	Temperature
MeOH 30%	30 min	0
MeOH 50%	1 hour	-20
MeOH 70%	1 hour	-35
MeOH 95%	1 hour	-35
MeOH 100%	1 hour	-35
MeOH 100%	1 hour	-35

#### Embedding:

Resin: K4M Lowicryl Solvent: MeOH

Resin/Solvent	Time	Temperature
K4M: MeOH 1:1	60 min	-35
K4M: MeOH 2:1	60 min	-35
K4M pure	60 min	-35
K4M pure	ON	-35

**Polymerization:** U.V: yes Time: 5 days Temperature: -35

## Protocol 2.1: *In situ* hybridization

### Sample

MS2 ssRNA virus

### Probe

MS2 virus specific DNA + DIG

### Hybrid

MS2: ssRNA/dsDNA

### Denaturation steps

- Denaturate all the 3 probes by boiling
- No denaturation on grids for MS2

### Lowicryl K4M grids (Work in a RNase free environment)

1. 1 to 2 ul of freshly denatured ISH solution      3h at 37°C in a moist chamber  
ISH solution 4 ug/ml final in 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2x SSC  
First, ISH in boiling water for 4 min and transfer to melting ice  
ISH solution can be stored at -20°C and boiled each time before use
2. 2x dH<sub>2</sub>O      1 min each RT
3. PBS      5 min RT

### DIG detection

4. 5% BSA in PBS      5 sec RT
5. Ab antiDIG in PBS      30 min RT
6. Jet dH<sub>2</sub>O and drying
7. Staining 4% UA in MQ      20-30 min RT
8. Jet dH<sub>2</sub>O and drying

## Protocol 2.1: *In situ* hybridization

### Samples

1. MS2 ssRNA virus
2. NV2247 ds or ssDNA
3. NV2301 ds or SSDNA

### Probes

1. MS2 virus specific DNA + DIG
2. NV2247 virus specific DNA + DIG
3. NV2301 virus specific DNA + DIG

### Hybrids

1. MS2: ssRNA/dsDNA
2. NV2247: ss or dsDNA/dsDNA
3. NV2301: ss or dsDNA/dsDNA

### Denaturation steps

- Denaturate all the 3 probes by boiling
- Denaturate on grids for the NV's
- No denaturation on grids for MS2

### Lowicryl K4M grids (Work in a RNase free environment)

1. Proteinase K 15 min at 37°C (0.2mg/ml in dH2O)
2. 3x dH2O 1-2 min each RT
3. Rinse jet dH2O and drying

#### *Step 4+5+6 only for NV2247 + NV2301*

4. NaOH 0.5N 4 min RT
5. 3x dH2O 3 min total RT
6. Jet water and drying

7. 1 to 2 ul of freshly denaturated ISH solution 3h at 37°C in moist chamber  
ISH solution 3-4 ug/ml final in 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2x SSC  
First, ISH in boiling water for 4 min and transfer to melting ice  
ISH solution can be stored at -20°C and boiled each time before use

#### *Final concentrations*

*MS2: 4ug/ml*

*NV2247: 3.8 ug/ml*

*NV2301: 2 ug/ml*

8. 2x dH2O 1 min each RT
9. PBS 5 min RT

### DIG detection

10. 5% BSA in PBS 5 sec RT
11. Ab antiDIG in PBS 30 min RT

- |                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| 12. PBS                          | 3x5 min RT   |
| 13. Sec ab + gold particles 10nm | 30 min RT    |
| 14. Jet dH2O and drying          |              |
| 15. Staining 4% UA in MQ         | 20-30 min RT |
| 16. Jet dH2O and drying          |              |