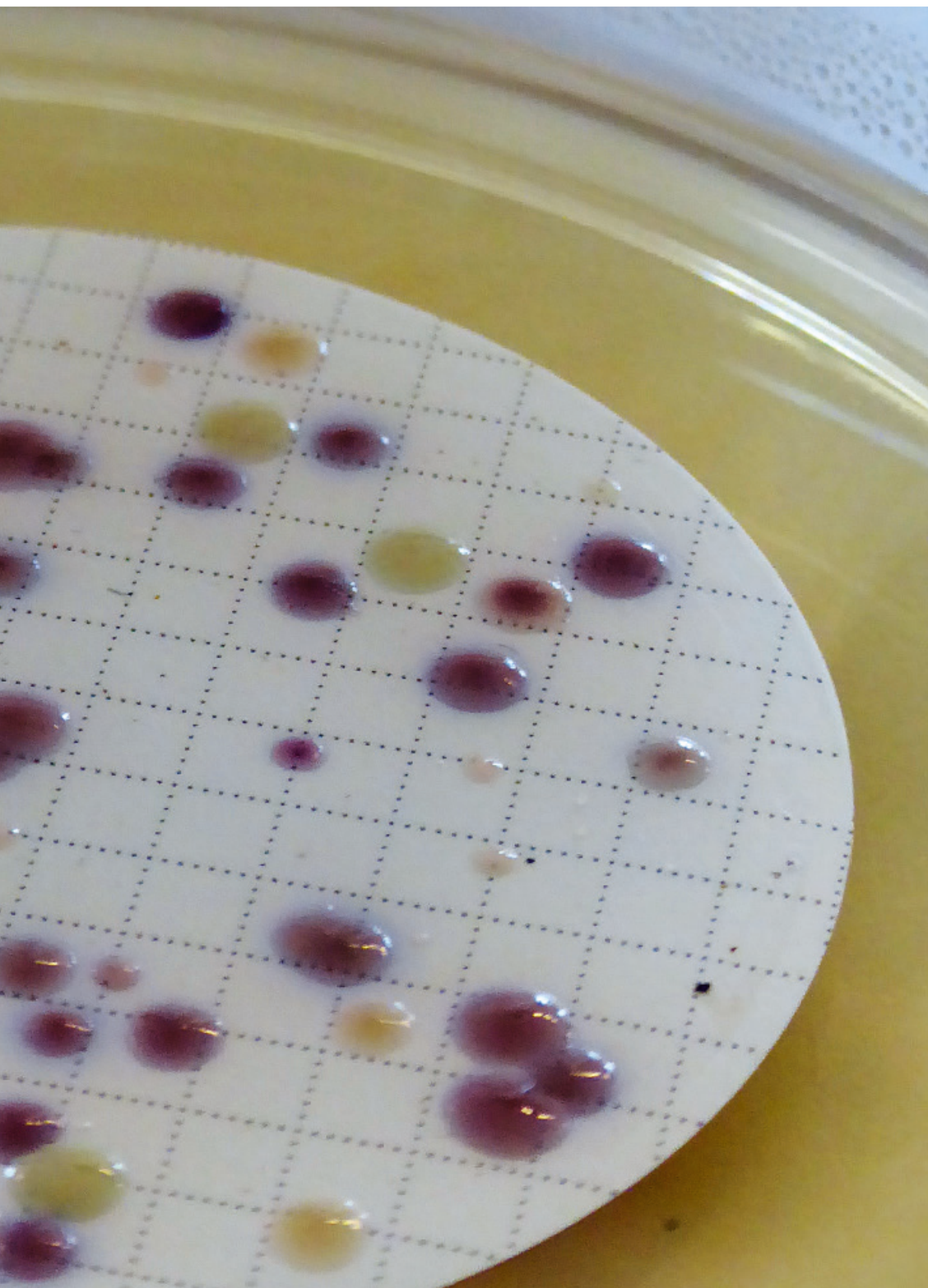




Rol van afvalwater
bij verspreiding van
antibioticaresistentie

Rol van afvalwater bij verspreiding van antibioticaresistentie

**ESBL-producerende *Escherichia coli* en ampicillineresistente
Enterococcus faecium in oppervlaktewater**

Voorwoord

Foutaansluitingen en overstortingen leveren een minstens zo belangrijke bijdrage in de verspreiding van antibioticaresistentie naar oppervlaktewater, als het effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's). De kans op blootstelling aan antibioticaresistentie lijkt daarnaast bij oppervlaktewater in de woonomgeving groter dan bij de lozingslocaties van rwzi's. Alertheid is op zijn plaats.

Gebruik van antibiotica in de gezondheidszorg en in de veehouderij leidt tot de ontwikkeling van bacteriën die niet meer op antibiotica reageren. Deze bacteriën noemen we antibioticaresistent. Resistente bacteriën zijn aanwezig bij patiënten in ziekenhuizen, bij de algemene bevolking, bij vee en bij huisdieren. Bepaalde antibioticaresistente bacteriën komen ook voor in rwzi's en in het oppervlaktewater.

De voorliggende publicatie geeft de resultaten van het eerste Nederlandse onderzoek naar de belangrijkste routes voor verspreiding van resistente bacteriën naar het waterige milieu. Deze kennis is van belang voor een gefundeerde keuze over mogelijke maatregelen ter beperking van de antibioticaresistentie.

Uit het onderzoek blijkt dat foutaansluitingen in gescheiden rioolstelsels en de overstorten van gemengde rioolstelsels een minstens zo belangrijke bijdrage leveren in de verspreiding van antibioticaresistentie naar oppervlaktewater als het effluent van rwzi's. De bijdrage van de afvalwaterroute in vergelijking met de verspreidingsroutes en blootstelling via voedsel of reizen is vooralsnog niet duidelijk.

De gezondheidsrisico's ten gevolge van resistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater zijn nog niet bekend. Nader onderzoek zou hiertoe nodig zijn. Een goede monitoring van potentiële probleemlocaties is echter lastig uitvoerbaar, kostbaar en heeft een moeilijk te duiden meerwaarde. Een groter bewustzijn van niet alleen antibioticaresistente bacteriën maar ook van 'gewone' ziekteverwekkende bacteriën en andere pathogenen in afvalwater kan een goed alternatief zijn om gezondheidsrisico's te verminderen.

Joost Buntsma, directeur STOWA
Hugo Gastkemper, directeur Stichting RIONED

Maart 2018

Samenvatting 9

1 Inleiding 12

- 1.1 Wat is antibioticaresistentie? 12
- 1.2 Wat is de relevantie van resistentie? 12
- 1.3 Waar komen resistente bacteriën voor en welke zijn bijzonder belangrijk? 12
- 1.4 Hoe gaat Nederland met antibioticaresistentie om? 12
- 1.5 ESBL-EC en AmpR-Ent 13
- 1.6 Antibioticaresistentie in oppervlaktewater 13
- 1.7 Aanleiding en doel van dit onderzoek 13
- 1.8 Opstellers en begeleidingscommissie 14
- 1.9 Leeswijzer 14

2 Opzet, materiaal en methoden 15

- 2.1 Onderzoeksopzet naar broninvloeden 15
- 2.2 Effect- en bronmetingen 16
- 2.3 Onderzoeksvragen en geselecteerde locaties per bron 17
 - 2.3.1 Invloed landbouw 17
 - 2.3.2 Invloed rwzi-effluent 18
 - 2.3.3 Invloed gemengde overstorten 18
 - 2.3.4 Invloed futaansluitingen bij gescheiden riolering 19
 - 2.3.5 Invloed wilde dieren 19
- 2.4 Microbiologische analyses 19
 - 2.4.1 Monsternamen 19
 - 2.4.2 Isolatie en enumeratie bacteriën 19
 - 2.4.3 Karakterisatie resistente stammen 20
 - 2.4.4 Andere antibioticaresistentie bij E. coli 20
 - 2.4.5 Aanwezigheid resistentiegenen in DNA microbiele gemeenschap 20

3 Groote Beerze 22

- 3.1 Onderzoeksvragen 22
- 3.2 Topografie en gebiedsinformatie 22
- 3.3 Hydraulisch functioneren 24
- 3.4 Monsternamelocaties & -strategieën 26
- 3.5 Meetresultaten: concentraties en vrachten 29
 - 3.5.1 Landelijk gebied 29
 - 3.5.2 Rwzi-effluent 30
 - 3.5.3 Overstorten 33
- 3.6 Discussie 34
- 3.7 Conclusie 35

4 Groote Wetering 36

- 4.1 Onderzoeksvragen 36
- 4.2 Topografie en gebiedsinformatie 36
- 4.3 Hydraulisch functioneren 37
- 4.4 Monsternamelocaties & -strategieën 38
- 4.5 Meetresultaten: concentraties en vrachten 40
 - 4.5.1 Landelijk gebied 40
 - 4.5.2 Rwzi-effluent 40
- 4.6 Discussie 42
- 4.7 Conclusie 42

5	Piet Oberman	43
5.1	Onderzoeksvraag	43
5.2	Topografie en gebiedsinformatie	43
5.3	Hydraulisch functioneren	43
5.4	Monsternamelocatie & -strategie	44
5.5	Meetresultaten: concentraties en vrachten	46
5.6	Discussie	47
5.7	Conclusie	47
6	Almere, Amersfoort en Soest: gescheiden riolering (foutaansluitingen)	48
6.1	Onderzoeksvragen	48
6.2	Topografie en gebiedsinformatie	48
6.3	Hydraulisch functioneren	50
6.4	Monsternamelocaties & -strategieën	50
6.5	Meetresultaten: concentraties en vrachten	51
6.5.1	Almere	51
6.5.2	Soest en Amersfoort	52
6.6	Discussie	53
6.7	Conclusie	53
7	Gemengde overstorten: onderzoek op zes locaties	54
7.1	Onderzoeksvraag	54
7.2	Monsternamelocaties	54
7.3	Meetresultaten	54
7.4	Conclusie	55
8	Bronmetingen aan rwzi's	56
8.1	Onderzoeksvragen	56
8.2	Monsternamelocaties	56
8.3	Meetresultaten	56
8.4	Conclusie	57
9	Oostvaardersplassen	58
9.1	Onderzoeksvraag	58
9.2	Topografie en gebiedsinformatie	58
9.3	Hydraulisch functioneren	58
9.4	Monsternamelocaties & -strategieën	59
9.5	Meetresultaten: concentraties en vrachten	60
9.6	Discussie	60
9.7	Conclusie	60
10	Concentraties en (geschatte) jaarlijkse vrachten per bron	61
10.1	Concentraties in oppervlaktewater per bron	61
10.2	Schattingen totale jaarlijkse vrachten per bron	62

11 Synthese onderzoeksresultaten en conclusies 63

- 11.1 Invloed rwzi-effluent op resistente bacteriën in oppervlaktewater 63
 - 11.1.1 Resistente bacteriën bijna altijd aanwezig in rwzi-effluenten 63
 - 11.1.2 Hogere prevalenties en concentraties in oppervlaktewater na lozing rwzi-effluent 63
 - 11.1.3 Rwzi-lozingen bepalend voor totale hoeveelheid bacteriën benedenstrooms 63
 - 11.1.4 Conclusie bijdrage rwzi-lozingen aan contaminatie oppervlaktewater 64
- 11.2 Invloed landelijke achtergrond op resistente bacteriën in oppervlaktewater 64
 - 11.2.1 Prevalenties en concentraties bij landbouw lager dan bij rwzi 64
 - 11.2.2 Geen duidelijke invloed bemesting en neerslag 65
 - 11.2.3 Conclusie bijdrage landelijke achtergrond aan contaminatie oppervlaktewater 66
- 11.3 Invloed gemengde riooloverstorten op resistente bacteriën in oppervlaktewater 66
 - 11.3.1 Hoge prevalenties en concentraties in riooloverstorten 66
 - 11.3.2 Totale hoeveelheid bacteriën benedenstrooms riooloverstorten 66
 - 11.3.3 Conclusie bijdrage gemengde riooloverstorten aan contaminatie oppervlaktewater 66
- 11.4 Invloed gescheiden riolering op resistente bacteriën in oppervlaktewater 67
 - 11.4.1 Hogere prevalenties en concentraties in oppervlaktewater na lozing uit gescheiden riolering 67
 - 11.4.2 Conclusie bijdrage gescheiden riolering aan contaminatie oppervlaktewater 67
- 11.5 Vergelijking alle bronnen 67
- 11.6 Vergelijking ESBL-EC en AmpR-Ent 68
- 11.7 Conclusies en uitkijk 68

12 Literatuur 69

Dankwoord 70

Summary 71

Colofon 74

Samenvatting

Aanleiding en achtergrond

Het gebruik van antibiotica in de humane gezondheidszorg en in de veehouderij heeft tot de ontwikkeling van bacteriën geleid die resistent zijn voor antibiotica. Bepaalde resistentievormen komen van nature in bacteriën voor. Maar in bacteriën die vroeger gevoelig waren, worden ook nieuwe resistenties gevonden. Resistente bacteriën kunnen voorkomen bij patiënten in ziekenhuizen en de algemene bevolking, bij landbouwhuisdieren en bij huisdieren. Recent zijn bepaalde resistente bacteriën in Nederland en andere landen ook gedetecteerd in rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) en oppervlaktewater. Omdat deze onderzoeken gericht zijn op enkele specifieke bronnen (rwzi's of veehouderijen), is tot nu toe niet bekend wat in Nederland de belangrijkste routes zijn voor de introductie van resistente bacteriën in oppervlaktewater. Ook zijn de gezondheidsgevolgen van de aanwezigheid van resistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater nog niet precies bekend. Toch is kennis over het belang van verschillende routes noodzakelijk om een gefundeerde keuze te kunnen maken over mogelijke maatregelen om de emissies van resistente bacteriën naar het milieu te verminderen.

Onderzoeksvraag

In deze studie is onderzocht welke bijdrage verschillende humane bronnen aan de introductie van resistente bacteriën in het oppervlaktewater hebben, namelijk rwzi-effluent, gemengde overstorten en foutaansluitingen in gebieden met gescheiden riolering. Deze worden vergeleken met de landelijke achtergrond, zoals invloeden van run-off van bemeste landbouwgrond, afspoeling van veehouderijbedrijven of van feces van wilde dieren. Het onderzoek richt zich op twee soorten resistente bacteriën: extended spectrum beta-lactamase producerende *Escherichia coli* (ESBL-EC) en ampicillineresistente enterokokken (AmpR-Ent). De eerste valt in de meest relevante categorie van resistente bacteriën die volgens de World Health Organization (WHO) voor de ontwikkeling van nieuwe antibiotica nodig is en komt voor bij mensen en landbouwhuisdieren. De tweede komt met name voor bij ziekenhuispatiënten.

Opzet

Het onderzoek vond plaats op verschillende locaties, waar in een periode van meer dan een jaar herhaaldelijk is gemeten. Per locatie is minstens een van bovengenoemde bronnen bestudeerd. Op enkele locaties vonden 'bronmetingen' plaats om de verdeling van concentraties resistente bacteriën in de bronnen te kunnen beschrijven (in overstorten en rwzi-effluenten). Op andere locaties zijn de concentraties in oppervlaktewater onder invloed van een enkele (diffuse) bron onderzocht (landelijke achtergrond in de rivier de Groote Beerze en in het gebied Piet Oberman, een aantal gemeenten met gescheiden riolering voor de invloed van foutaansluitingen en de Oostvaardersplassen voor de invloed van wilde dieren).

Op enkele locaties (de rivieren de Groote Beerze en de Groote Wetering) vonden 'effectmetingen' plaats. Hierbij zijn concentraties en typen resistente bacteriën beneden- en bovenstrooms van een rwzi-lozingspunt vergeleken. Aan hand van de gemeten concentraties en de watervolumes zijn vrachten resistente bacteriën berekend. Voor zover mogelijk zorgden debietproportionele monsternametekasten voor de bemonstering. Ook is geprobeerd om monsters tijdens droge en natte perioden én binnen en buiten het mestuitrijdseizoen te nemen.

Invloed rwzi

Bij bronmetingen in effluenten van honderd rwzi's die eenmalig zijn bemonsterd, zijn de resistente bacteriën ESBL-EC en AmpR-Ent in nagenoeg alle monsters aangetroffen, respectievelijk in concentraties van ongeveer 2×10^3 kve/l en 2×10^2 kve/l. In de Groote Beerze en de Groote Wetering, waar de invloed van rwzi-effluent op het ontvangende oppervlaktesysteem met herhaalde metingen is onderzocht ($n=24$), zijn resistente bacteriën vaker benedenstrooms van het lozingspunt aangetroffen (ESBL-EC in alle monsters, AmpR in 56 – 100% van de monsters) dan bovenstrooms. De vracht op korte afstand benedenstrooms van de rwzi is nagenoeg volledig door het rwzi-effluent bepaald. Een invloed op de concentraties van de indicatorbacteriën *E. coli* en enterokokken is nog tot enkele kilometers waargenomen.

Invloed gemengde overstorten

ESBL-EC is in alle onderzochte overstortmonsters aangetroffen, AmpR-Ent in 86% van de monsters (n=13 afkomstig van zes overstorten, de meeste genomen uit randvoorzieningen (opvangbekkens) van de overstorten). De concentraties ESBL-EC liggen ongeveer tien keer hoger dan de concentraties gemeten in rwzi-effluent. De concentraties AmpR-Ent zijn variabele, maar ook hoger dan de effluentconcentraties.

Landelijke achtergrond inclusief landbouw

De landelijke achtergrond van concentraties resistente bacteriën in oppervlaktewater is onderzocht in de Groote Beerze en in de Groote Wetering (in metingen bovenstrooms van de rwzi, waar afspoeling van bemeste landbouwgronden en van veehouderijen een rol kunnen spelen, naast invloeden van wilde vogels) en bij Piet Oberman (waar afspoeling van bemeste landbouwgronden, afspoeling van één veehouderij, wilde vogels en systemen voor individuele behandeling van afvalwater (IBA's) een rol kunnen spelen). ESBL-EC is gevonden in 32 – 56% van de monsters in de drie gebieden, AmpR-Ent in 0 - 6% van de monsters (n=47). De concentraties in de Groote Beerze en de Groote Wetering liggen ongeveer tien tot honderd keer lager dan in dezelfde gebieden benedenstrooms van het rwzi-effluentlozingspunt. Een duidelijke invloed van neerslag is niet waargenomen. Dit komt mogelijk doordat vlak voor of tijdens natte perioden niet is bemest of doordat de mest niet altijd resistente bacteriën bevat. De uitgevoerde metingen zijn niet voldoende om piekbelastingen te kunnen meten.

Invloed foutaansluitingen

In gebieden met (verbeterd) gescheiden riolering (afvoer van hemel- en rioolwater in aparte buizen) kunnen foutaansluitingen voorkomen. Dan kan ruw afvalwater via de hemelwaterafvoer direct in het oppervlaktewater komen. In meerdere wijken in Almere, Amersfoort en Soest met (verbeterd) gescheiden riolering is oppervlaktewater onderzocht dat mogelijk onder invloed staat van foutaansluitingen (n=86, verdeeld over meerdere meetmomenten en wijken). ESBL-EC en AmpR-Ent zijn respectievelijk in 51% en 22% van de monsters aangetroffen. De concentraties zijn meestal vergelijkbaar met concentraties gemeten in landelijke gebieden, terwijl invloeden van mest of veehouderijen in deze gebieden uitgesloten zijn. Maar in enkele monsters zijn veel hogere concentraties gevonden, vergelijkbaar met die in rwzi-effluent en zelfs -inluent. In een deel van de onderzochte wijken liggen de concentraties na neerslag hoger dan bij droog weer, maar in andere wijken is geen duidelijk effect van neerslag gevonden.

Invloed wilde dieren (landelijke achtergrond exclusief landbouw)

De invloed van wilde dieren is bij het uitstroompunt van het oppervlaktewater van de Oostvaardersplassen onderzocht. Dit is alleen in de wintermaanden mogelijk, omdat in de zomer geen uitstroom uit het gebied plaatsvond en de Oostvaardersplassen niet openbaar toegankelijk zijn. Bij drie van de zes metingen is ESBL-EC aangetroffen, AmpR-Ent is niet gedetecteerd. De ESBL-EC-concentraties liggen net boven de detectielimiet.

Vergelijking alle bronnen

De totale jaarlijkse Nederlandse emissies van resistente bacteriën via de routes rwzi-effluent, gemengde overstorten en foutaansluitingen bij gescheiden riolering zijn berekend met concentratiemetingen aan rwzi-effluenten en aan overstorten, schattingen van concentraties in hemelwaterafvoer onder invloed van foutaansluitingen en de totale volumes van rwzi-effluent, overstorten en foutaansluitingen. Ondanks de veel lagere totale volumes liggen de geschatte totale emissies van ESBL-EC met foutaansluitingen ongeveer even hoog als de emissies met rwzi-effluent (3×10^{15} (8×10^{14} – 2×10^{16}) kve/jaar) en de emissies met overstorten in dezelfde orde van grootte. Hoewel in het oppervlaktewater veel minder overstortwater en met afvalwater gecontamineerd hemelwater terechtkomen, zorgen de hogere concentraties resistente bacteriën voor vergelijkbaar hoge lozingen als bij rwzi-effluenten.

De bijdrage van de diffuse bronnen (landbouw en wilde dieren) is aan hand van de hier gerapporteerde metingen (nog) niet als totale landelijke emissie te berekenen. In oppervlaktewater onder invloed van diffuse landelijke bronnen (afspoeling van bemeste landbouwgrond en veehouderijen en feces van wilde dieren) zitten minder vaak resistente bacteriën en de gevonden concentraties liggen lager dan in oppervlaktewater onder invloed van rwzi-effluent. Het is nog onbekend of piekbelastingen na bemesting tot tijdelijke en lokaal hogere concentraties kunnen leiden.

De prevalenties en concentraties van AmpR-Ent liggen doorgaans lager dan de concentraties ESBL-EC. Dit komt waarschijnlijk doordat AmpR-Ent minder vaak bij mensen en zelden bij landbouwhuisdieren voorkomt.

Conclusies

Dit project heeft aangetoond dat de resistente bacteriën ESBL-EC en AmpR-Ent vaak en in hoge mate voorkomen in rwzi-effluenten en overstorten. De concentraties en prevalenties van AmpR-Ent zijn over het algemeen lager dan die van ESBL-EC. Met metingen is aangetoond dat rwzi-effluenten de concentraties resistente bacteriën in het ontvangende oppervlaktewater binnen een schaal van enkele kilometers duidelijk kunnen verhogen. De concentraties resistente bacteriën in oppervlaktewater in gebieden met diffuse invloeden van landbouw zijn lager dan concentraties gemeten direct benedenstrooms van rwzi-effluentlozingen. De laagste concentraties zijn gemeten in gebieden met wilde dieren. Aan de hand van meetresultaten is aangetoond dat gemengde overstorten en foutaansluitingen kunnen leiden tot jaarlijkse emissies van resistente bacteriën die vergelijkbaar zijn met de emissies van rwzi-effluenten.

1 Inleiding

1.1 Wat is antibioticaresistentie?

Mensen en dieren dragen veel bacteriën bij zich, waarvan de meeste onschadelijk zijn. Een klein aantal kan wel ziektes (infecties) veroorzaken. Antibiotica kunnen de groei van deze bacteriën remmen of de bacteriën doden en daarmee helpen bij het herstel van bacteriële infecties. Daarom zijn antibiotica een belangrijk onderdeel van de gezondheidszorg. Maar door veelvuldig gebruik van antibiotica kunnen bacteriën die vroeger goed te behandelen waren ongevoelig worden voor antibiotica. Dan wordt zo'n bacterie 'antibioticaresistent' genoemd. Naast deze 'verworven' resistentie bestaan er ook bacteriën die van nature tegen bepaalde antibiotica bestand zijn. Maar dit is minder belangrijk voor de gezondheidszorg, deze bacteriën vallen dan ook meestal niet onder het begrip antibioticaresistentie.

1.2 Wat is de relevantie van resistentie?

Een infectie met een resistente bacterie kan moeilijker te behandelen zijn en tot hogere kosten leiden dan een infectie met een niet-resistente bacterie. Dat komt doordat andere antibiotica nodig zijn dan in eerste instantie gewenst én mensen soms langer in het ziekenhuis moeten blijven omdat de infectie langer duurt. Een infectie met een resistente bacterie vormt vooral voor mensen met een verminderde weerstand een hoger risico, zoals ouderen en ziekenhuispatiënten. In het ergste geval zijn bacteriën tegen zo veel antibiotica tegelijk resistent geworden dat infecties met dergelijke bacteriën niet meer te behandelen zijn. Dit is een zeer ongewenste situatie, die in Nederland (vooralsnog) gelukkig zelden voorkomt.

Als mensen aan resistente bacteriën worden blootgesteld, kunnen zij deze binnenkrijgen. De resistente bacteriën kunnen zich (tijdelijk) in de darmen of elders in het lichaam nestelen, deze mensen zijn dan 'drager'. Dit is bijvoorbeeld aangetoond voor boeren die vaker dan gemiddeld resistente bacteriën bij zich dragen die bij landbouwhuisdieren voorkomen. Voor de meeste gezonde mensen is dit niet erg, zij worden er niet direct ziek van. Maar bij mensen met een zwak afweersysteem (zoals ouderen of ziekenhuispatiënten) kan dit tot infecties met resistente bacteriën leiden.

1.3 Waar komen resistente bacteriën voor en welke zijn bijzonder belangrijk?

Resistentie is een wereldwijd probleem. Het niveau van antibioticaresistentie bij mensen in Nederland is in vergelijking met sommige andere landen relatief laag. Resistente bacteriën komen in Nederland (en andere landen) voor in de gezondheidszorg en worden veel bij landbouwhuisdieren gevonden. Veel resistente bacteriën maken deel uit van de darmflora. Met humane en dierlijke feces kunnen resistente bacteriën ook het afvalwater en het oppervlaktewater bereiken.

Bepaalde resistente bacteriën worden als bijzonder relevant beschouwd, omdat de behandeling van infecties met deze bacteriën moeilijker is dan van infecties met de niet-resistente varianten. Tot de bijzonder relevante resistente bacteriën behoren onder andere: extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producerende *Escherichia coli* (*E. coli*), carbapenemase producerende Enterobacteriaceae, meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en vancomycine enterokokken (VRE).

1.4 Hoe gaat Nederland met antibioticaresistentie om?

Nederland heeft het probleem van antibioticaresistentie onderkend en is op veel terreinen actief betrokken bij het terugdringen ervan. Zo hebben overheid en zorgsector afspraken gemaakt om het gebruik van antibiotica in de zorg terug te dringen en het juiste gebruik van antibiotica te bevorderen. Ook met veehouders en dierenartsen zijn afspraken gemaakt. Zo is vermindering van het antibioticagebruik met ten minste 70% procent ten opzichte van het niveau in 2009 afgesproken. Tot nu toe is een reductie van 64% gerealiseerd (Veldman et al., 2017). Ook wordt ingezet op de ontwikkeling van nieuwe antibiotica en op onderzoek naar de rol van verschillende bronnen bij de overdracht van resistentie, zoals het milieu.

1.5 ESBL-EC en AmpR-Ent

ESBL-producerende *E. coli* (ESBL-EC) is resistent tegen een van de belangrijkste antibiotica-groepen: de zogenaamde beta-lactam antibiotica. Hiertoe behoren onder andere penicillinen en 3e generatie cephalosporinen. ESBL-EC kan grote problemen geven in de kliniek, omdat infecties (urineweg-, maagdarmkanaal- en bloedinfecties) moeilijk te behandelen zijn. ESBL-EC kan ook bij mensen voorkomen zonder dat er klachten zijn (dragers). Ongeveer 5% van alle Nederlanders is drager van ESBL-EC. Omdat in Nederland bij landbouwhuisdieren relatief veel antibiotica gebruikt worden, komt ESBL-EC ook frequent voor bij deze dieren en bij de mest van deze dieren, vooral bij pluimvee, vleesvarkens en vleeskalveren (Veldman *et al.*, 2017).

Enterokokken spelen met name een rol in ziekenhuisinfecties. Het aantal ziekenhuis-geassocieerde infecties met *E. faecium* is recent sterk toegenomen (Willems en Van Schaik, 2009). Vaak zijn de enterokokken die ziekenhuisinfecties veroorzaken resistent tegen ampicilline en soms ook tegen quinolonen. In mensen buiten het ziekenhuis worden minder vaak ampicillineresistente enterokokken (AmpR-Ent) aangetroffen. AmpR-Ent komt vooral bij mensen voor, hoewel deze bacterie ook in varkens en honden kan worden gevonden (Novais *et al.*, 2013; Iseppi *et al.*, 2015). Het is niet helder in hoeverre landbouwhuisdieren in Nederland deze bacteriën bij zich kunnen dragen.

ESBL-EC en AmpR-Ent worden vaak als zogenoemde indicatorbacteriën gebruikt, omdat ze in humane en dierlijke feces voorkomen en zo als indicator voor besmetting van water met feces kunnen dienen.

1.6 Antibioticaresistentie in oppervlaktewater

Met humane en dierlijke feces kunnen resistente bacteriën het oppervlaktewater bereiken. Dit geldt ook voor ESBL-EC en AmpR-Ent. ESBL-EC is in Nederland aangetoond in diverse typen oppervlaktewater, waaronder officiële zwemlocaties (Blaak *et al.*, 2014), oppervlaktewater onder directe invloed van veehouderijen (Blaak *et al.*, 2015) en oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor irrigatie (Blaak *et al.*, niet gepubliceerd). AmpR-Ent is minder onderzocht en is in Nederland tot nu toe aangetroffen in afvalwater van ziekenhuizen en in gemeentelijk afvalwater (Anastasiou en Schmitt, 2011). Ook in afvalwater in Portugal en Polen (da Costa *et al.*, 2007, Sadowy en Luczkiewicz, 2014) is AmpR-Ent aangetroffen. Dit geeft aan dat deze bacterie ook voorkomt onder de algemene bevolking. Omdat de bacterie zich in afvalwater bevindt, kan AmpR-Ent ook in recreatie- en/of irrigatiewater zitten, maar dit is nog niet onderzocht.

De belangrijkste bron van AmpR-Ent in oppervlaktewater is waarschijnlijk humaan afvalwater. Omdat ESBL-EC behalve bij mensen ook veel bij dieren voorkomt, is het voor ESBL-EC aannemelijk dat naast humaan afvalwater in elk geval een deel van de ESBL-EC in oppervlaktewater van dierlijke oorsprong is. Nadat deze bacteriën in het oppervlaktewater terecht zijn gekomen, kunnen ze zich verder verplaatsen naar plekken waar mensen ermee in aanraking kunnen komen. Ondanks dat fecale bacteriën zoals *E. coli* en enterokokken zich onder normale omstandigheden niet in Nederlands oppervlaktewater vermenigvuldigen en zelfs afsterven, heeft modellering aangetoond dat ook op enige afstand van de bron blootstelling aan ESBL-EC via zwemmen mogelijk is (Schijven *et al.*, 2015).

Dat ESBL-EC en AmpR-Ent in oppervlaktewater voorkomen, is mogelijk een probleem. Mensen kunnen deze immers binnenkrijgen als ze bijvoorbeeld in het water zwemmen of andere watersporten beoefenen. Maar de precieze gezondheidsgevolgen van de aanwezigheid van resistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater zijn nog niet bekend. Dat komt vooral doordat de relatie tussen de aanwezigheid van resistente bacteriën, menselijke blootstelling, ontwikkeling van 'dragerschap' (aanwezigheid van deze bacteriën in de darmen zonder directe gezondheidsgevolgen) en uiteindelijk infecties met resistente bacteriën nog niet bekend is.

1.7 Aanleiding en doel van dit onderzoek

De aanwezigheid van antibioticaresistente bacteriën in water waaraan mensen blootgesteld kunnen worden, vormt mogelijk een risico voor de volksgezondheid. Om doelgericht te kunnen interveniëren, is het van belang de relatieve bijdrage van mogelijke bronnen van

deze bacteriën te bepalen. Antibioticaresistente bacteriën in oppervlaktewater zijn waarschijnlijk grotendeels afkomstig van met antibiotica behandelde mensen en dieren. Ze komen in het water terecht met gedeeltelijk gezuiverd of ongezuiverd afvalwater en door afspoeling van mest. Van enkele mogelijke bronnen van resistente bacteriën is bekend dat emissies tot verhoogde concentraties in oppervlaktewater kunnen leiden, zoals aangetoond voor rwzi (Blaak *et al.*, 2014) en veehouderijen (Blaak *et al.*, 2015). Maar in deze onderzoeken is meestal alleen een enkele bron onderzocht. De relatieve bijdrage van het humane en dierlijke domein is niet bekend.

Het doel van dit onderzoeksproject is om de relatieve bijdrage van verschillende humane en dierlijke bronnen aan de aanwezigheid van resistente bacteriën in oppervlaktewater vast te stellen. De onderzochte bronnen zijn: rwzi-effluent, overstortwater van gemengde rioolstelsels en foutaansluitingen bij gescheiden riolering (humaan afvalwater). Daarnaast is de bijdrage van de landelijke achtergrond onderzocht, bijvoorbeeld beïnvloed door dierlijke mest, veehouderijen en wilde dieren. Als representanten van resistente bacteriën zijn ESBLE-EC en AmpR-Ent onderzocht.

1.8 Opstellers en begeleidingscommissie

Het project is van december 2015 tot de zomer van 2017 in opdracht van STOWA uitgevoerd door het Centre for Zoonoses and Environmental Microbiology (van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)), het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS) en Partners4UrbanWater.

Hetty Blaak (RIVM), Remy Schilperoort (Partners4UrbanWater) en Heike Schmitt (IRAS en RIVM) hebben dit rapport geschreven.

De begeleidingscommissie bestond uit:

Manon Bechger	Waternet
Frans de Bles	Waterschap Vallei en Veluwe
Bonnie Bult	Wetterskip Fryslân
Pieter van Dongen	Waterschap Hollandse Delta
Richard van Hoorn	Waterschap Vallei en Veluwe
Wim van der Hulst	Waterschap Aa en Maas
Anna Koenis	Hoogheemraadschap van Rijnland
Melanie Kuiper	Waterschap Zuiderzeeland
Anne Marieke Motelica	Waternet
Ron van der Oost	Waternet
Oscar van Zanten	Waterschap De Dommel

1.9 Leeswijzer

Hoofdstuk 2 beschrijft de opzet van het onderzoek, materiaal en methoden.

Hoofdstukken 3 tot en met 9 beschrijven elk per locatie de gedetailleerde meetaanpak, de onderzochte locatie, de resultaten en de conclusies.

Hoofdstuk 10 vat de gevonden concentraties per bron samen.

Hoofdstuk 11 bespreekt de conclusies.

Hoofdstuk 12 bevat de literatuurlijst.

2 Opzet, materiaal en methoden

2.1 Onderzoekopzet naar broninvloeden

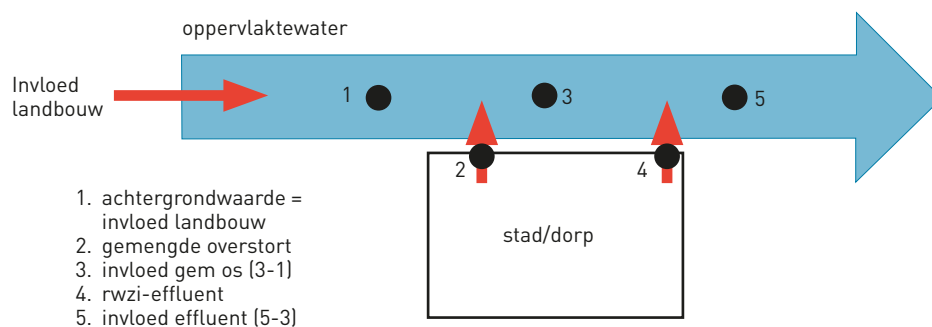
De bronnen van antibioticaresistente bacteriën die in deze studie zijn onderzocht, zijn:

- rwzi-effluent;
- overstortwater van gemengde riolering;
- foutaansluitingen bij gescheiden riolering;
- landbouw (afspoeling van mest na bemesting of beweiding, afspoeling van veehouderijen);
- wilde dieren.

Om de invloed van deze bronnen op de concentraties bacteriën in oppervlaktewater vast te stellen, zijn locaties geselecteerd waar:

- a) sprake is van minimaal een van de gedefinieerde bronnen;
- b) de bijdrage van andere dan de te onderzoeken bronnen bij voorkeur verwaarloosbaar is;
- c) informatie beschikbaar is over het hydraulisch functioneren.

In het ideale geval is het effect van meerdere bronnen in één hydrologisch systeem te meten (zie figuur 2.1). De locaties zijn in overleg met de betrokken waterschappen gezocht en geselecteerd. Uiteindelijk zijn twee systemen gevonden waarin het effect van meerdere bronnen onderzocht kon worden: de rivier de Groote Beerze in het beheergebied van Waterschap De Dommel (zie hoofdstuk 3) en de rivier de Groote Wetering in het beheergebied van Waterschap Aa en Maas (zie hoofdstuk 4). De overige onderzoekslocaties zijn elk specifiek geselecteerd om het effect van één mogelijke bron te meten.



Figuur 2.1 Ideale onderzoekslocatie om invloed diffuse bronnen (wilde vogels, landbouw en foutaansluitingen bij gescheiden riolering) en puntbronnen (rwzi-effluent en overstorten) op oppervlaktewater te meten

De voor dit onderzoek gekozen locaties staan in figuur 2.2. Tabel 2.1 geeft aan welke bronnen per locatie zijn onderzocht. Een uitgebreide beschrijving vindt u in de betreffende hoofdstukken (zie tabel 2.1).

Figuur 2.2 Ligging van de onderzoekslocaties



Tabel 2.1 Geselecteerde locaties en onderzochte bronnen

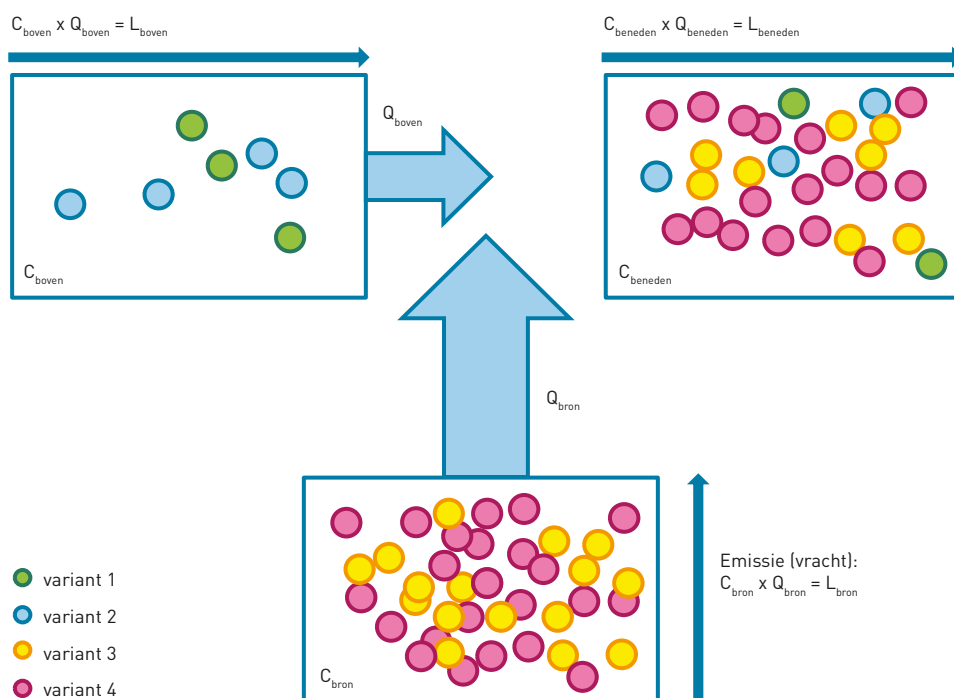
Locatie	Onderzoeksvraag: invloed van...	Hoofdstuk
Hapert (Groote Beerze)	Landelijke achtergrond, rwzi, overstorten	3
Vinkel (Groote Wetering)	Landelijke achtergrond, rwzi	4
Piet Oberman	Landelijke achtergrond (bemesting)	5
Oostvaardersplassen	Landelijke achtergrond (wilde dieren)	9
Almere	Gescheiden riolering	6
Amersfoort Nieuwland, Vathorst & Kattenbroek	Gescheiden riolering	6
Soest Overhees	Gescheiden riolering	6
Bladel, Hapert, Dieren, Harderwijk en Velp	Gemengde overstorten	7

2.2 Effect- en bronmetingen

De invloed van de verschillende bronnen is onderzocht met effect- en bronmetingen. Bij effectmetingen (zie figuur 2.3) zijn bacterieconcentraties boven- en benedenstrooms van de bron en in de bron zelf bepaald. Dit is gedaan in de Groote Beerze (zie hoofdstuk 3) en de Groote Wetering (zie hoofdstuk 4) om de invloed van rwzi-effluent (rwzi's Hapert en Vinkel) te bepalen. Daarnaast zijn ook de debieten bepaald om een massabalans te kunnen maken. Als aanvullende methode om het effect te bepalen, is onderzocht of – en zo ja, in welke mate – de ESBL-EC-varianten in de bron en het oppervlaktewater met elkaar overeenkomen.

Bronmetingen zijn gedaan bij de overstorten van gemengde riolering (zie hoofdstuk 7), omdat deze meestal lozen in groene buffers of bergbezinktanks en dus het oppervlaktewater niet beïnvloeden (behalve bij een incidentele externe overstorting). In aanvulling op de effectmetingen bij rwzi's Hapert en Vinkel zijn ook bronmetingen gedaan bij honderd rwzi's

(eenmalig) en bij twee rwzi's (herhaaldelijk) (zie hoofdstuk 8). Om de invloed te bepalen van diffuse bronnen zoals landbouw (zie hoofdstukken 3, 4 en 5) en wilde dieren (zie hoofdstuk 9) en bronnen met onbekende locatie zoals foutaansluitingen in gescheiden rioolssystemen (zie hoofdstuk 6), zijn alleen metingen in het oppervlaktewater gedaan.



Figuur 2.3 Opzet effectmetingen

Toelichting bij figuur 2.3

Naast metingen van concentraties (C) boven- en benedenstrooms van een puntbron en in de puntbron zelf worden de debieten (Q) bij elkaar gebracht. Uit concentraties en debieten zijn vrachten (L) te berekenen. Uit de vergelijking van de benedenstroomse vracht (L_{beneden}) met de bovenstroomse vracht (L_{boven}) en de vracht van de bron (L_{bron}) is de relatieve rol van de puntbron te bepalen. Aanvullend worden de resistente bacteriën gekarakteriseerd (varianten 1 – 4). De mate waarin de benedenstroomse varianten overeenstemmen met de varianten in de bron en in het bovenstroomse water, kan de rol van de bron bevestigen

2.3 Onderzoeksvragen en geselecteerde locaties per bron

Deze paragraaf vat de onderzoeksvragen en de geselecteerde locaties per bron samen. Een uitgebreide beschrijving van de karakteristieken voor elke locatie vindt u in het betreffende hoofdstuk (hoofdstukken 3 tot en met 9).

2.3.1 Invloed landbouw

Verschillende typen agrarische fecale bronnen kunnen bijdragen aan antibioticaresistente bacteriën in oppervlaktewater. Denk aan uitgereden mest, uitwerpselen van weidedieren en vrije uitlopdieren, en erfafspoeling. Factoren die de emissie vanuit deze fecale bronnen naar oppervlaktewater beïnvloeden, zijn: het bemestingsgedrag (gebonden aan seizoenen), de hoeveelheid neerslag (afspoeling), het type uitgereden mest of gehouden landbouwhuisdieren (prevalentie van ESBL-EC en AmpR-Ent) en bedrijfsvoering (bijvoorbeeld het afvoeren van mest en afvalwater of het schoonmaken van het erf).

De onderzoeksvragen voor de invloed van landbouw zijn:

- 1) Hoeveel resistente bacteriën zitten in oppervlaktewater in een landbouwgedomineerd gebied:
 - a wat betreft concentraties en totale vracht;
 - b bij nat en droog weer?
- 2) Is er een verband tussen bemesting en bacterieconcentraties (vrachten) in oppervlaktewater?

De belangrijkste selectiecriteria voor geschikte locaties zijn de aanwezigheid van landbouw/weidedieren als vermoedelijke dominante bron en de afwezigheid van invloed van humaan

afvalwater. Idealiter is daarnaast nog kennis voorhanden over het tijdstip van bemesting en het type uitgereden mest én zijn debietmetingen mogelijk in het oppervlaktewater.

Uiteindelijk zijn de Han Stijkeltocht bij gemaal Piet Oberman in Tollebeek (zie hoofdstuk 5), de rivier de Groote Beerze bovenstrooms van rwzi Hapert (zie hoofdstuk 3) en de rivier de Groote Wetering bovenstrooms van rwzi Vinkel (zie hoofdstuk 4) geselecteerd. Deze locaties verschilden zowel wat betreft hydrologisch systeem als type bron. In het afgesloten hydrologische gebied nabij gemaal Piet Oberman is uitgereden mest de dominante fecale bron. De Groote Beerze stroomt door een veeteeltgebied. Agrarische fecale bronnen bestaan hier naar verwachting uit uitgereden mest en afspoeling van veehouderijen. De Groote Wetering stroomt door landbouwkundig gebied, maar er is geen specifieke informatie bekend over de aard van de landbouw. Bovenstrooms van rwzi Vinkel is meer aanvullende invloed te verwachten van gemengde overstorten dan bovenstrooms van rwzi Hapert. Onbekend is op welke data de overstorten actief zijn geweest.

2.3.2 Invloed rwzi-effluent

Factoren die waarschijnlijk invloed hebben op de emissie van antibioticaresistente bacteriën vanuit rwzi's, zijn: zuiveringsefficiëntie (wel of geen nazuivering), de ligging in stedelijk of landelijk gebied, de aanwezigheid van 'speciaal' afvalwater (zoals dat uit ziekenhuizen en andere zorginstellingen) en de hoeveelheid neerslag.

De onderzoeksvragen voor de invloed van rwzi-effluent zijn:

- 1) Hoeveel resistente bacteriën zitten in rwzi-effluenten en het ontvangende oppervlaktewater:
 - a wat betreft concentraties en vrachten;
 - b bij nat en droog weer?
- 2) Wat is de bijdrage van effluent aan de totale vracht in oppervlaktewater?

Om de vragen te beantwoorden, zijn effect- en bronmetingen gedaan. De belangrijkste selectiecriteria voor effectmetingen zijn een continue stroomrichting van het ontvangende oppervlaktewater, de afwezigheid van andere dominante bronnen bovenstrooms van de rwzi's en de mogelijkheid om debieten te bepalen. De keuze is gevallen op rwzi Hapert en de Groote Beerze (in beheer van Waterschap De Dommel, zie hoofdstuk 3) en rwzi Vinkel en de Groote Wetering (in beheer van Waterschap Aa en Maas, zie hoofdstuk 4).

De bronmetingen zijn uitgevoerd om de representativiteit van het effluent in de effluentmetingen te controleren. Hiervoor zijn twee rwzi's gedurende een jaar elke maand bemonsterd (rwzi Hapert en rwzi Zeewolde) en zijn honderd rwzi's elk één keer bemonsterd (zie hoofdstuk 8). De metingen bij de honderd rwzi's zijn uitgevoerd in het kader van een verwant RIVM-onderzoek in opdracht van het ministerie van VWS en gedocumenteerd in RIVM-rapport 2017-058 (*Schmitt et al., 2017*).

2.3.3 Invloed gemengde overstorten

Factoren die waarschijnlijk invloed hebben op de emissie van resistente bacteriën bij gemengde overstorten, zijn: stelselkenmerken en randvoorzieningen, de hoeveelheid neerslag en het neerslagpatroon (in verband met verblijftijd in het stelsel).

De onderzoeksvragen voor de invloed van gemengde overstorten zijn:

- 1) Hoeveel resistente bacteriën zitten in overstortwater?
- 2) Wat is de bijdrage van lozingen uit overstorten aan de totale vracht in oppervlaktewater?
- 3) Wat is de geschatte emissie (vracht) vanuit gemengde overstorten in vergelijking tot rwzi-effluent?

Om onderzoeksvraag 2 te kunnen beantwoorden, zijn effectmetingen nodig. Hiervoor moet het mogelijk zijn om tijdens de overstorting te bemonsteren (monsternamekast noodzakelijk) en mogen er geen randvoorzieningen aanwezig zijn of randvoorzieningen met een geringe bergingscapaciteit.

De zes bemeten gemengde overstorten in deze studie zijn: OS De Vliegert (Hapert), OS Sniederslaan (Bladel), OS rwzi Harderwijk, OS 'aan te veer' (Dieren), OS Kanaalweg (Dieren)

en OS Kennedylaan (Velp). Van deze overstorten is OS 'aan te veer' een directe overstort, de overige hebben randvoorzieningen. Monsternamekasten zijn aanwezig bij de overstorten in Harderwijk, Dieren en Velp. OS Kanaalweg in Dieren heeft tijdens de studieperiode niet overgestort. Verder is er één directe lozing geweest vanuit een gemengde overstort op een niet-geselecteerde locatie, waar de monsternemer toevallig op dat moment aanwezig was (OS Provinciale Weg, Hapert).

Tijdens de meetperiode zijn bij de locaties met monsternamekasten geen noemenswaardige externe overstortingen geweest (met uitzondering van OS 'aan te veer' in Dieren, maar daar is het ontvangende oppervlaktewater niet bemonsterd), of bij de locaties waar met de hand is bemonsterd, waren de monsternemers niet ter plaatse op het moment van een externe overstorting. De in de studie gegenereerde gegevens zijn daarom vooral bronmetingen.

2.3.4 Invloed foutaansluitingen bij gescheiden riolering

Bij foutaansluitingen op gescheiden riolering is emissie van antibioticaresistente bacteriën in de hemelwaterafvoer te verwachten. Factoren die waarschijnlijk invloed op die emissie hebben, zijn: het percentage foutaansluitingen, de grootte van het gebied (in verband met het percentage dragerschap van de resistente bacteriën) en neerslag (verdunding).

De onderzoeksvragen voor de invloed van foutaansluitingen bij gescheiden riolering zijn:

- 1) Hoeveel resistente bacteriën zitten in een watersysteem onder invloed van gescheiden riolering?
- 2) Is er een verband tussen de hoeveelheid neerslag en concentraties in het watersysteem?

Om te kunnen inschatten of de waargenomen resistente bacteriën met enige waarschijnlijkheid te verklaren zijn door foutaansluitingen, zijn gebieden geselecteerd waar geen invloed is van overstortingen uit gemengde riolering, rwzi-effluenten of landbouw. De geselecteerde gebieden zijn: Almere Stad (Waterschap Zuiderzeeland) en drie wijken in Amersfoort en één in Soest (Waterschap Vallei en Veluwe). In Almere Stad zijn willekeurig vijftien locaties geselecteerd. In de wijken in Amersfoort en Soest is een deel van de locaties geselecteerd omdat het waterschap deze verdenkt van foutaansluitingen. De overige locaties zijn óf willekeurig geselecteerd óf omdat ze uitnodigen tot recreatie.

2.3.5 Invloed wilde dieren

Het is bekend dat wilde dieren ook drager van ESBL-EC kunnen zijn. Omdat deze dieren geen antibiotica gebruiken, krijgen ze deze bacteriën waarschijnlijk binnen tijdens het eten of drinken op plekken die gecontamineerd zijn met fecaliën van mensen of (landbouw)huisdieren. Tijdens de selectie van geschikte onderzoekslocaties met Waterschap Zuiderzeeland kwamen de Oostvaardersplassen terloops ter sprake. Omdat dit een geïsoleerd natuurgebied is zonder invloed van humaan afvalwater of landbouw, is het heel geschikt om de natuurlijke achtergrond en invloed van wilde dieren te onderzoeken. Factoren die waarschijnlijk invloed hebben op de emissie van resistente bacteriën zijn: het percentage dragerschap bij de verschillende diersoorten, de migratieseizoenen van trekvogels (wintergasten uit het noorden en zomergasten uit het zuiden) en neerslag (verdunding).

De onderzoeksvraag voor de invloed van wilde dieren is: hoeveel resistente bacteriën zitten in oppervlaktewater onder invloed van wilde dieren?

2.4 Microbiologische analyses

2.4.1 Monstername

Waar mogelijk hebben automatische monsternamekasten de monsters genomen. De locaties waar dat is gebeurd, zijn de rwzi's, inclusief boven- en benedenstroomse locaties (effectmetingen rwzi-effluent), het gemaal Piet Oberman (effect landbouw) en de gemengde overstortlocaties in Harderwijk, Dieren en Velp. De overige monsters zijn steekmonsters.

2.4.2 Isolatie en enumeratie bacteriën

In de oppervlaktewatermonsters zijn de concentraties bepaald van de indicatorbacteriën *E. coli* en enterokokken en van de antibioticaresistente bacteriën ESBL-EC en AmpR-Ent. Hiervoor is het water over membraanfilters gefiltreerd en zijn de filters op selectieve voedings-

bodems gekweekt: beta-x-glucuronidase agar voor *E. coli*, ChromID-ESBL agar voor ESBL-EC, Slanetz and Bartley voor enterokokken en Slanetz and Bartly waaraan 16 µg/ml ampicilline is toegevoegd voor de isolatie van AmpR-Ent. Van elk monster zijn verschillende volumes gefiltreerd en gekweekt. Het totaal gefiltreerde volume bepaalt de detectiegrens van de analyse. *E. coli* en ESBL-EC zijn gekweekt door 4 uur te incuberen bij 37°C, gevolgd door 18 tot 24 uur bij 44°C; enterokokken en AmpR-Ent zijn gekweekt door 44 tot 48 uur te incuberen bij 37°C. Na deze incubatie zijn de filters 2 uur op Gal Aesculine Azide agar geïncubeerd om enterokokken te indentificeren. In alle gevallen zijn de aantallen specifieke kolonies geteld. Uit de kolonietallen en de geanalyseerde volumes zijn de bacterieconcentraties berekend.

2.4.3 Karakterisatie resistente stammen

Van ESBL-EC en AmpR-Ent zijn enkele kolonies (maximaal vijf) rein gekweekt voor verdere karakterisatie. Voor ESBL-EC-isolaten zijn met PCR vastgesteld welke ESBL-genen aanwezig zijn: van het type CTX-M, TEM, SHV of OXA. Als isolaten positief zijn voor een of meer van deze genen, is vervolgens het precieze type van de genen bepaald door te sequencen (bijvoorbeeld CTX-M-1, CTX-M-15, TEM-52, etc.). De verkregen sequenties zijn geanalyseerd in het computerprogramma Bionumerics. Naast analyse van de ESBL-genen is het type *E. coli* bepaald met Multi Locus Sequence Typing (MLST). Deze methode gebruikt genetische variatie die aanwezig is in de genen die alle bacteriën hebben om te kunnen leven, zogenaamde huishoudgenen. Bij MLST wordt voor zeven van deze genen de sequentie bepaald. Gebaseerd op de sequenties krijgt elke *E. coli* een nummer toegekend, het 'sequentietype'. Een voorbeeld van een sequentietype van ESBL-EC die veel voorkomt bij mensen, is ST131 in combinatie met het ESBL-gen CTX-M-15. Voor AmpR-Ent zijn de species van de enterokokken met MALDI-TOF bepaald.

2.4.4 Andere antibioticaresistentie bij *E. coli*

Voor enkele locaties zijn 'gewone' *E. coli*-bacteriën geïsoleerd en opgekweekt om de aanwezigheid van andere antibioticaresistenties te onderzoeken dan die ESBL-genen veroorzaken. De betreffende locaties zijn: Piet Oberman, Groote Beerze bovenstrooms en de Groote Wetering. Hierbij is de aanwezigheid onderzocht van resistentie tegen cefotaxime (resistentie veroorzaakt door onder andere ESBL-genen), gentamycine, nalidixinezuur, streptomycine en tetracycline. Om de resistentie te bepalen, is de methode 'diskdiffusie' gebruikt. Hiervoor wordt de bacteriestam gekweekt op een voedingsbodem (Mueller-Hinton agar), waarop een papieren diskje wordt geplaatst waarin het antibioticum zit. Het antibioticum diffundeert in de voedingsbodem, waardoor de concentratie antibioticum dicht bij het diskje het hoogst is en verder van het diskje af lager. Als de bacteriestam resistent is, is dat te zien doordat rond de disk gewoon groei is, terwijl een gevoelige stam niet in de buurt van het diskje kan groeien.

2.4.5 Aanwezigheid resistentiegenen in DNA microbiele gemeenschap

Aanvullend is voor enkele locaties, met name in landelijk gebied, met kwantitatieve PCR de aanwezigheid van resistentiegenen in de gehele bacteriëngemeenschap geanalyseerd. Daarvoor is 100 ml water over een 'mixed cellulose'-membraanfilter met een poriegrootte van 0,22 µm gefiltreerd. DNA van alle op de filter aanwezige bacteriën is met het Powerwater DNA extraction-kit (MO BIO Laboratories, Inc. CA) geëxtraheerd.

DNA is tien of honderd keer verdund om remming van de PCR uit te sluiten. Een reeks van resistentiegenen is met kwantitatieve PCR onderzocht: het tetracycline resistentiegen *tetW*, het erythromycine resistentiegen *ermB*, de sulfonamide resistentiegenen *sul1* en *sul2*, en het 16S rRNA-gen (voor normalisatie voor de totale hoeveelheid bacteriële DNA in het monster). Voor probe PCR's is het iQ Supermix (biorad) gebruikt en voor SybrGreen PCR's het iQ sybr green PCR master mix (biorad) met primers (zie tabel 2.2). Als positieve controles en voor het maken van een calibratiecurve is synthetische DNA gebruikt (Integrated DNA Technologies, Carolville, Iowa).

Gen	Primer (forward)	Primer (reverse)	Probe	Annealing temp (°C)	References
ermB	AAAACTTACCC GCCATACCA	TTTGGCGTGTT TCATTGCTT	N/A	60	(Knapp et al. 2010)
Sul 1	CCGTTGGCCTT CCTGTAAAG	TTGCCGATC GCGTGAAGT	FAM-CAGCGAGCC TTGCGGCGG-TAMRA	58	(Heuer en Smalla 2007)
Sul 2	CGGCTGCGC TTCGATT	CGCGCGCA GAAAGGATT	FAM-CGGTGCTT CTGTCTGTCTGTTTC GCGC-TAMRA	60	(Heuer et al. 2008)
tetW	CGGCAGCGC AAAGAGAAC	CGGGTCAGTAT CCGCAAGTT	FAM-CTGGACGCTC TTACG-BHQ1	59	(Walsh et al. 2011)
16S	ACTCCTACGGG AGGCAGCAG	ATTACCGC GGCTGCTGG		60	(Fierer et al. 2005)

Tabel 2.2 Details gebruikte PCR-reacties

3 Groote Beerze

In de Brabantse rivier de Groote Beerze is het effect van meerdere bronnen op de aanwezigheid van resistente bacteriën in het oppervlaktewater onderzocht: landbouw, rwzi-effluent en overstortwater van gemengde riolering.

3.1 Onderzoeksvragen

De onderzoeksvragen voor de Groote Beerze zijn:

- 1) Hoeveel resistente bacteriën zitten in oppervlaktewater helemaal bovenstrooms in de rivier (landelijke achtergrond, effect landbouw en wilde dieren):
 - a wat betreft concentraties en totale vracht;
 - b bij nat en droog weer;
 - c binnen en buiten het bemestingsseizoen?
- 2) Hoeveel resistente bacteriën zitten in het effluent van rwzi Hapert en boven- en benedenstrooms van het effluentlozingspunt:
 - a wat betreft concentraties en vrachten;
 - b bij nat en droog weer?
- 3) Hoeveel resistente bacteriën zitten in overstortwater van overstorten die de Groote Beerze kunnen beïnvloeden (OS De Vliegert en OS Sniederslaan)?

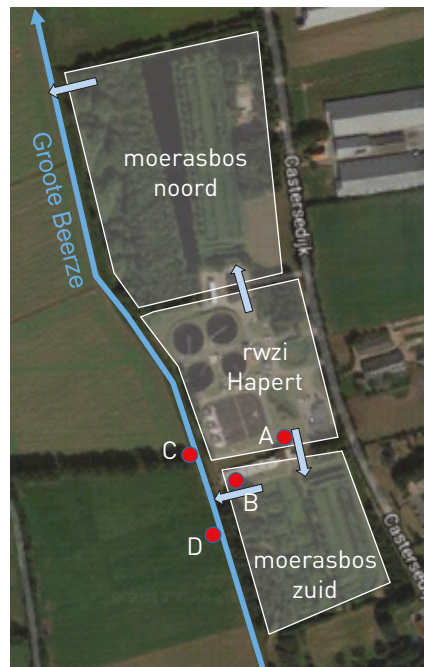
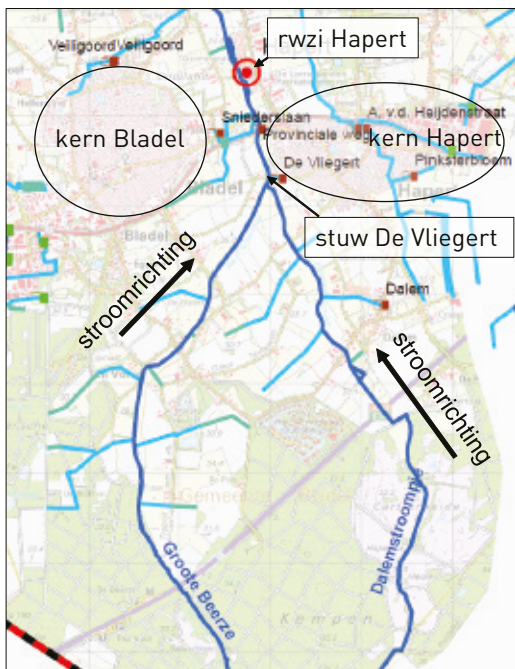
3.2 Topografie en gebiedsinformatie

Het watersysteem van het riviertje de Groote Beerze ligt in zuidelijk Brabant ten zuidwesten van Eindhoven in het beheergebied van Waterschap De Dommel (zie figuur 3.1, links). Het meest bovenstroomse deel ligt ten zuiden van de dorpen Bladel en Hapert en wordt gevoed door twee takken: Groote Beerze en Dalemstroompje. Beide stroompjes ontstaan in natuurgebied De Kempen, passeren een landbouwareaal en komen dan samen juist ten zuiden van de kern Hapert. Vlak na de samenloop van de twee takken ligt een stuw (De Vliegert).

Vier overstorten kunnen water vanuit de gemengde riolering lozen in het watersysteem (zie ook figuur 3.1, links): OS Dalem (kern Dalem, via een waterloop), OS Sniederslaan (vanuit kern Bladel, via een korte waterloop), OS De Vliegert (kern Hapert, via een korte waterloop) en OS Provinciale Weg (kern Hapert, direct). De overstorten Sniederslaan en De Vliegert hebben 'groene buffers' die zich bij een overstorting eerst vullen voordat het water in de rivier overstort. De buffers ledigen naar de rioolstelsels. In het gebied is geen ziekenhuis aanwezig.

Benedenstrooms van de dorpen ligt de rwzi Hapert. Het rwzi-effluent wordt nabehandeld in twee moerasbossen direct ten noorden (verblijftijd ongeveer drie dagen) en ten zuiden (verblijftijd ongeveer een dag) van de rwzi (zie figuur 3.1, rechts). Het effluent van de beide moerasbossen loost in de Groote Beerze. In het project is uit praktische overwegingen alleen de route via het zuidelijke moerasbos beschouwd.

In het gebied zijn meet- en monsternamelocaties ingericht om het hydraulisch functioneren van de deelsystemen (rivier, overstorten en rwzi) in beeld te brengen en om monsters te nemen.



Figuur 3.1 Topografisch overzicht watersysteem Groote Beerze met overstorten (rode vierkantjes, links) en rondom rwzi Hapert (rechts)

A = instroom rwzi-effluent in moerasbos, B = lozing effluent na zuivering in moerasbos, C = beneden-stroomse punt, D = bovenstroomse punt.

De precieze ligging van de monsternamekasten ziet u in figuur 3.2.



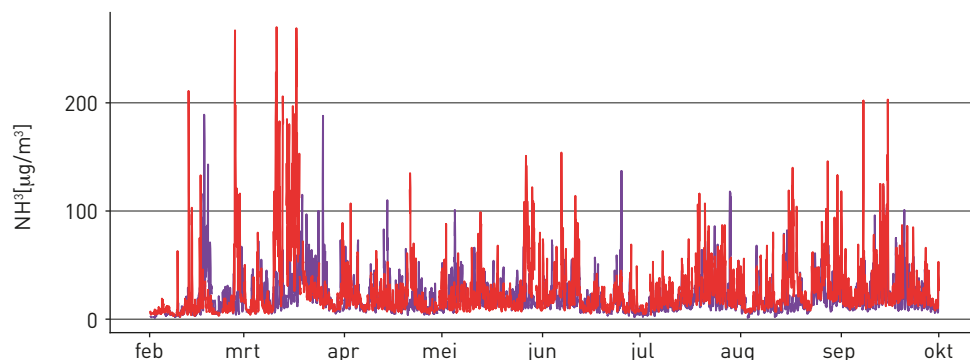
Figuur 3.2 Ligging monsternamekasten

B = effluent moerasbos, D = Groote Beerze bovenstrooms effluentlozing, C = Groote Beerze beneden-strooms effluentlozing.

Landbouwactiviteiten in de Groote Beerze

Er is geen gedetailleerde informatie beschikbaar over het aantal veehouderijen in het gebied bovenstrooms van de Groote Beerze. Ook is niet precies bekend wanneer en met welke mestsoort akkers en graslanden zijn bemest. Indicaties voor het tijdstip van mest uitrijden zijn te verkrijgen aan hand van de ammoniakconcentraties in de lucht, die aan bemesting zijn gerelateerd en in enkele meetstations in Nederland worden gemeten. De ammoniakconcentraties in Brabant (zie figuur 3.3) tonen dat bemestingspieken vooral tussen eind februari en begin april en rond eind mei optraden. In hoeverre deze data representatief zijn voor bemesting op lokaal niveau, is niet bekend.

Figuur 3.3 Ammoniakconcentraties bij twee luchtmeetstations, indicatief voor pieken in bemesting (bron: Landelijk meetnet luchtkwaliteit)



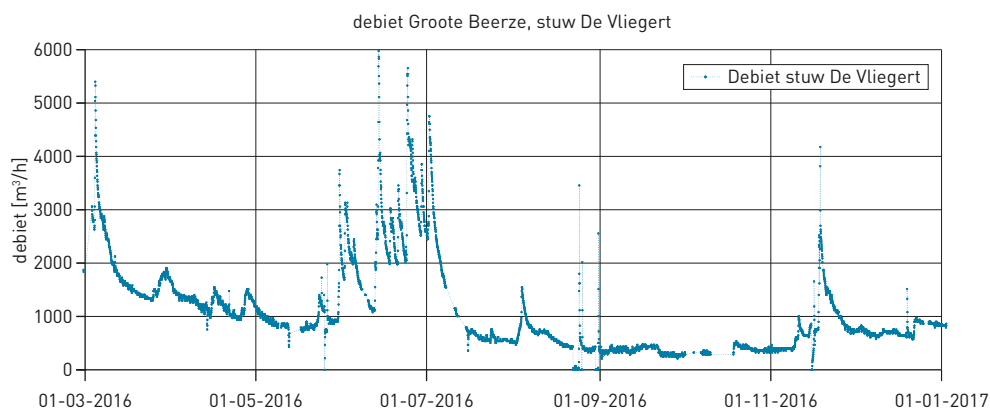
Rood = Vredepeel (Brabant), Paars = Wekerom (Veluwe)

3.3 Hydraulisch functioneren

Het hydraulisch functioneren van de Groote Beerze is in beeld gebracht met niveaumetingen in de rivier bij stuw De Vliegert. Het debiet over de stuw is berekend aan de hand van het bovenstroomse waterniveau (bij de stuw) en een bekende Q/h-relatie. Vrije afstromingscondities zijn geverifieerd aan de hand van het benedenstroomse waterniveau. Historische metingen laten zien dat de afvoer over de stuw varieert over het jaar met lage debieten in de zomer (300 - 500 m³/h) en hoge debieten in de winter (1.000 - 3.000 m³/h). In de monsternameperiode (maart - december 2016) week het afvoerpatroon deels af van de normale afvoer (zie figuur 3.4). Door overvloedige neerslag in juni 2016 is de afvoer in de Groote Beerze in die periode fors toegenomen. In december 2016 zijn juist relatief lage afvoeren gemeten.

Het debiet over stuw De Vliegert is als representatief beschouwd voor het deel van de Groote Beerze tussen de stuw en de rwzi (circa 1,5 km). Over dit traject veranderde het debiet slechts marginaal door enkele zijinstromen en incidenteel door overstortingen uit de gemengde stelsels. Pas bij de rwzi veranderde het debiet significant door lozing van de effluënten van de moerasbossen.

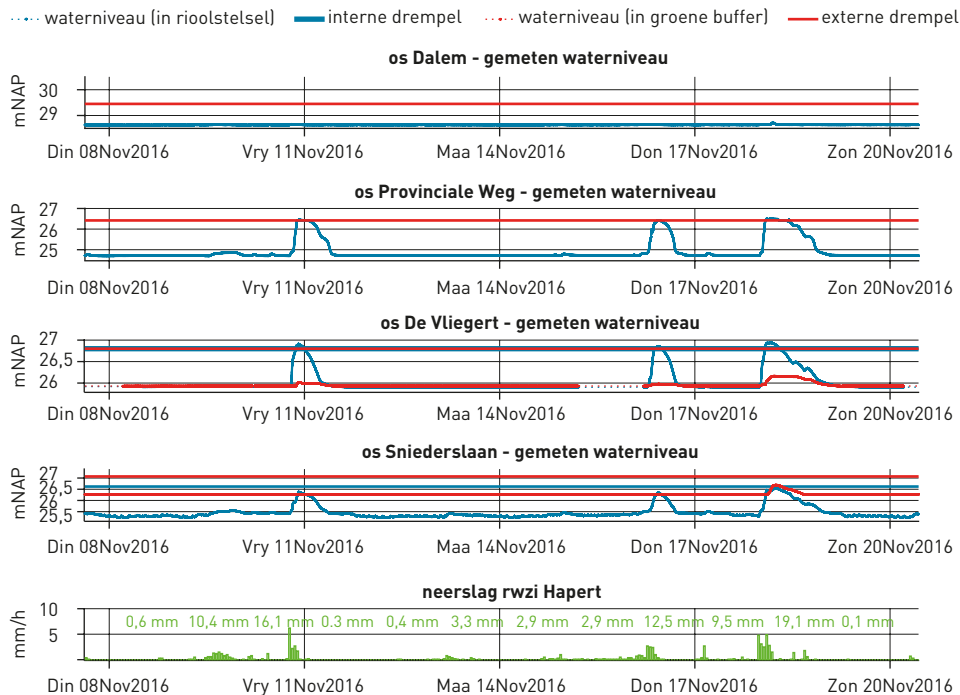
Figuur 3.4 Debiet Groote Beerze, periode maart - december 2016



Gemengde overstorten

Het functioneren van de vier gemengde overstorten is in beeld gebracht met niveaumetingen bij de overstorten. Figuur 3.5 laat een voorbeeld zien voor een periode met veel neerslag in november 2016. Voor de overstorten die direct lozen in de rivier (Dalem en Provinciale Weg) is het waterniveau in het stelsel bij de overstort geplot. Voor de overstorten met groene buffer (De Vliegert en Sniederslaan) is zowel het waterniveau in het stelsel als in de groene buffer geplot.

Overstort Dalem heeft tijdens de monsternamperiodes (maart - december 2016) slechts eenmaal kortstondig (1,5 uur) overgestort in de Groote Beerze en wel tijdens de extreme neerslag op 13 juni 2016 (> 50 mm in 6 uur). Bij overstort De Vliegert is bij twaalf gebeurtenissen de groene buffer deels volgestroomd, maar is geen enkele keer water over de externe drempel naar de Groote Beerze afgevoerd. Bij overstort Sniederslaan is de groene buffer weliswaar slechts vijf keer aangesproken, maar dit leidde wel vier keer tot een externe overstorting richting Groote Beerze. Deze vonden allemaal plaats in de natte periode in mei/juni 2016 en duurden in totaal 21 uur (30 mei en 1, 13 en 24 juni, gedurende respectievelijk 3 uur, 4 uur, 9 uur en 5 uur). Overstort Provinciale Weg heeft het vaakst en het langdurigst in de Groote Beerze geloosd: negen gebeurtenissen (vijf in mei/juni, een in juli en drie in november) met een totale duur van 77 uur.

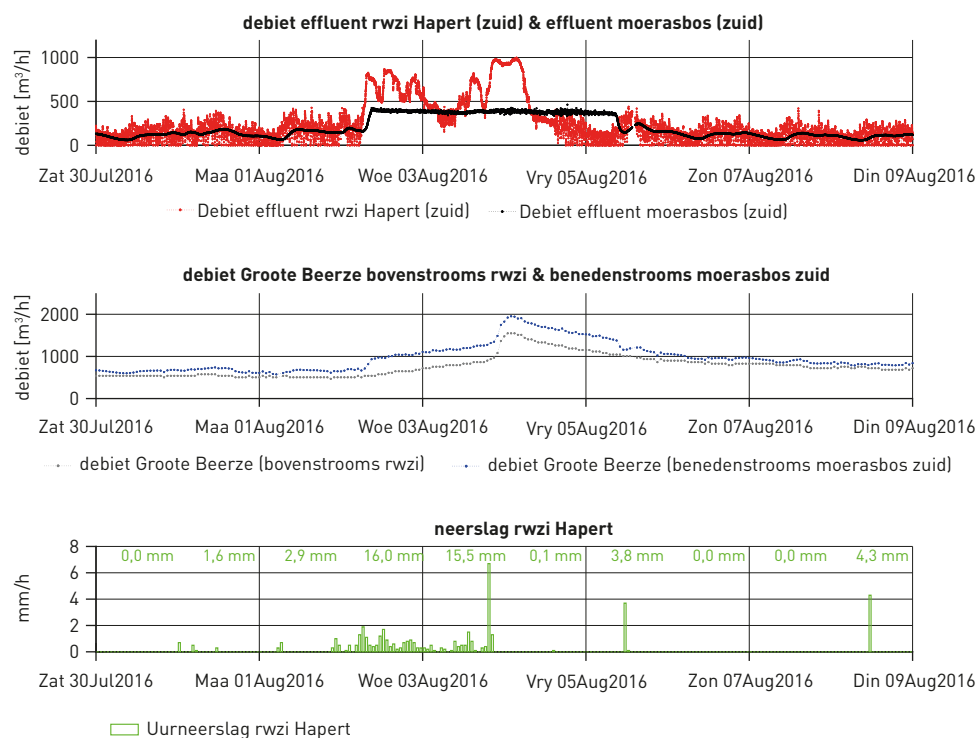


Figuur 3.5 Functioneren vier gemengde overstorten Groote Beerze, periode 8 - 20 november 2016

Rwzi Hapert

Het hydraulisch functioneren van de rwzi Hapert (effluentroute via moerasbos zuid) is in beeld gebracht met twee debietmetingen: bij het lozingspunt van de rwzi in moerasbos zuid (locatie A in figuur 3.1, rechts en bij het lozingspunt van moerasbos zuid in de Groote Beerze (locatie B). In figuur 3.6 (bovenste plot) zijn beide signalen getekend voor een week in augustus 2016. De metingen tonen dat het effluentdebiet – zoals verwacht – sterk reageerde op de neerslag van 2 en 3 augustus (onderste plot): het effluentdebiet nam toe tot ruim 800 m³/h. Met enige vertraging nam ook het effluentdebiet van het moerasbos toe, totdat het (ingestelde) maximum van 400 m³/h werd bereikt. Door deze regeling heeft het moerasbos behalve een zuiverende ook een bufferfunctie en beschermt het de Groote Beerze tegen overbelasting. Het effect van de lozing van moerasbos zuid op het debiet in de Groote Beerze is te zien in de middelste plot van figuur 3.6. Het debiet in de rivier bovenstrooms van de rwzi (op basis van de eerder beschreven metingen bij stuw De Vliegert) neemt toe met het effluentdebiet van het moerasbos. Het debiet in de Groote Beerze benedenstrooms van het moerasbos zuid is niet afgeleid op basis van een apart meetpunt, maar is de sommatie van het debiet bij stuw De Vliegert en van moerasbos zuid.

Figuur 3.6 Debiet effluent rwzi Hapert (zuid), moerasbos (zuid) en debiettoename in Groote Beerze, periode 30 juli - 9 augustus 2016



Neerslag

De hoeveelheid gevallen neerslag is in beeld gebracht met de (uur)meting op de rwzi Hapert (door Waterschap De Dommel), aangevuld met de (5-minuten)gegevens van KNMI-station Eindhoven.

3.4 Monsternamelocaties & -strategieën

Voor het onderzoek zijn in het gebied van de Groote Beerze op in totaal zes locaties monsters verzameld volgens verschillende bemonsteringsstrategieën.

Gemengde overstorten

Het (afval)water uit gemengde overstorten is handmatig bemonsterd uit de groene buffers bij de overstorten Sniederslaan en De Vliegert (zie figuur 3.7). Bij elke overschrijding van een minimumwaterniveau in de buffers (in verband met aanreistijd) is geprobeerd een monster te verzamelen van het in de buffers aanwezige overstortwater. In de praktijk is niet elke gebeurtenis bemonsterd, vooral doordat er geen laboratoriumcapaciteit beschikbaar was, bijvoorbeeld in het weekend. Bij toeval heeft de monsternemer ook eenmaal (op 13 juni, tijdens zware neerslag) het water uit overstort Provinciale Weg kunnen bemonsteren. Tabel 3.1 geeft een overzicht van de in totaal zeven geslaagde bemonsteringen.

Tabel 3.1 Monsternamedata gemengde overstorten

Locatie	Data monsternamen (2016)
groene buffer De Vliegert	9 februari
groene buffer De Vliegert	31 mei
groene buffer De Vliegert	13 juni
groene buffer De Vliegert	18 november
groene buffer Sniederslaan	13 juni
groene buffer Sniederslaan	18 november
overstort Provinciale Weg	13 juni



Figuur 3.7 Handmatige bemonstering groene buffer De Vliegert

Op 13 juni en 18 november zijn ook monsters uit de Groote Beerze genomen, bovenstrooms van de overstorten De Vliegert, Sniederslaan en Provinciale Weg (bij stuw De Vliegert) en benedenstrooms van de overstorten (bij het bovenstroomse meetpunt bij de rwzi, locatie D in figuur 3.2).

Effluent rwzi Hapert

Het effluent van de rwzi Hapert is met de bestaande monsterkast bij de effluentleiding naar moerasbos zuid (locatie A in figuur 3.1) bemonsterd. Deze kast werd al ingezet voor de reguliere willekeurige bemonstering van het rwzi-effluent. Voor het project is aansluiting gezocht bij deze maandelijkse monsternamen door een deel van de verzamelde monsters naar de RIVM- en IRAS-laboratoria te vervoeren. De kast verzamelde debietproportionele monsters op basis van de debietmeting in de effluentleiding. In tabel 3.2 staan de monsternamedata. De monsters zijn verzameld tussen 9:00 uur op de voorafgaande dag en 9:00 uur op de genoemde dag.

Locatie	Data monsternamen (2016)
effluent rwzi Hapert	7 december (2015)
effluent rwzi Hapert	11 januari
effluent rwzi Hapert	8 februari
effluent rwzi Hapert	14 maart
effluent rwzi Hapert	11 april
effluent rwzi Hapert	2 mei
effluent rwzi Hapert	13 juni
effluent rwzi Hapert	11 juli
effluent rwzi Hapert	15 augustus
effluent rwzi Hapert	12 september
effluent rwzi Hapert	17 oktober
effluent rwzi Hapert	14 november

Tabel 3.2 Monsternamedata effluent rwzi Hapert

Groote Beerze

Voor de effectmetingen van lozingen in de Groote Beerze zijn drie nieuwe, automatische monsternamekasten geïnstalleerd op de volgende locaties (zie figuur 3.8):

- langs de Groote Beerze bovenstrooms van het lozingspunt van moerasbos zuid (locatie D in figuur 3.2);
- bij de effluentleiding van moerasbos zuid nabij de lozingslocatie naar de Groote Beerze (locatie B in figuur 3.2);
- langs de Groote Beerze benedenstrooms van het lozingspunt van moerasbos zuid (locatie C in figuur 3.2).

Figuur 3.8 Drie monsternamekasten rondom lozingspunt moerasbos zuid in Groote Beerze

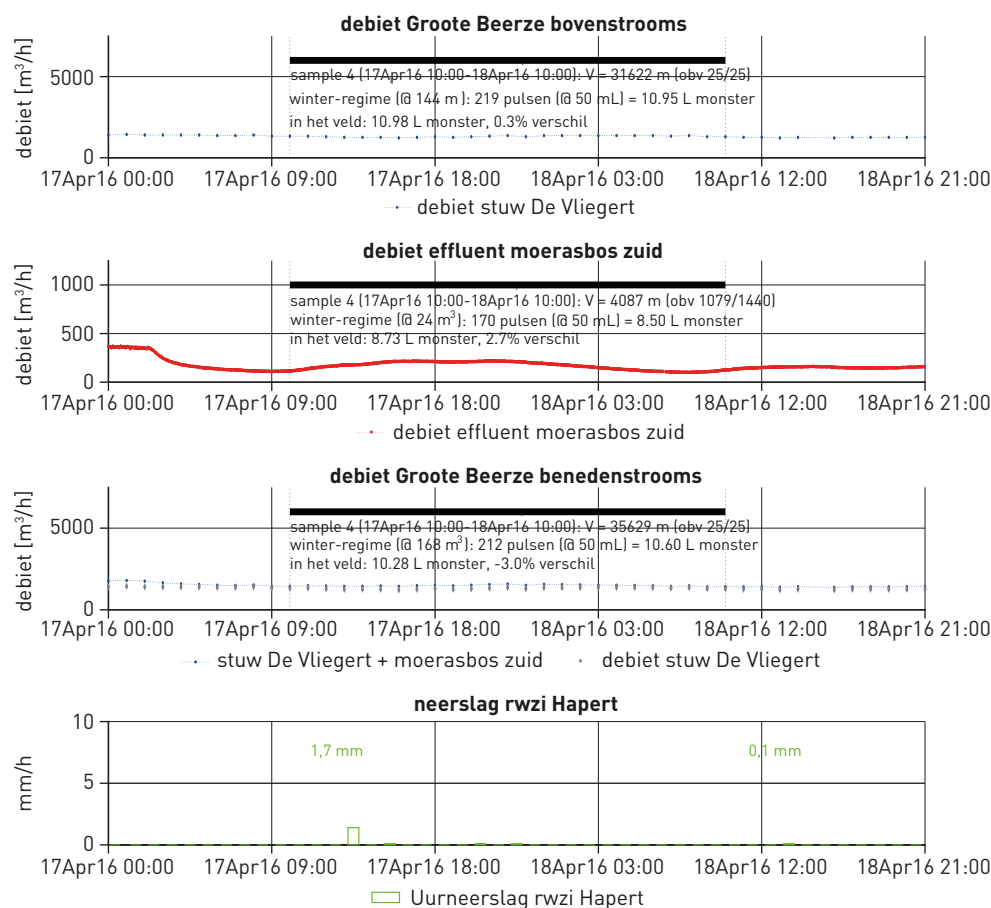


De kasten hebben debietproportionele 24-uursmonsters genomen op basis van (respectievelijk) de debietmeting bij stuw De Vliegert, de debietmeting in de effluentleiding van het moerasbos en de som van beide debietmetingen. De kasten werkten simultaan (dus ze bemonsterden exact dezelfde periode van 24 uur) om het effect van de lozing op de bacterieconcentraties in de rivier inzichtelijk te kunnen maken. Na elke monstername en vóór de analyse is het functioneren van de kasten gecontroleerd door het ‘theoretische’ monsternamevolume (op basis van de debietmetingen) te vergelijken met de daadwerkelijke volumes in de flessen.

Figuur 3.9 laat een voorbeeld zien voor een monstername in april 2016. In de bemonsteringsperiode (17 april 10:00 uur - 18 april 10:00 uur) zou de kast bovenstrooms van de rwzi 10,95 liter (l) monster moeten hebben verzameld op basis van het gepasseerde volume die dag (31.622 m³). In het veld is 10,98 l geconstateerd, een kleine afwijking van ongeveer 0,3%. De kasten ‘moerasbos zuid’ en ‘Groote Beerze benedenstrooms’ hebben een iets grotere afwijking van respectievelijk 2,7% en 3,0%. Bij te grote afwijkingen (> 10 %, bijvoorbeeld doordat een kast verstopt raakt) zijn de monsters niet geanalyseerd.

Beide kasten die de Groote Beerze bemonsteren, hebben twee verschillende monsternameregimes. Dit onderscheid is gemaakt om in droge perioden met relatief weinig afvoer toch afdoende monstervolume te kunnen verzamelen (> 3 l) en om op dagen met veel afvoer 24 uur te kunnen bemonsteren zonder dat het maximumvolume in de kast wordt overschreden (4 x 18 l). Hiervoor zijn respectievelijk een zomerregime (50 ml monster voor elke 72/84 m³ afvoer) en een winterregime (50 ml monster voor elke 144/168 m³) in het leven geroepen. Vóór elke monstername is ingeschat welk regime het meest geschikt zou zijn.

Figuur 3.9 Controle functioneren monsternamekasten rondom lozingspunt moerasbos zuid in Groote Beerze



Mestuitrijden en erfafspoeling veehouderijen

De verwachting vooraf was dat dierlijke mest die afspoelt van landbouwgrond en erfafspoeling van veehouderijen de waarschijnlijke bronnen zouden zijn van de bacteriën in de Groote Beerze bovenstrooms van de rwzi. Om de invloed van mestuitrijden te onderzoeken, is de monstername zodanig gepland dat zowel monsters zijn genomen buiten het mestuitrijdseizoen (einde herfst, winter) als erbinen (lente - zomer, begin herfst). Ook is geprobeerd om in beide seizoenen in droge perioden (geen afspoeling verwacht) en in natte perioden (wel afspoeling) te bemonsteren. Omdat het proces van neerslag, afspoeling en transport door de rivier enige tijd kan duren en om de dynamiek hierin te kunnen bestuderen, is in natte perioden twee tot drie dagen achter elkaar bemonsterd (dus meerdere, opeenvolgende 24-uursmonsters verzameld). In tabel 3.3 ziet u een overzicht van alle achttien monster-namedagen van de drie monsternamekasten.

Data monstername (2016)	Droog/nat	Mestuitrijdseizoen
29 maart	droog	ja
4 april	droog	ja
11 april	droog	ja
18 april	droog	ja
25-26 april	nat	ja
23-24-25 mei	nat	ja
26 juli	droog	ja
15 augustus	droog	ja
29 augustus	droog	ja
5-6-7 september	nat	ja
12 september	droog	nee
21 november	droog	nee
5 december	droog	nee

Tabel 3.3 Monsternamedata effectmeting in Groote Beerze rondom lozing moerasbos zuid

3.5 Meetresultaten: concentraties en vrachten

3.5.1 Landelijk gebied

In totaal zijn bovenstrooms van de rwzi op achttien data monsters genomen (zie figuur 3.10). In de studieperiode vielen drie natte perioden, allemaal in het mestuitrijdseizoen. Er is geen gelegenheid geweest om een natte periode binnen de controleperiode (december/januari) te onderzoeken (in januari 2016 stond de kast er nog niet, in december 2016/januari 2017 was het droog).

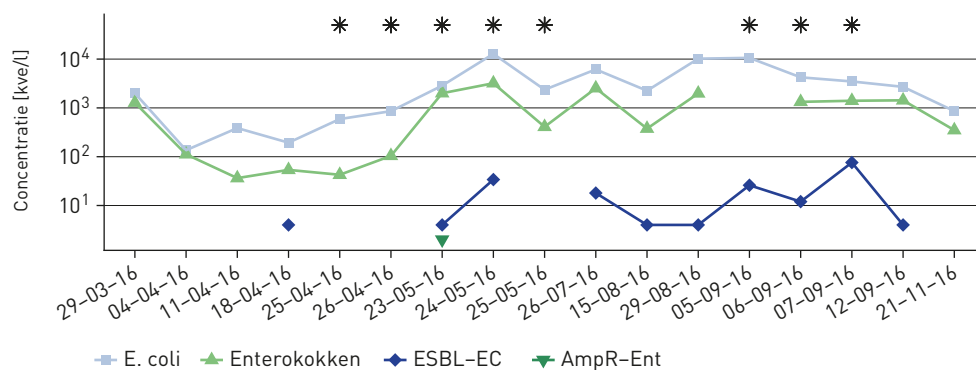
In tien van de achttien monsters (56%) is ESBL-EC aangetroffen. Er lijkt geen duidelijk verband met neerslag: 50% van de monsters genomen tijdens natte perioden is positief en 63% tijdens droge dagen (zie figuur 3.10). AmpR-Ent is slechts in een van de monsters (5,6%) aangetroffen, tijdens een natte periode. De concentraties totale E. coli en enterokokken lijken het hoogst te zijn vanaf eind mei tot en met begin september.

De gemiddelde concentratie ESBL-EC in de positieve monsters is 7 kolonievormende eenheden per liter (kve/l); in het ene AmpR-Ent-positieve monster is de concentratie 2,0 kve/l (zie tabel 3.4 in paragraaf 3.5.2).

Overige resistenties

Het resistentiegen tetW is in geen enkel monster aangetroffen, de resistentiegenen sul1, sul2 en ermB in een klein deel van de monsters (in twee tot vier van de negen onderzochte monsters). Uit de watermonsters zijn 176 gewone E. coli's geïsoleerd en getest op resistentie tegen andere antibiotica. Van deze E. coli is 7% resistent tegen tetracycline, 11% tegen streptomycine, 2,8% tegen nalidixinezuur en 1,1% tegen gentamycine. Ter vergelijking: 1,1% is resistent tegen cefotaxime, een antibioticum waartegen ESBL-EC ook resistent is. Van alle E. coli is 17% resistent tegen minstens een van de antibiotica.

Figuur 3.10 Bacterieconcentraties op meest bovenstroomse meetpunt



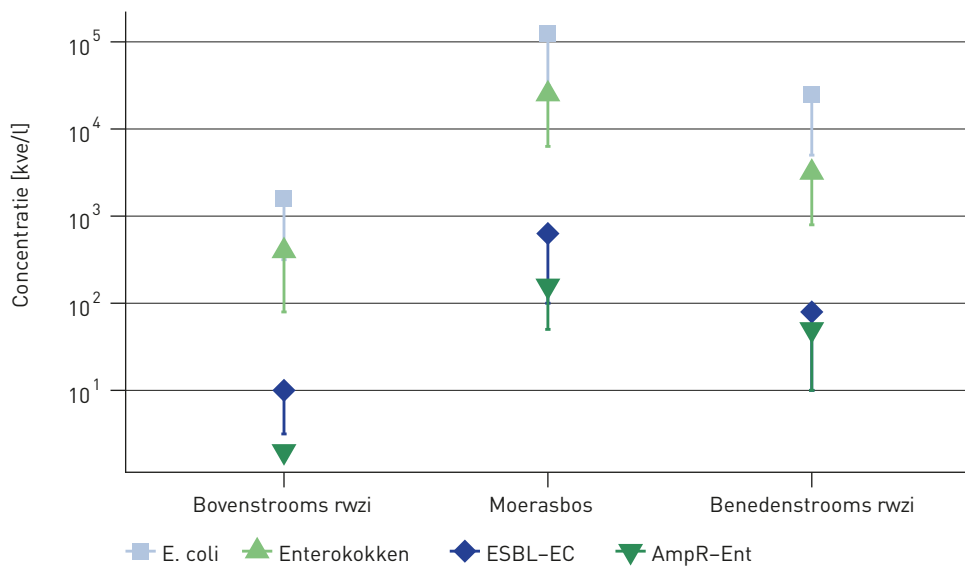
De sterretjes geven dagen met neerslag aan.

3.5.2 Rwzi-effluent

Het effect van lozing van rwzi-effluent in de Groote Beerze is gebaseerd op achttien meetdagen, waaronder drie natte perioden van twee of drie dagen op een rij. In het effluent van moerasbos zuid zijn $6,9 \times 10^2$ kve/l ESBL-EC en $1,4 \times 10^2$ kve/l AmpR-Ent aangetroffen (mediaan, zie tabel 3.4). Om de concentraties na passage door moerasbos zuid te vergelijken met de concentraties in effluent vóór passage door de moerasbossen, zijn ook de concentraties in het effluent vóór passage bepaald. Dit is gedaan door gedurende een jaar maandelijks monsters te nemen op willekeurig gekozen data. In deze monsters zijn de ESBL-EC- en AmpR-Ent-concentraties gemiddeld respectievelijk $8,0 \times 10^2$ en $2,3 \times 10^2$ kve/l (mediaan). Daarmee zijn ze vergelijkbaar met het effluent van moerasbos zuid.

Gemiddeld is de concentratie van de onderzochte bacteriesoorten benedenstrooms van de rwzi hoger dan bovenstrooms (zie figuur 3.11). E. coli en enterokokken zijn in alle monsters aangetroffen. ESBL-EC en AmpR-Ent zijn in respectievelijk 56% en 6% van de bovenstroomse monsters gevonden, en in 100% en 56% van de benedenstroomse monsters. De concentraties in de positieve monsters zijn voor ESBL-EC en AmpR-Ent respectievelijk 7 en 2,0 kve/l bovenstrooms, en 64 en 71 kve/l benedenstrooms (mediaan). Analyse van de vrachten laat zien dat de ESBL-EC en AmpR-Ent in de Groote Beerze benedenstrooms van de rwzi geheel zijn te verklaren door de bijdrage uit het effluent (zie figuur 3.12).

Hoewel er geen sterke associatie is tussen de isolaten uit de Groote Beerze benedenstrooms van de rwzi en die uit het moerasbos, bevestigen de resultaten van de nadere typering van de ESBL-EC de bevinding gebaseerd op vrachten. Er is een zeer grote verscheidenheid aan ESBL-EC-varianten gevonden, in totaal op de drie locaties en de achttien monsternamedata 84 verschillende varianten (van in totaal 221 isolaten). Sommige varianten zijn op meerdere tijdpunten aangetroffen. In totaal zijn qua varianten en tijdpunten 158 unieke combinaties gevonden. In 10% van de gevallen zijn varianten die op een bepaald tijdstip in het effluent zijn aangetoond ook benedenstrooms gevonden, en niet bovenstrooms. Dit lijkt in contrast met de significante bijdrage van effluent aan de ESBL-EC in de rivier gebaseerd op vrachten. Maar de overeenkomst tussen isolaten uit het moerasbos en bovenstroomse isolaten is wel duidelijk lager. In 1,9% van de gevallen is een variant dat op een bepaald tijdstip in effluent is aangetoond niet benedenstrooms gevonden, maar wel bovenstrooms.



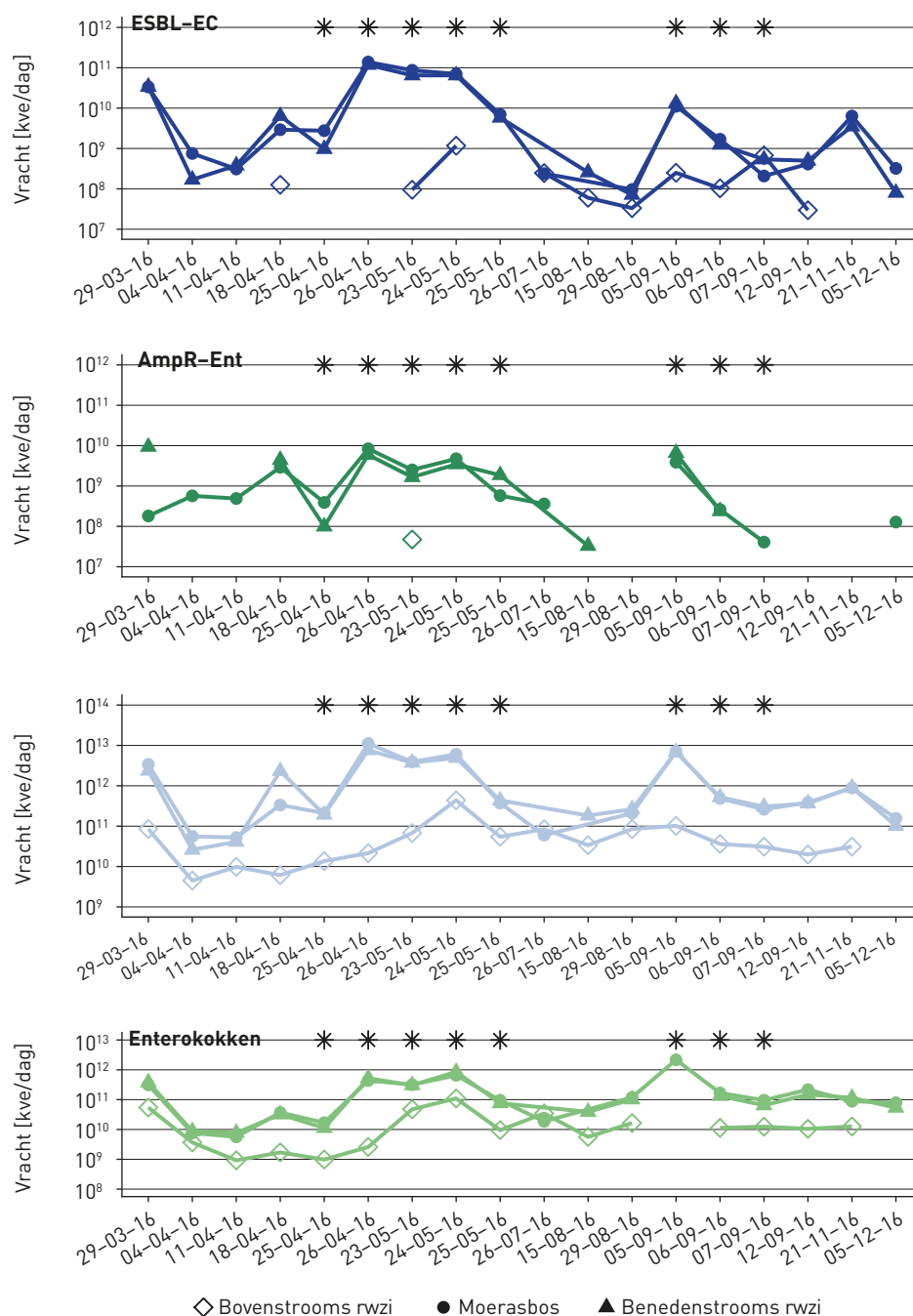
Figuur 3.11 Gemiddelde bacterieconcentraties in moerasbos en boven- en benedenstrooms lozingspunt effluent

Bacterie	Locatie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan [kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaardafwijking [log kve/l]
E. coli	Bovenstrooms	18	18	100	2,3x10 ³	3,2	0,7
	Effluent	18	18	100	1,2x10 ⁵	5,1	0,6
	Benedenstrooms	18	18	100	2,7x10 ⁴	4,4	0,7
Entero-kokken	Bovenstrooms	18	18	100	4,1x10 ²	2,6	0,7
	Effluent	18	18	100	3,8x10 ⁴	4,4	0,6
	Benedenstrooms	18	18	100	2,8x10 ³	3,5	0,6
ESBL-EC	Bovenstrooms	18	10	56	6,9x10 ⁰	1,0	0,5
	Effluent	18	18	100	6,9x10 ²	2,8	0,8
	Benedenstrooms	18	18	100	6,4x10 ¹	1,9	0,9
AmpR-Ent	Bovenstrooms	18	1	6	2,0x10 ⁰	0,3	NA
	Effluent	18	15	83	1,4x10 ²	2,2	0,5
	Benedenstrooms	18	10	56	7,1x10 ¹	1,7	0,7
sul1	Bovenstrooms	9	2	22	6,5x10 ⁶	6,8	0,2
	Effluent	9	6	67	2,4x10 ⁶	6,7	0,6
	Benedenstrooms	9	4	44	7,8x10 ⁶	6,7	0,5
sul2	Bovenstrooms	9	3	33	3,7x10 ⁷	7,4	0,3
	Effluent	9	9	100	5,5x10 ⁸	8,7	0,6
	Benedenstrooms	9	8	89	8,1x10 ⁷	8	0,6
ermB	Bovenstrooms	9	4	44	2,6x10 ⁶	6,2	0,7
	Effluent	9	9	100	2,4x10 ⁷	7,4	0,7
	Benedenstrooms	9	5	56	1,2x10 ⁷	7	0,3

NA = bij een meting is geen standaardafwijking te bepalen.

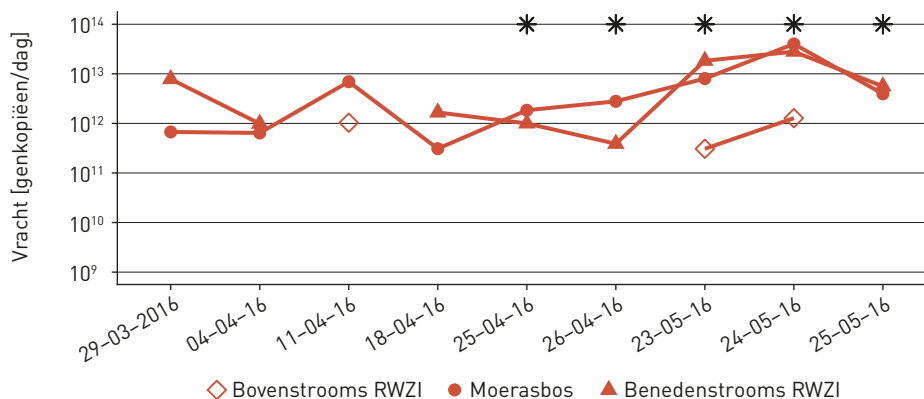
Tabel 3.4 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AMPR-ENT in oppervlaktewater in landelijk gebied

Figuur 3.12 Vrachten
ESBL-EC (donkerblauw),
AmpR-Ent (donkergroen),
E. coli (lichtblauw) en
enterokokken (lichtgroen)
in Groote Beerze en in effluent
rwzi Hapert (effluent
moerasbos zuid)



Ruit = bovenstrooms rwzi, cirkel = effluent na moerasbos zuid, driehoek = benedenstrooms.
De sterretjes geven dagen met neerslag aan.

Figuur 3.13 Vrachten sul1 in
Groote Beerze en in effluent
rwzi Hapert (effluent
moerasbos zuid)



Ruit = bovenstrooms rwzi, cirkel = effluent na moerasbos zuid, driehoek = benedenstrooms.
De sterretjes geven dagen met neerslag aan.

Overige resistenties

Het resistentiegen tetW is in geen effluent- en benedenstrooms monster aangetroffen, de resistentiegen sul2 en ermB zijn in een deel van de monsters gevonden. De vracht van sul1 die van het effluent afkomstig is, is meer dan tien keer hoger dan de vracht van de bovenstroomse monsters waarin sul1 is gedetecteerd (zie tabel 3.4 en figuur 3.13).

3.5.3 Overstorten

In totaal zijn de overstorten in Bladel en Hapert zeven keer bemonsterd. In tabel 3.5 ziet u de gemeten bacterieconcentraties. Gemiddeld zijn $8,3 \times 10^4$ kve/l ESBL-EC en $2,1 \times 10^2$ kve/l AmpR-Ent in overstortwater aangetroffen.

Overstort	Datum	Concentratie (kve/l)			
		E. coli	ESBL-EC	Enterokokken	AmpR-Ent
De Vliegert*	10-02-2016	$3,4 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$5,4 \times 10^3$
De Vliegert*	31-05-2016	$2,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^3$
De Vliegert	13-06-2016	$1,9 \times 10^7$	$1,1 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$
De Vliegert	18-11-2016	$1,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^6$	$< 2,3 \times 10^1$
Sniederslaan	13-06-2016	$1,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$7,6 \times 10^0$
Sniederslaan	18-11-2016	$5,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$	$5,7 \times 10^5$	$7,0 \times 10^1$
Provinciale Weg	13-06-2016	$7,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^4$	NA	$1,4 \times 10^2$

Tabel 3.5 Bacterieconcentraties in overstortwater

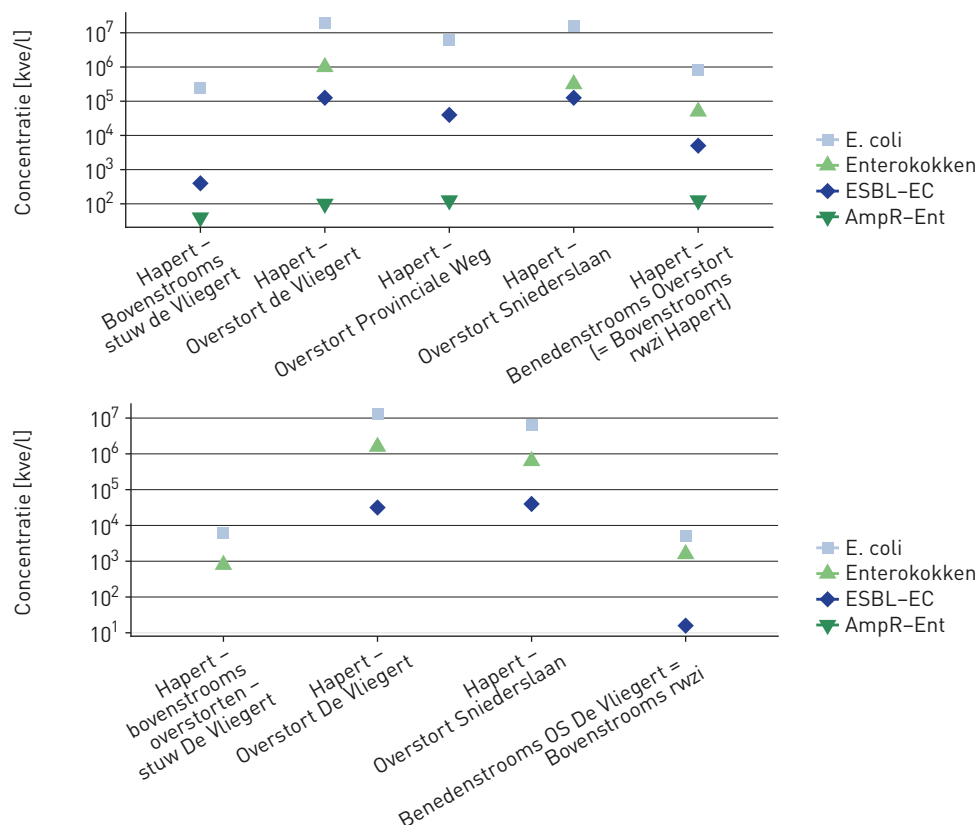
* Gemiddelde van drie steekmonsters.
NA = niet geanalyseerd.

Op 13 juni en 18 november 2016 zijn ook monsters genomen van de Groote Beerze bovenstrooms van de overstorten De Vliegert, Sniederslaan en Provinciale Weg bij stuw De Vliegert (overstort Dalem ligt bovenstrooms van deze stuw) en benedenstrooms van de overstorten bij het meetpunt bovenstrooms van de rwzi Hapert (zie figuur 3.14). Op 13 juni zijn de resistente bacteriën al aangetoond bovenstrooms van de afvalwaterbronnen. De concentraties zijn benedenstrooms van de overstort enigszins verhoogd. Op het moment van monsternamen stortte Provinciale Weg over, De Vliegert en Sniederslaan hadden op dat moment de externe drempel (nog) niet bereikt. Later op de dag heeft Dalem overgestort en Sniederslaan extern overgestort. De relatief hoge concentraties resistente bacteriën bovenstrooms van de overstorten zijn dus niet te verklaren door overstort Dalem.

De lichte verhoging benedenstrooms is mogelijk deels te verklaren door overstort Provinciale Weg. Dit wordt bevestigd door de bevinding dat twee van de vier verschillende ESBL-EC-varianten die benedenstrooms zijn aangetoond ook in overstortwater van Provinciale Weg zijn aangetroffen (zie tabel 3.6). Deze varianten zijn geen enkele keer in andere monsters uit het Groote Beerze-gebied gevonden. Aan de andere kant is niet uit te sluiten dat het effluent van de verder benedenstrooms gelegen rwzi op deze dag ook de benedenstroomse locatie heeft beïnvloed, omdat de monsterlocatie (dus benedenstrooms van overstorten en bovenstrooms van rwzi) relatief dicht bij het effluentlozingspunt ligt (zie figuur 3.8) en het effluentvolume op deze dag zeer groot was.

Op 18 november zijn de resistente bacteriën niet aangetoond bovenstrooms van de drie overstorten, ESBL-EC is wel benedenstrooms aangetoond.

Figuur 3.14 Bacterieconcentraties in Groote Beerze boven- en benedenstrooms overstorten op 13 juni 2016 (boven) en 18 november 2016 (onder)



n.a. = niet geanalyseerd, nd = niet gedetecteerd.

Tabel 3.6 ESBL-EC-varianten in Groote Beerze en overstortwater op 13 juni 2017

	ST127 / CTX-M-3	ST1598 / CTX-M-15	ST3144 / CTX-M-27	STST131_icd:1mm / SHV-12	ST162 / SHV-12	ST10 / CTX-M-14/CTX-M-17	ST131 / CTX-M-14/CTX-M-17	ST131 / CTX-M-15	ST162 / CTX-M-15
Hapert - Bovenstrooms stuw De Vliegert					4				
Overstort Provinciale Weg	2	2						1	
Hapert - Overstort De Vliegert	1					1	1	1	1
Hapert - benedenstrooms overstort (= Bovenstrooms rwzi Hapert)	1	2	1	1					

3.6 Discussie

Invloed landbouw en wilde dieren

AmpR-Ent is bovenstrooms van de rwzi nauwelijks aangetroffen, wat erop duidt dat landbouw (en wilde dieren) een verwaarloosbare bijdrage levert aan de aanwezigheid van deze bacterie in de Groote Beerze. ESBL-EC is wel regelmatig aangetroffen, alhoewel in relatief lage concentraties vergeleken met benedenstrooms van de rwzi. Dit duidt erop dat landbouw en/of wilde dieren bijdragen aan de aanwezigheid van deze bacterie in oppervlaktewater, zij het in geringere mate dan rwzi-effluent. Er is geen duidelijke invloed van neerslag waarneembaar.

Invloed rwzi-effluent en overstorten

Lozingen van rwzi-effluent lijken een belangrijke bron van ESBL-EC en AmpR-Ent in de Groote Beerze. Omdat twee van de vier overstorten in het gebied in een groene buffer overstorten, is het effect van overstortingen in de Groote Beerze beperkt. Maar overstort Provinciale Weg heeft gedurende de onderzoeksperiode negen keer overgestort en kan daarmee op jaarbasis ook een belangrijke bijdrage leveren.

De variatie aan ESBL-EC in effluent was zodanig groot dat het vergelijken van stammen in effluent en de rivier geen efficiënte methode bleek om de bijdrage van effluent aan de Groote Beerze vast te stellen. Als de variatie groot is, is bij de analyse van een beperkt aantal isolaten (in de huidige studie maximaal vijf per monster) statistisch de kans namelijk heel groot dat uit beide monsters andere varianten worden 'opgepikt', terwijl dezelfde varianten wel in beide monsters aanwezig zijn. Door de grote variatie moeten meer isolaten vergeleken worden om overeenkomsten te kunnen vaststellen.

3.7 Conclusie

Onder invloed van landbouw en wilde dieren zijn resistente bacteriën in oppervlaktewater waargenomen, vooral ESBL-EC. AmpR-Ent en meerdere resistentiegenen zijn minder vaak aanwezig.

Er is geen duidelijk patroon waar te nemen voor droge versus natte perioden of binnen en buiten het bemestingsseizoen. ESBL-EC is in droge en natte perioden aangetroffen, AmpR-Ent en het resistentiegen sul1 zijn vaker in natte perioden gedetecteerd.

De concentraties van resistente bacteriën en resistentiegenen liggen in rwzi-effluent hoger dan in het bovenstroomse oppervlaktewater. De vrachten benedenstrooms van het lozingspunt stemden nagenoeg volledig met de effluentlozing overeen. De vrachten ESBL-EC (de bacterie die het vaakst is gedetecteerd) toonden geen grote verschillen tussen natte en droge perioden.

De concentraties indicatorbacteriën en ESBL-EC gevonden in overstortwater in het gebied van de Groote Beerze liggen ongeveer tien keer hoger dan effluentconcentraties.

4 Groote Wetering

In de Brabantse rivier de Groote Wetering is de invloed van rwzi-effluent en landelijke achtergrond op de aanwezigheid van resistente bacteriën in het oppervlaktewater onderzocht.

4.1 Onderzoeksvragen

De onderzoeksvragen voor de Groote Wetering zijn:

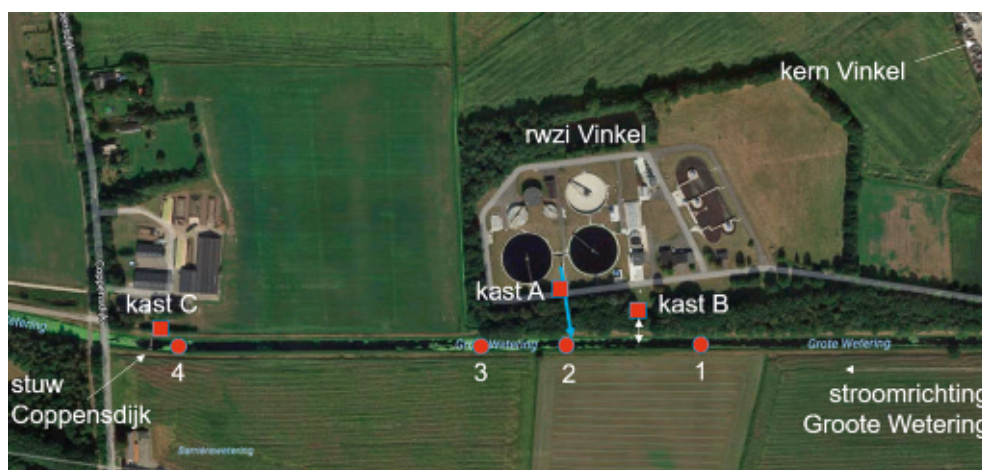
- 1) Hoeveel resistente bacteriën zitten in het effluent van rwzi Vinkel en boven- en benedenstrooms van het effluentlozingspunt:
 - a wat betreft concentraties en vrachten;
 - b bij nat en droog weer?
- 2) Wat is de bijdrage van effluent aan de totale vracht in oppervlaktewater?
- 3) Hoeveel resistente bacteriën zitten in oppervlaktewater bovenstrooms van de rwzi (landelijke achtergrond)?

4.2 Topografie en gebiedsinformatie

De Groote Wetering is een riviertje in Noord-Brabant dat ontspringt in de buurt van Nistelrode, in westelijke richting afstroomt en na ongeveer 15 km bij 's-Hertogenbosch in de Aa uitmondt. Ongeveer halverwege passeert de Groote Wetering het dorpje Vinkel en benedenstrooms van het dorp de rwzi Vinkel (zie figuur 4.1). Het gebied tussen Nistelrode en Vinkel bestaat voor een groot deel uit landbouwgrond. Er is geen specifieke informatie bekend over de aard van landbouw en het tijdstip van bemesting. De dorpen in het bovenstroomse gebied (onder andere Vinkel, Loosbroek en Nistelrode) zijn merendeels gemengd gerioleerd met in totaal zeven gemengde overstorten die kunnen lozen in de Groote Wetering. Van deze overstorten is niet bekend hoe vaak ze lozen. De rwzi Vinkel heeft een capaciteit van circa 60.000 inwonerequivalent (IE) en loost het effluent in de Groote Wetering. Circa 500 m benedenstrooms van het rwzi-lozingspunt bevindt zich een stuw (204C) in de rivier bij de Coppensdijk (zie figuur 4.1).

In het gebied is met bestaande metingen het hydraulisch functioneren van de rivier en de rwzi in beeld gebracht. Daarnaast is een bestaande monsternamekast (effluent rwzi) gebruikt en zijn twee nieuwe kasten (boven- en benedenstrooms in de Groote Wetering) geïnstalleerd om monsters te kunnen nemen.

Figuur 4.1 Topografisch overzicht rondom rwzi Vinkel met lozingslocatie in Groote Wetering en benedenstroomse stuw



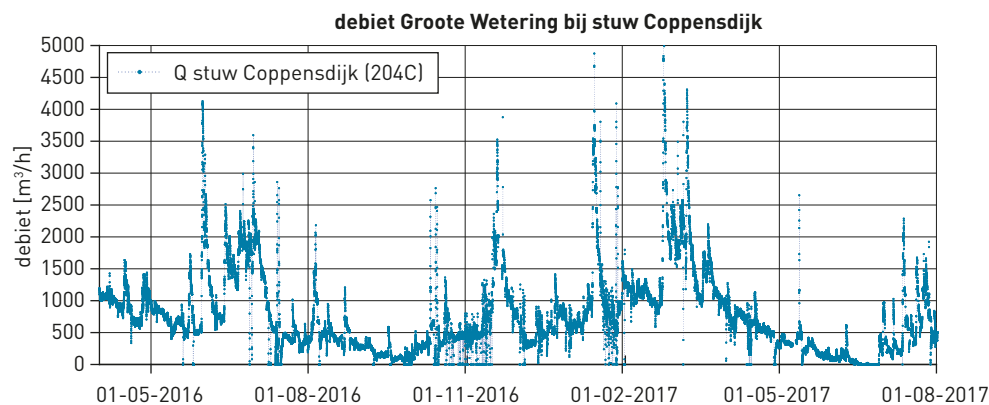
De nummers 1 tot en met 4 geven aan waar steekmonsters zijn genomen (zie paragraaf 4.4).

4.3 Hydraulisch functioneren

Debiet Groote Wetering

Het hydraulisch functioneren van de Groote Wetering is in beeld gebracht met niveau-metingen in de rivier bij stuw Coppensdijk (204C). Het debiet over de stuw is berekend aan de hand van het bovenstroomse waterniveau (bij de stuw) en een bekende Q/h-relatie. Vrije afstromingscondities zijn geverifieerd aan de hand van het benedenstroomse waterniveau. De metingen laten zien dat de afvoer over de stuw varieert over het jaar met lage debieten in de zomer (0 - 500 m³/h) en hoge debieten in de winter (1.000 - 4.000 m³/h) (zie figuur 4.2). In beide seizoenen zijn pieken in de afvoer te zien die samenhangen met natte perioden. In september 2016 en juli 2017 is gedurende enkele dagen geen afvoer gemeten.

Het debiet over stuw Coppensdijk is als representatief beschouwd voor het debiet in de Groote Wetering bij het lozingspunt van de rwzi Vinkel. Tussen het lozingspunt en de stuw zijn geen grote zijinstromen bekend.



Figuur 4.2 Debiet Groote Wetering, periode april 2016 - augustus 2017

Debiet rwzi-effluent

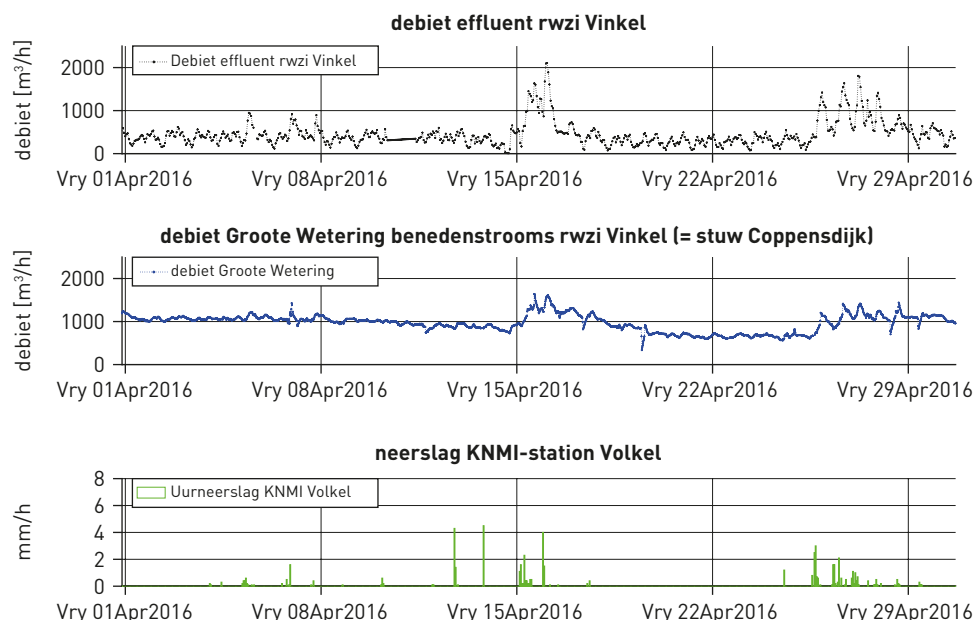
Het hydraulisch functioneren van de rwzi Vinkel (effluentlozing in de Groote Wetering) is in beeld gebracht met de debietmeting in de effluentgoot. Figuur 4.3 (bovenste plot) toont het effluentdebiet in april 2016. Zoals verwacht voert de rwzi tijdens droge dagen rond de 300 m³/h af met een duidelijk dag-nachtpatroon. Bij neerslag neemt de afvoer van de zuivering toe, met een maximum van 2.500 m³/h. Vergelijking met het debiet in de Groote Wetering juist benedenstrooms van de rwzi (dus inclusief rwzi-effluent, zie middelste plot in figuur 4.3) toont dat het rwzi-effluent in de bestudeerde periode een significant deel uitmaakt van de rivierafvoer: bij droog weer circa een derde tot de helft en bij regen een nóg groter deel. Ook wordt duidelijk dat het ontvangende pand van de Groote Wetering als buffer dient bij piekafvoeren uit de rwzi; de piekafvoer in de rivier ligt beduidend lager dan die van de rwzi. Dit effect is buiten beschouwing gebleven bij het berekenen van het afvoervolume van de Groote Wetering bovenstrooms van de rwzi tijdens monsternamen (volgens de formule: bovenstrooms = benedenstrooms - rwzi-effluent). Hierdoor ontstaat een (onbekende) fout in het berekende volume.

Figuur 4.4 laat zien dat er mogelijk ook een fout zit in de debietbepaling bij de stuw Coppensdijk. De figuur toont de afvoer van de rwzi en van de Groote Wetering in een droge periode in de 2e helft van september 2016. De rwzi-afvoer bedraagt gemiddeld ongeveer 250 m³/h, terwijl de afvoer over de stuw maar rond de 100 m³/h ligt. Tenzij de Groote Wetering een andere (onbekende) afvoerroute kent dan via de stuw, betekent dit dat de gebruikte niveaumeting en Q/h-relatie de debieten bij de stuw in elk geval bij lage afvoeren onderschatten.

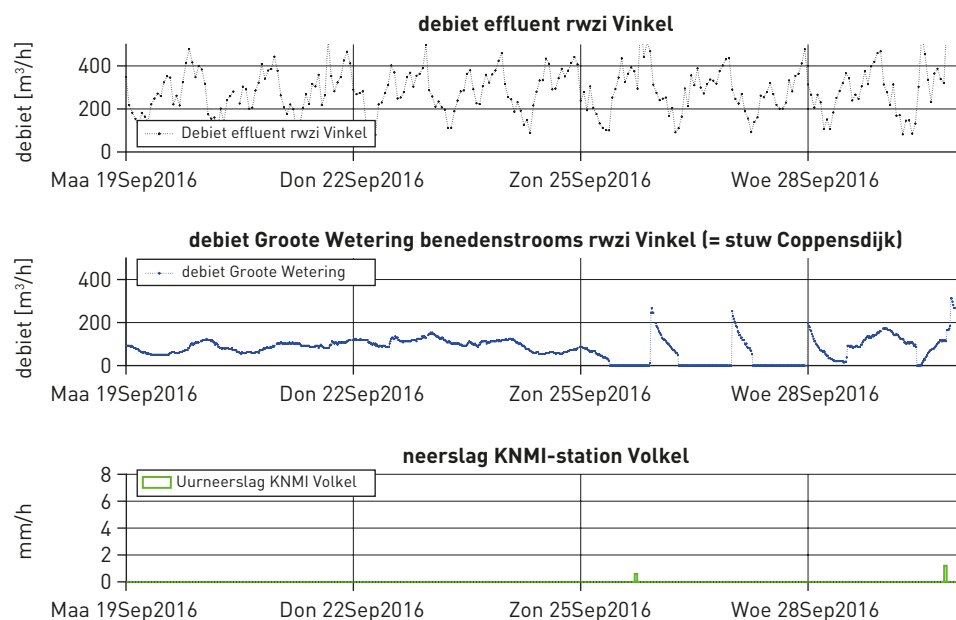
Neerslag

De hoeveelheid gevallen neerslag is in beeld gebracht met de neerslaggegevens van KNMI-station Volkel.

Figuur 4.3 Debiet effluent rwzi Vinkel (boven) en debiet Groote Wetering benedenstrooms rwzi, april 2016



Figuur 4.4 Debiet effluent rwzi Vinkel (boven) en debiet Groote Wetering benedenstrooms rwzi, periode 19 - 30 september 2016



4.4 Monsternamelocaties & -strategieën

Om het effect van rwzi-effluent op de Groote Wetering te meten, is op twee manieren bemonsterd: met steekmonsters op zeven locaties langs de rivier en met automatische monsternamekasten direct boven- en benedenstrooms van het lozingspunt.

Steekmonsters

De steekmonsters zijn vóór de installatie van de monsternamekasten handmatig in twee series verzameld. De eerste monstername was op 26 juli 2016. Naast rwzi-effluent (uit de effluentgoot) zijn monsters genomen op vier locaties in de Grote Wetering (zie figuur 4.1 en figuur 4.5):

- 1 bovenstrooms van de rwzi (locatie 1);
- 2 bij het rwzi-lozingspunt (locatie 2);
- 3 100 m benedenstrooms (locatie 3);
- 4 500 m benedenstrooms (locatie 4, vlak bij de stuw Coppensdijk).

Voor de tweede serie op 15 augustus 2016 is op dezelfde vier locaties in de Groote Wetering bemonsterd als in de eerste serie (en uit de effluentgoot). Daarnaast zijn drie aanvullende monsters genomen (zie ook figuur 4.5):

- 5 1.150 m benedenstrooms van de rwzi, juist vóór de instroom van een kleine waterloop die het gebied ten noorden van de kern Vinkel afwatert;
- 6 1.150 m benedenstrooms van de rwzi, direct na de instroom;
- 7 3.450 m benedenstrooms van de rwzi, bij de brug Veedijk/Werstkant.



Figuur 4.5 Locaties handmatige monsternamen uit Groote Wetering op 15 augustus 2016

Monsternamekasten

Voor de automatische bemonstering is de bestaande monsternamekast bij de effluentgoot (kast A in figuur 4.1) gebruikt. Waterschap Aa en Maas gebruikt deze kast voor de reguliere bemonstering van het rwzi-effluent. Daarnaast zijn twee nieuwe monsternamekasten geïnstalleerd:

- langs de Groote Wetering bovenstrooms van het rwzi-lozingspunt (kast B in figuur 4.1). In verband met veiligheid staat de kast binnen de hekken op het rwzi-terrein met een verlengde monsternameslang naar de Groote Wetering (zie figuur 4.6 rechts);
- langs de Groote Wetering benedenstrooms van het rwzi-lozingspunt (kast C). In verband met stroomvoorziening en datacommunicatie staat deze kast bij de stuw Coppensdijk (zie figuur 4.6, links).



Figuur 4.6 Twee monsternamekasten rondom lozingspunt rwzi Vinkel in Groote Wetering: benedenstrooms bij stuw Coppensdijk (links) en bovenstrooms op rwzi-terrein (rechts)

Alle drie de kasten hebben 24-uursmonsters genomen. De kast bij de effluentgoot is debietproportioneel aangestuurd op basis van de debietmeting in de effluentgoot. De kasten die bemonsterden uit de Groote Wetering, zijn tijdproportioneel geprogrammeerd. De kasten werkten simultaan (dus bemonsterden exact dezelfde periode van 24 uur) om het effect van de lozing op de bacterieconcentraties in de rivier inzichtelijk te kunnen maken. Na elke monsternamenname en vóór de analyse is het functioneren van de kasten gecontroleerd door het 'theoretische' monsternamevolume (op basis van de debietmetingen/tijdsduur) te vergelijken met de daadwerkelijke volumes in de flessen.

Van september 2016 tot maart 2017 hebben de kasten zeven keer bemonsterd (zie tabel 4.1). De planning is afgestemd op de reguliere maandelijkse monsternamen van het rwzi-effluent. Omdat deze reguliere effluentbemonstering willekeurig is ingepland (dus geen rekening

houdend met de weersomstandigheden), zijn de monsters uit de Groote Wetering ook willekeurig genomen. Achteraf beschouwd zijn vier van de zeven monsters in droge perioden genomen en drie tijdens beperkte neerslag (3 - 6 mm tijdens monsternamen en ook weinig neerslag in de periode ervoor). Drie monsternamen zijn mislukt:

- op 27 september 2016 was er geen stroming in de Groote Wetering. Hierdoor was geen sprake van een 'bovenstroomse' en 'benedenstroomse' situatie in de Groote Wetering, waardoor het effect van de lozing van rwzi-effluent niet meer was in te schatten;
- tijdens de monsternamen in november 2016 heeft de bovenstroomse monsternamenamekast niet goed gefunctioneerd;
- ook tijdens de monsternamen in december 2016 heeft de bovenstroomse monsternamenamekast niet goed gefunctioneerd.

Tabel 4.1 Monsternamedata effectmeting in Groote Wetering rondom lozing rwzi Vinkel (monsternamen tussen 9:00 uur voorafgaande dag en 9:00 uur genoemde dag)

Data monsternamen	Droog/neerslag	Opmerkingen
27 september 2016	droog	geen stroming Groote Wetering
18 oktober 2016	droog	
15 november 2016	neerslag (6 mm tijdens monsternamen)	kast bovenstrooms niet-functioneel
13 december 2016	droog	kast bovenstrooms niet-functioneel
31 januari 2017	droog	
21 februari 2017	neerslag (5 mm tijdens monsternamen)	
21 maart 2017	neerslag (3 mm tijdens monsternamen)	

4.5 Meetresultaten: concentraties en vrachten

Voor E. coli, enterokokken en ESBL-EC is een complete dataset (dus meetresultaten van effluent en van de Groote Wetering boven- en benedenstrooms van de rwzi) beschikbaar voor de vier geslaagde 24-uursmonsters. Voor AmpR-Ent zijn voor alle drie de locaties voor slechts twee van de geslaagde 24-uursmonsters meetresultaten verkregen. Daarnaast zijn voor alle bacteriesoorten meetresultaten beschikbaar via steekmonsters op twee aanvullende data.

4.5.1 Landelijk gebied

Met de resultaten van de twee handmatige monsters meegerekend is bovenstrooms van rwzi Vinkel geen AmpR-Ent (0%) aangetroffen, maar wel 33% ESBL-EC (in twee van de zes monsters). Zonder de handmatige monsters mee te tellen, zijn de concentraties ESBL-EC gemiddeld 30 kve/l (zie tabel 4.2).

Uit de monsters zijn zestig gewone E. coli's getest op resistentie tegen andere antibiotica. Hiervan is 17% resistent tegen tetracycline, 27% tegen streptomycine, 3,3% tegen nalidixinezuur en 5,0% tegen gentamycine. Ter vergelijking: 3,3% van de E.coli's is resistent tegen cefotaxime (een antibioticum waartegen ESBL-EC resistent is). Van alle E. coli's is 35% resistent tegen minstens een van de antibiotica.

Tabel 4.2 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in oppervlaktewater in landelijk gebied

Bacterie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan [kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaardafwijking [log kve/l]
E. coli	4	4	100	2,9x10 ³	3,8	0,7
Entero-kokken	4	4	100	1,7x10 ³	3,0	0,7
ESBL-EC	4	2	50	3,0x10 ¹	1,5	1,7
AmpR-Ent	3	0	0	NA	NA	NA

NA = niet geanalyseerd.

4.5.2 Rwzi-effluent

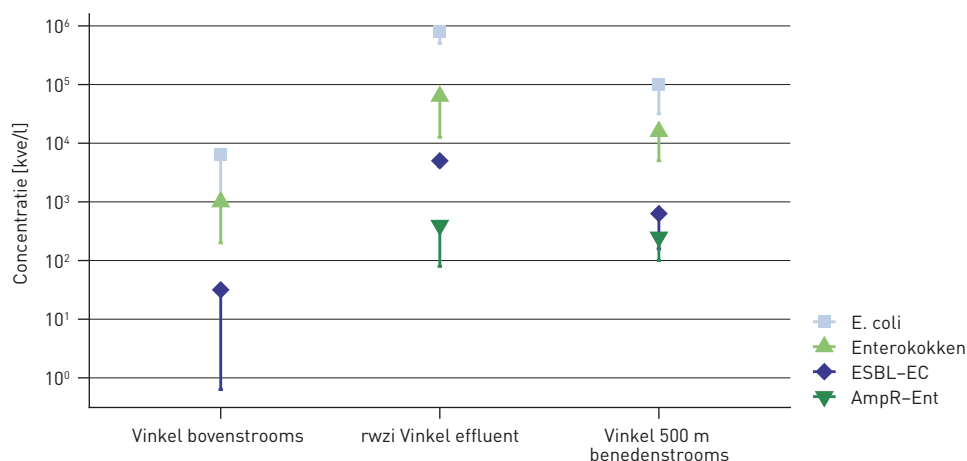
Op de dagen dat de monsternamenamekasten de monsters hebben genomen, zijn de concentraties antibioticaresistente bacteriën in het rwzi-effluent 4,4x10³ kve/l ESBL-EC en 3,5x10² kve/l AmpR-Ent (mediaan). Voor alle typen bacteriën zijn de concentraties in de rivier benedenstrooms van de rwzi hoger dan bovenstrooms (zie figuur 4.7). Benedenstrooms zijn deze bacteriën aangetroffen in respectievelijk 100% van de monsters (drie van de drie) en

100% (zes van de zes). Gebruikmakend van de geschatte debieten blijken de vrachten ESBL-EC en AmpR-Ent benedenstrooms van de rwzi op drie van de vier tijdpunten (automatische bemonsteringen) goed overeen te komen met de concentraties in het effluent. Op deze tijd-
punten zijn de vrachten in de rivier ongeveer de helft van die in het effluent (overeenkomend met de mogelijke onderschatting van de afvoer gemeten bij stuw Coppensdijk) (zie figuur 4.8). Daarentegen zijn de vrachten bovenstrooms 3 tot 4 logunits lager dan in het effluent. Het is niet helder wat op de vierde meetdag is gebeurd (er zijn hogere concentraties ESBL-EC bovenstrooms gemeten dan benedenstrooms). Wellicht was er op deze dag weinig stroming.

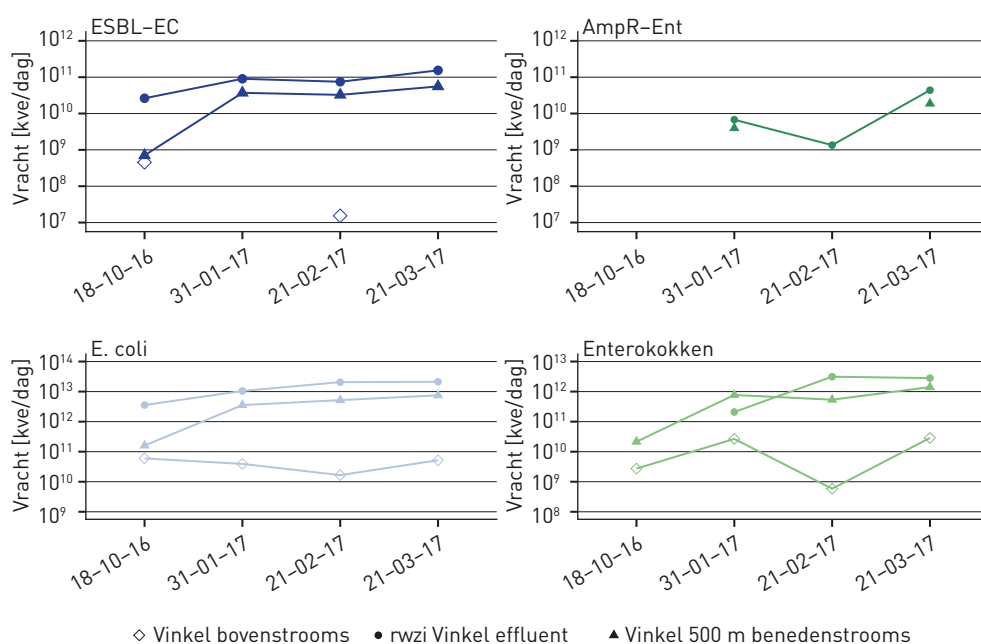
Gezamenlijk wijzen deze data erop dat het rwzi-effluent de belangrijkste bron is van de onderzochte resistente bacteriën in de rivier de Groote Wetering.

Het effect van effluentlozingen op de ESBL-EC- en AmpR-Ent-concentraties in de rivier is nog waarneembaar op 3,5 km afstand van de rwzi (zie figuur 4.9).

Er is geen verschil in de prevalentie van tetracyclineresistentie tussen het bovenstroomse monster en de andere monsters (bovenstrooms: 17%, effluent: 17%, benedenstrooms: 13%). Ook voor de andere antibiotica en voor het totale percentage *E. coli* met minstens één resistentie is geen duidelijk verschil tussen de monsterlocaties gevonden.



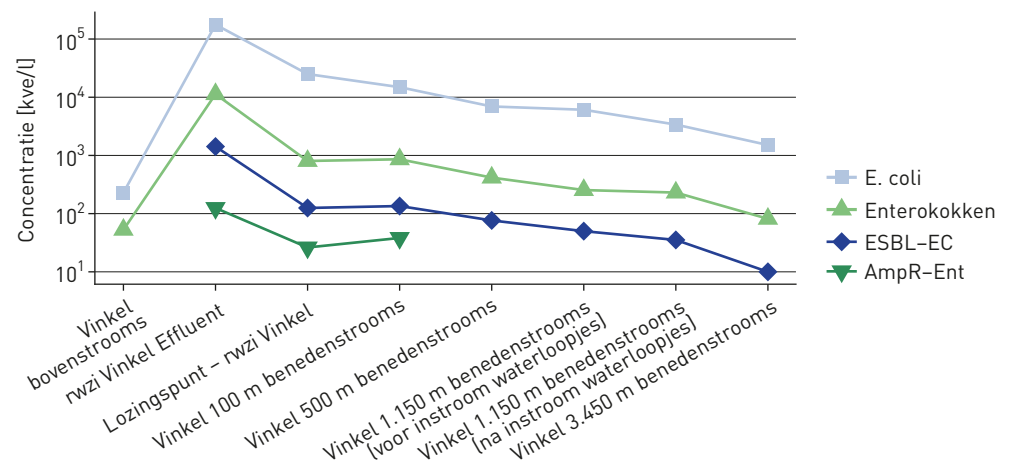
Figuur 4.7 Gemiddelde bacterieconcentraties in Groote Wetering boven- en benedenstrooms rwzi en in rwzi-effluent



Figuur 4.8 Vrachten in rwzi-effluent en Groote Wetering boven- en benedenstrooms rwzi

Op 18 oktober 2016 is geen AmpR-Ent gemeten en op 21 februari 2017 zijn de AmpR-Ent-concentraties hoger dan de kwantificatielimit.

Figuur 4.9 Bacterieconcentraties in steekmonsters van 15 augustus 2016



AmpR-Ent is in enkele monsters niet aangetoond.

4.6 Discussie

De monsternamekasten hebben slechts een beperkte dataset opgeleverd. Daarnaast zijn de debietschattingen mogelijk niet altijd even nauwkeurig. Op drie van de vier monsterdagen is de vracht ESBL-EC en AmpR-Ent in de rivier benedenstrooms van de rwzi ongeveer de helft van de vracht in het effluent (de benedenstroomse vracht is mogelijk onderschat). Het effect van effluent is op een aanzienlijke afstand van de rwzi nog meetbaar. De resistente bacteriën zijn bovenstrooms niet (AmpR-Ent) of slechts in een klein deel van de monsters aangetoond, wat duidt op een geringe invloed van landbouw en wilde dieren. De dataset is niet toereikend om een neerslageffect te bepalen. Ook is niet bekend in hoeverre overstortingen de metingen hebben beïnvloed.

4.7 Conclusie

Effluentlozingen dragen in belangrijke mate bij aan de aanwezigheid van ESBL-EC en AmpR-Ent in de rivier de Groote Wetering. Het effect van neerslag en overstortingen is in deze dataset niet te bepalen. E. coli's die resistent zijn tegen enkele antibiotica (zoals tetracycline), zijn zowel bovenstrooms als in het rwzi-effluent gevonden.

5 Piet Oberman

In akkerbouwgebied Piet Oberman is de invloed van landbouw (bemesting) op de aanwezigheid van resistente bacteriën in het oppervlaktewater onderzocht.

5.1 Onderzoeksvraag

De onderzoeksvraag voor Piet Oberman is: hoeveel resistente bacteriën zitten in het landbouwgebied van de Han Stijkeltocht:

- wat betreft concentraties en vrachten;
- bij nat en droog weer?

5.2 Topografie en gebiedsinformatie

Piet Oberman is een akkerbouwgebied in de Noordoostpolder nabij Tollebeek (zie figuur 5.1). Het gebied is hydrologisch geïsoleerd van de rest van de polder en voert overtollig water af via het eigen gemaal Piet Oberman naar de Urkervaart. Bij droogte kan dit gemaal ook water in het gebied laten stromen.

In het gebied zijn twaalf akkerbouwers actief waarvan één gecombineerd met melkvee. Het gebied beslaat in totaal ruim 600 ha akkerbouwgrond. Elf van de akkerbouwers werkten mee aan dit onderzoek door informatie te verstrekken over het tijdstip van bemesting en het type mest. Daarnaast is er in het gebied een pluimveehouderij, dit bedrijf heeft niet meegedaan aan het onderzoek.



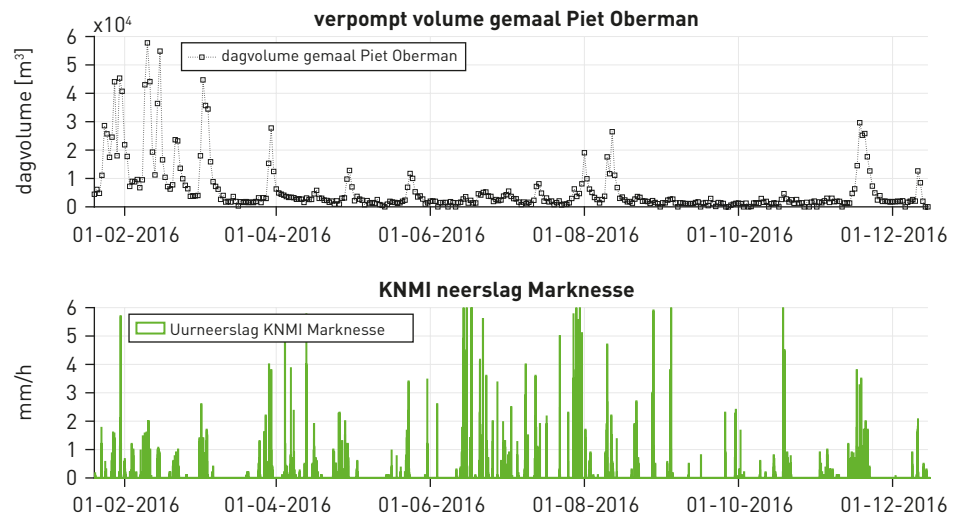
Figuur 5.1 Topografisch overzicht gebied Piet Oberman

5.3 Hydraulisch functioneren

Het hydraulisch functioneren van het gemaal Piet Oberman is in beeld gebracht met meetgegevens van het gemaal. In figuur 5.2 ziet u de verpompte volumes per dag, geplot voor de het seizoen en van neerslag. Op droge dagen is het wateraanbod beperkt en varieert de afvoer tussen de 0 en 500 m³/h. Vooral in de zomer en herfst zijn dagen voorgekomen zonder enige afvoer via het gemaal. De reactie van het gemaal op neerslag varieert sterk met het seizoen. In de zomer stijgt de afvoer met zware neerslag tot maximaal 1.000 - 2.000 m³/d, terwijl in de winter afvoeren tot 60.000 m³/d zijn gemeten. In de monsternameperiode heeft het gemaal geen water ingelaten vanuit de Urkervaart, dus dat heeft de monstername niet kunnen beïnvloeden.

De hoeveelheid gevallen neerslag is in beeld gebracht met de neerslagmeting van KNMI-station Marknesse, op ongeveer 14 km van het gemaal.

Figuur 5.2 Verpompt volume
gemaal Piet Oberman (boven)
en neerslag KNMI-station
Marknesse (onder), periode
januari - december 2016



5.4 Monsternamelocatie & -strategie

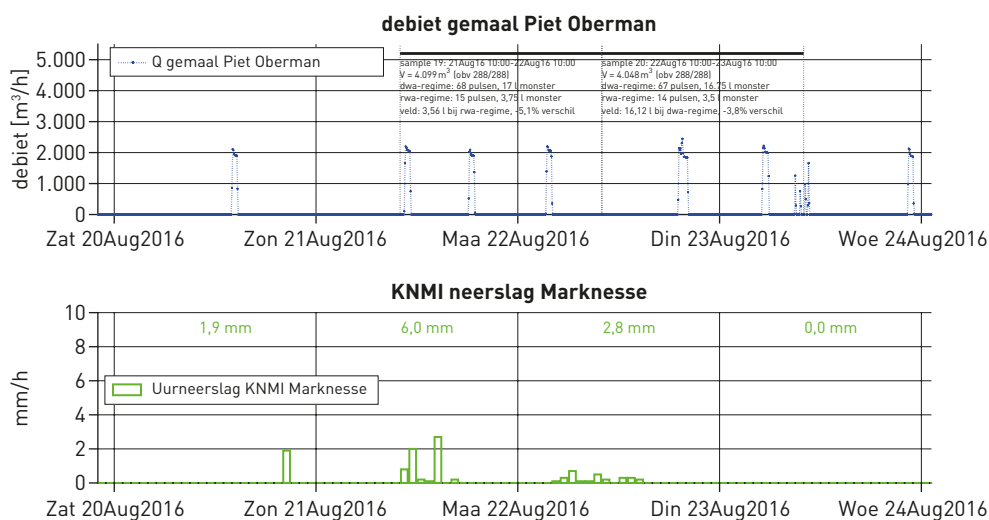
Om het oppervlaktewater uit het agrarische gebied te bemonsteren, is bij gemaal Piet Oberman een automatische monsternamekast geïnstalleerd (zie figuur 5.3). De kast heeft van januari tot december 2016 debietproportionele 24-uursmonsters verzameld op basis van de debietmeting van het gemaal. Na elke monstername en vóór de analyse is het functioneren van de kast gecontroleerd door het 'theoretische' monsternamevolume (op basis van de debietmeting) te vergelijken met het daadwerkelijke volume in de flessen.

Figuur 5.3 Automatische
monsternamekast bij
gemaal Piet Oberman



In figuur 5.4 ziet u een voorbeeld voor twee monsternamedagen in augustus 2016. Bij het eerste monster (21 augustus 10:00 uur - 22 augustus 10:00 uur) zou 3,75 l monster moeten zijn verzameld op basis van het gepasseerde volume die dag (4.099 m^3). In het veld is 3,56 l geconstateerd, een kleine afwijking van ongeveer 5%. In de volgende 24 uur heeft de monsternamekast 16,12 l monster verzameld bij een theoretisch volume van 16,75 l, dus circa 4% afwijking. Bij te grote afwijkingen (> 10 %, bijvoorbeeld doordat de kast verstopt raakt) zijn de monsters niet geanalyseerd.

Het grote verschil in monsternamevolumes op beide dagen heeft te maken met twee verschillend geprogrammeerde monsternameregimes. Dit onderscheid is gemaakt om bij droge dagen met weinig afvoer in korte tijd (zoals in figuur 5.4) toch afdoende monstervolume te kunnen verzamelen (> 3 l) en op dagen met veel afvoer 24 uur te kunnen bemonsteren zonder dat het maximumvolume in de kast wordt overschreden ($4 \times 18 \text{ l}$). Hiervoor zijn respectievelijk een dwa-regime (250 ml monster voor elke 60 m^3 afvoer) en een hwa-regime (250 ml monster voor elke 270 m^3) in het leven geroepen. Vóór elke monstername is ingeschat welk regime het meest geschikt zou zijn.



Figuur 5.4 Controle functioneren monsternamekast Piet Oberman

Bemonstering

Vooraf werd verondersteld dat dierlijke mest die afspoelt van de landbouwgrond de waarschijnlijke bron is van de onderzochte bacteriën in het water dat het gemaal afvoert. Om dit te onderzoeken, is de monstername zodanig gepland dat zowel monsters buiten het mest-uitrijdseizoen (einde herfst, winter) als erbinnen (lente - zomer, begin herfst) zijn genomen. Ook is geprobeerd om in beide seizoenen in droge perioden (geen afspoeling verwacht) en natte perioden (wel afspoeling) te bemonsteren. Omdat het proces van neerslag, afspoeling en transport door het watersysteem enige tijd kan duren en om de dynamiek hierin te kunnen bestuderen, is in natte perioden twee tot drie dagen achter elkaar bemonsterd (dus meerdere opeenvolgende 24-uursmonsters verzameld). In tabel 5.1 ziet u een overzicht van alle 25 monsternamedagen.

Tabel 5.1 Monsternamedata Piet Oberman

Data monstername (2016)	Droog/nat	Mest uitgereden*
1 februari	droog	19 januari: paardenmest (1)
8-9-10 februari	nat	
15-16-17 februari**	nat	
29 februari	droog	
29 maart	droog	14 maart: rundveemest (2)
4 april	droog	
11 april	droog	10 april: varkensmest (1)
18 april	droog	
25-26 april	nat	19 en 20 april: rundveemest (2)
2 mei	droog	
23-24-25 mei	nat	5, 6 en 12 mei: rundvee (2) en varkensmest (1)
22-23 augustus	nat	9, 16, 17 en 18 augustus: varkensmest (2), rundveemest (1), pluimveemest (1)
29 augustus	droog	
5-6-7 september	nat	
22 november	droog	

* Door boeren die hebben meegewerkt aan het onderzoek; tussen haakjes staat het aantal boeren dat mest heeft uitgereden.

** AmpR-Ent niet bepaald.

5.5 Meetresultaten: concentraties en vrachten

In totaal zijn bij gemaal Piet Oberman 25 monsters genomen, waarvan negen bij droog weer en zestien bij neerslag (verdeeld over zes perioden met regen). In alle monsters zijn *E. coli* en enterokokken aangetoond (zie figuur 5.5). AmpR-Ent is in 22 van de monsters bepaald, in de monsters van een van de buien is de AmpR-Ent niet bepaald. AmpR-Ent is aangetroffen in drie van de 22 monsters (14%), binnen een tijdsbestek van vijftien dagen (22 augustus, 29 augustus en 5 september). Twee van deze dagen vielen in een natte periode. ESBL-EC is in acht van de 25 monsters (32%) aangetroffen, op zes monsternamedata tussen 8 en 17 februari, op 29 maart en op 22 november. De dagen in februari waren natte perioden, de overige twee data was het droog. Er was geen duidelijke associatie met het uitrijden van mest.

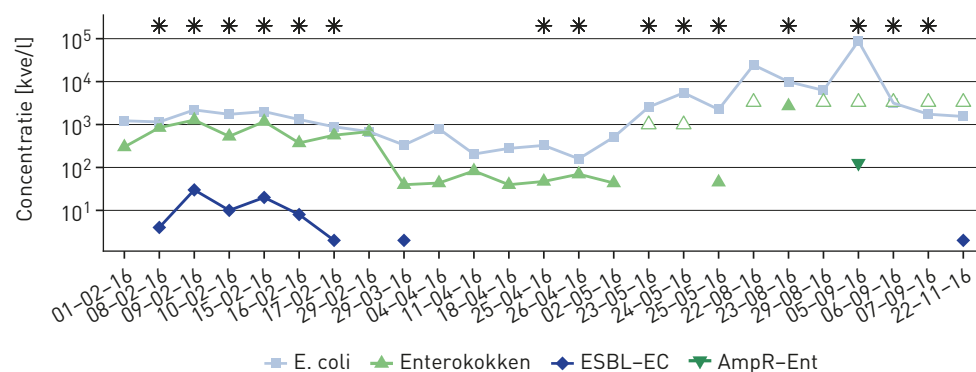
De ESBL-EC-varianten die op de zes monsterdagen in februari zijn aangetroffen (gedurende een tijdsbestek van tien dagen), bestaan voor 91% uit dezelfde stam (ST2690/CTX-M-1). Deze variant is op alle zes de dagen aangetroffen. Dit maakt het waarschijnlijk dat deze isolaten uit een enkele bron komen. Daarnaast zijn op een van de februaridagen nog twee andere varianten gevonden. Ook op de dagen in mei en november zijn andere ESBL-EC-varianten in het water aanwezig.

De gemiddelde ESBL-EC- en AmpR-Ent-concentraties in de positieve monsters zijn respectievelijk 5,7 en 130 kve/l (zie tabel 5.2). De vrachten zijn op deze dagen gemiddeld $1,1 \times 10^8$ ($6,3 \times 10^6$ – $1,3 \times 10^9$) kve/l voor ESBL-EC en $2,8 \times 10^8$ kve/l voor AmpR-Ent.

Tabel 5.2 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in oppervlaktewater in landelijk gebied

Bacterie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan [kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaard-afwijking [log kve/l]
<i>E. coli</i>	25	25	100	$1,5 \times 10^3$	3,2	0,6
Enterokokken	25	25	100	$3,0 \times 10^2$	2,3	0,6
ESBL-EC	25	8	32	$5,7 \times 10^0$	0,8	0,5
AmpR-Ent	25	1	5	$1,3 \times 10^2$	1,2	0,9

Figuur 5.5 Bacterieconcentraties bij gemaal Piet Oberman



De open symbolen geven de ondergrens van de bacterieconcentratie weer: de werkelijke concentraties waren in deze gevallen hoger dan met de gebruikte methode vastgesteld kon worden. De sterretjes geven dagen met neerslag aan.

In totaal zijn zes mestmonsters geanalyseerd op de aanwezigheid van ESBL-EC en AmpR-Ent. AmpR-Ent is in deze monsters niet aangetoond. In een van de (rundvee)mestmonsters is ESBL-EC gedetecteerd, dit was in een monster van 16 augustus. De eerstvolgende watermonsternames waren zes en zeven dagen later, op 22 en 23 augustus. Op die data is geen ESBL-EC in het water aangetroffen. De ESBL-EC-variant die in de mest is gevonden, is op geen enkel tijdstip in het water aangetroffen (ST457/CTX-M-55).

Overige resistenties

Uit 24 van de watermonsters zijn 241 'gewone' *E. coli*'s geïsoleerd en getest op resistentie tegen andere antibiotica. In totaal is 7,5% van alle *E. coli*'s resistent tegen tetracycline, 9,1% tegen streptomycine, 2,5% tegen naldixinezuur en 1,2% tegen gentamycine. Ter vergelijking, 1,2% van alle *E. coli*'s is resistent tegen cefotaxime (een antibioticum waartegen ESBL-EC resistent is). Van alle *E. coli*'s is 12% resistent tegen minstens een van de vijf geteste antibiotica. In zestien van de 24 monsters (67%) is minstens één *E. coli* aangetroffen die resistent is tegen een van de geteste antibiotica.

Antibioticaresistentie is ook voor veertig isolaten uit vier mestmonsters onderzocht. Vergelijkbaar met water zijn resistentie tegen tetracycline (5,0%) en streptomycine (10%) de meest voorkomende bij E. coli uit mest. Daarnaast is 7,5% resistent tegen cefotaxime (de discrepantie met de bevinding dat ESBL-EC bijna niet is gevonden, is te verklaren door het feit dat naast ESBL andere mechanismen resistentie tegen cefotaxime kunnen geven). Van de mestisolaten is 20% resistent tegen minstens een van de vijf geteste antibiotica. In drie van de vier (75%) mestmonsters zijn antibioticaresistente bacteriën aangetroffen.

In de watermonsters zijn ook resistentiegenen onderzocht, maar deze zijn alleen sporadisch aangetroffen. Eén monster is positief voor ermB, drie zijn positief voor sul1 en vier voor sul2. Op één na zijn deze monsters allemaal in natte perioden genomen. Het resistentiegen tetW is niet gedetecteerd.

5.6 Discussie

ESBL-EC en AmpR-Ent zijn minder vaak aangetroffen en in lagere concentraties dan in water onder invloed van rwzi-effluent.

Op de gemeten concentraties is geen duidelijke invloed van neerslag waar te nemen. Ook is geen duidelijke invloed van mestuitrijden gemeten. In februari is gedurende tien dagen sprake geweest van een fecale bron met een dominante ESBL-EC-variant. Mogelijk is de bron de paardenmest die twintig dagen eerder was uitgereden (op 19 januari), hoewel twintig dagen wel een (te?) lange periode is om het effect nog te kunnen meten. In augustus is het effect van uitrijden van ESBL-positieve mest zes dagen later in het water niet aantoonbaar geweest. Andere mogelijke bronnen zijn het pluimveebedrijf in het gebied of systemen voor individuele behandeling van afvalwater (IBA's). Gebaseerd op het varianttype is de kans groot dat het om een dierlijke bron gaat, maar dit is niet met 100% zekerheid te concluderen.

Piet Oberman leek op voorhand een ideaal gebied om de invloed van bemesting op de aanwezigheid van resistente bacteriën in water te onderzoeken (met bemesting als dominante fecale invloed en dankzij de bereidwilligheid van de meeste boeren om informatie te verstrekken). Maar in de praktijk blijkt het lastig het effect van bemesting te meten.

De belangrijkste beperkingen zijn:

- a) de onderzochte bacteriën moeten wel in de mest zitten;
- b) de weersomstandigheden: het moet binnen een niet al te lange tijd na bemesting gaan regenen, omdat anders de bacteriën mogelijk in de bodem afsterven voordat ze afspoelen;
- c) omdat de boeren vaak gespreid bemesten, wordt in een relatief klein deel van het gebied tegelijkertijd mest uitgereden.

5.7 Conclusie

ESBL-EC en AmpR-Ent zijn slechts onregelmatig gevonden. Op de dagen dat de bacteriën detecteerbaar zijn, variëren de vrachten tussen de 10^7 en 10^9 kve per dag. De aanwezigheid van deze bacteriën correleert niet duidelijk met het uitrijden van mest of met neerslag.

Enkele keren zijn resistentiegenen gevonden, vooral op dagen met neerslag.

6 Almere, Amersfoort en Soest: gescheiden riolering (foutaansluitingen)

In Almere, Amersfoort en Soest is de invloed van gescheiden riolering op de aanwezigheid van resistente bacteriën in het oppervlaktewater onderzocht.

6.1 Onderzoeksvragen

De onderzoeksvragen voor de invloed van gescheiden riolering zijn:

- 1) Zijn ESBL-EC en AmpR-Ent aan te tonen in stedelijk oppervlaktewater onder invloed van hemelwater uit (verbeterd) gescheiden riolering?
- 2) Zijn ESBL-EC en AmpR-Ent aan te tonen op locaties met vermoedelijke foutaansluitingen (zijn foutieve aansluitingen op de hemelwaterriolering een mogelijke bron van deze bacteriën in stedelijk oppervlaktewater)?

6.2 Topografie en gebiedsinformatie

Het onderzoek naar de invloed van gescheiden riolering vond plaats in vijf verschillende gebieden in Nederland: Almere Stad, Amersfoort Nieuwland, Amersfoort Kattenbroek, Amersfoort Vathorst en Soest Overhees (zie figuur 6.1, links). Deze locaties zijn geselecteerd omdat de watersystemen hier niet of nauwelijks onder invloed staan van 'bekende' bronnen van antibioticaresistente bacteriën, zoals rwzi's, gemengde overstorten en landbouw. Dat vereenvoudigt het onderzoek naar de mogelijke invloed van lozingen uit de gescheiden (hemelwater)riolering.

Almere Stad

Het watersysteem van Almere Stad is een relatief groot bemalingsgebied (ruim 2.300 ha), dat wordt omsloten door de A6 in het zuiden, de Hoge Vaart in het oosten en de ringweg S101 in het noorden en westen (zie figuur 6.1, rechts). Het gebied watert af via gemaal Leeghwater in de Hoge Vaart. Vanuit de Noorderplassen in het noorden, het Waterlandse Bos in het zuiden en via het gemaal vanuit de Hoge Vaart kan water worden ingelaten. Binnen het bemalingsgebied is alleen gescheiden riolering aanwezig. De uitlaten van het hemelwaterstelsel lozen vaak direct in het watersysteem. Enkele uitlaten hebben een randvoorziening, zoals een lamellenfilter. In het gebied zijn geen gemengde riolering en overstorten aanwezig en er vinden ook geen rwzi-effluentlozingen plaats, de rwzi Almere loost in de Lage Vaart. Vooraf is geen kennis over eventuele foutaansluitingen in het gebied voorhanden. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat Almere wijken kent met relatief veel én met nagenoeg geen foutaansluitingen.

Figuur 6.1 Locaties onderzoeksgebieden gescheiden riolering (links) en overzicht watersysteem en monster-namelocaties A1 - A15 in Almere Stad (rechts)



Soest Overhees

De wijk Soest Overhees is circa 70 ha groot en heeft van oorsprong een verbeterd gescheiden stelsel. Sinds enkele jaren zijn de koppelputten tussen de dwa- en hwa-stelsels dicht, waardoor het riool feitelijk functioneert als normaal gescheiden stelsel. De hemelwateruitlaten lozen in een serie vijvers centraal in de wijk, die onderling verbonden zijn en in noordelijke richting afwateren (zie figuur 6.2). De vijvers zijn hydraulisch geïsoleerd en kennen dus geen bovenstroomse aanvoer. Ook lozen er geen gemengde overstorten in het systeem. Wel heeft de beheerder ‘aanwijzingen’ dat nabij de bemonsteringslocaties (vooral locatie S4) foutaansluitingen voorkomen.



Figuur 6.2 Monsternamelocaties S1 - S5 in Soest Overhees (links) en zicht op locatie S4 in de meest bovenstroomse vijver (rechts)

Amersfoort Nieuwland

Ook de wijk Amersfoort Nieuwland (180 ha) had oorspronkelijk een verbeterd gescheiden stelsel met een afvoermogelijkheid vanuit het hemelwaterstelsel richting rzwi. Maar sinds 2014 zijn deze afvoeren dicht, waardoor de rioolstelsels feitelijk als traditioneel gescheiden stelsels functioneren. De hemelwateruitlaten lozen in het watersysteem in de wijk, dat in noordelijke richting afwatert richting de Zeldertsche Wetering (zie figuur 6.3). Het watersysteem kent geen bovenstroomse aanvoer. Ook zijn er geen gemengde overstorten in het gebied. De beheerder vermoedt foutaansluitingen op de hemelwaterstelsels, vooral nabij de uitlaten N3 en N7 (zie figuur 6.3). Hoewel N5 officieel geen zwemlocatie is, wordt deze plek vanwege de waterspeeltoestellen regelmatig gebruikt voor (water)recreatie.



Figuur 6.3 Monsternamelocaties N1 - N7 in Amersfoort Nieuwland (links) en zicht op locatie N5 met waterspeeltoestellen (rechts)

Amersfoort Vathorst

Het rioolstelsel van Amersfoort Vathorst (250 ha) is een traditioneel gescheiden stelsel, het vuilwaterstelsel voert af richting rwzi en het hemelwaterstelsel loost direct in oppervlaktewater. De hemelwateruitlaten lozen in het watersysteem in de wijk, dat in noordelijke richting afwatert in en via de Laak (zie figuur 6.4, links). Via de Laak wordt ook water afgevoerd vanuit het (deels agrarische) gebied ten oosten van Vathorst. In de wijk zijn geen gemengde overstorten aanwezig. Ook heeft de beheerder geen aanwijzingen voor foutaansluitingen op de hemelwaterstelsels. Nabij locatie V6 wordt regelmatig op en rond het oppervlaktewater gerecreëerd.

Amersfoort Kattenbroek

De wijk Amersfoort Kattenbroek (270 ha) had oorspronkelijk een verbeterd gescheiden stelsel. Sinds 2014 zijn de afvoeren dicht en heeft de wijk dus feitelijk een normaal gescheiden stelsel. Het hemelwaterriool loost in het watersysteem in de wijk, dat in westelijke richting afwatert in en via de Male Wetering (zie figuur 6.4, rechts). Ook via de Male Wetering wordt water afgevoerd vanuit het (deels agrarische) gebied ten oosten van Amersfoort. De beheerder vermoedt foutaansluitingen op het hemelwaterstelsel nabij locatie K2. In de wijk Kattenbroek zelf zijn geen gemengde overstorten aanwezig, maar de wijk ten westen van Kattenbroek heeft een gemengd stelsel met een overstort in de Male Wetering. Locatie K1 ligt benedenstrooms van deze overstort in de Male Wetering. Kattenbroek kent ook waterrecreatie op een niet-officiële zwemlocatie: locatie K5.

Figuur 6.4 Monsternamelocaties V1 - V8 in Amersfoort Vathorst (links) en monsternamelocaties K1 - K8 in Amersfoort Kattenbroek (rechts)



6.3 Hydraulisch functioneren

Het hydraulisch functioneren van de (hemelwater)riolering en de watersystemen is tijdens de studie niet gemonitord met debiet- of niveaumetingen, omdat deze in de onderzochte systemen niet of nauwelijks aanwezig zijn. Wel is onderscheid gemaakt in bemonstering op droge en natte dagen. Hierbij is de veronderstelling dat de hoeveelheid (geen of weinig respectievelijk veel) en het type afvoer (grondwater en/of foutaansluitingen respectievelijk hemelwater) vanuit de hemelwaterriolering van invloed zou kunnen zijn op de gevonden bacterieconcentraties in het oppervlaktewater.

De gebruikte neerslaggegevens komen van de dichtstbijzijnde KNMI-neerslagstations. Voor Soest is station Soest gebruikt, voor Amersfoort station Hamersveld en voor Almere stations Zeewolde en Weesp.

6.4 Monsternamelocaties & -strategieën

In Almere Stad zijn op vijftien locaties (A1 t/m A15) monsters genomen uit het watersysteem (zie figuur 6.1, rechts). Deze locaties zijn willekeurig gekozen en zo veel mogelijk gelijkmatig verspreid over het bemalingsgebied. De vijf monsternamelocaties in Soest Overhees (S1 t/m S5, zie figuur 6.2) liggen allemaal direct nabij vijf hemelwateruitlaten die lozen in de vijfverpartijen. In Amersfoort zijn in totaal 23 locaties bemonsterd: zeven in Nieuwland (N1 - N7, zie figuur 6.3), acht in Vathorst (V1 - V8, zie figuur 6.4, links) en acht in Kattenbroek (K1 - K8, zie figuur 6.4, rechts). Op zes locaties na zijn ze willekeurig gekozen en zo veel mogelijk verspreid over de gebieden. Drie locaties zijn gekozen omdat de beheerder hier foutaansluitingen vermoedt (N3, N7 en K2) en drie locaties zijn bemonsterd omdat sprake is van watergerelateerde recreatie (V6, N5 en K5).

Op alle locaties zijn handmatig steekmonsters genomen. Elke locatie is tweemaal bezocht: eenmaal bij droog weer en eenmaal tijdens of vlak na regen. In tabel 6.1 ziet u een overzicht van monsternamedata en weerscondities.

Locatie	Droog	Regen	Details neerslag
Almere Stad	8 aug 2016 ¹	14 jun 2016	vlak na en tijdens intensieve neerslag (10 - 20 mm in aantal uur) ²
Soest Overhees	14 okt 2016 ³	1 aug 2016	7 mm verspreid over de dag ⁴
Amersfoort Nieuwland	5 jul 2016 ⁵	6 feb 2017	10 mm in 48 uur vóór bemonstering
Amersfoort Vathorst	14 okt 2016 ³	1 aug 2016	7 mm verspreid over de dag
Amersfoort Kattenbroek	5 jul 2016 ⁵	6 feb 2017	10 mm in 48 uur vóór bemonstering

Tabel 6.1 Monsternamedata en weerscondities gescheiden riolering

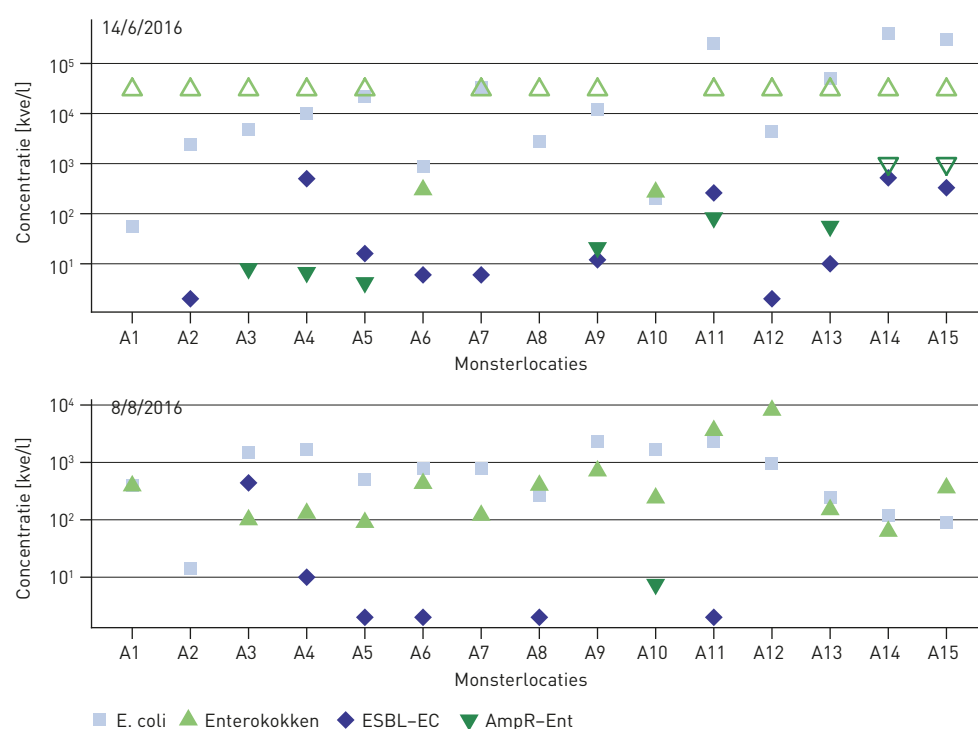
- 1 Geen neerslag op dag van monstername en in de vijf dagen ervoor.
- 2 Tijdens de bemonstering van locaties A14 en A15 regende het intens en is sterke uitstroom vanuit de hemelwaterstelsels naar het oppervlaktewater waargenomen. De monsters op deze locaties zijn uit de uitstromende 'pluim' genomen (goed te onderscheiden door hoge troebelheid).
- 3 Geen neerslag op dag van monstername, 2 mm op de dag ervoor, maar de laatste neerslag van betekenis was bijna twee weken eerder (2 oktober).
- 4 Tijdens bemonstering van locatie S4 is uitstroom uit het stelsel waargenomen.
- 5 Geen neerslag op dag van monstername, maar wel in de week ervoor elke dag 1 - 6 mm neerslag.

6.5 Meetresultaten: concentraties en vrachten

6.5.1 Almere

In Almere zijn op alle locaties E. coli en enterokokken aangetroffen, meestal ook op beide tijdstippen (zie figuur 6.5). De resultaten in Almere vertonen een duidelijk onderscheid tussen droog weer en regen. Op 14 juni (regen) liggen de concentraties E. coli (10^3 - 10^6 kve/l) fors hoger dan de concentraties op 8 augustus (10^2 - 10^3 kve/l) bij droog weer. De concentraties enterokokken liggen in dertien van de vijftien watermonsters van 14 juni hoger dan de bovengrens van de analysemethode (10^3 kve/l). Ondanks dit 'hiaat' is duidelijk dat ook deze bacterie in grotere aantallen is aangetroffen rond en tijdens neerslag dan bij droog weer.

Veel monsters bevatten ook resistente bacteriën: zeventien van de dertig (57%) monsters ESBL-EC en negen van de dertig (30%) monsters AmpR-Ent. In overeenstemming met de hogere concentraties E. coli en enterokokken tijdens regen zijn ESBL-EC en AmpR-Ent vaker aangetroffen bij neerslag: twaalf van de vijftien (80%) locaties tijdens regen versus zeven van de vijftien locaties (47%) bij droog weer zijn positief voor een of beide. De concentraties antibioticaresistente bacteriën liggen in de range 1 - 1.000 kve/l.



Figuur 6.5 Bacterieconcentraties in Almere op 14 juni 2016 (boven, bij neerslag) en 8 augustus 2016 (onder)

Wit-groene driehoeken geven de bovengrens van de analysemethode aan, de concentraties zijn in werkelijkheid hoger.

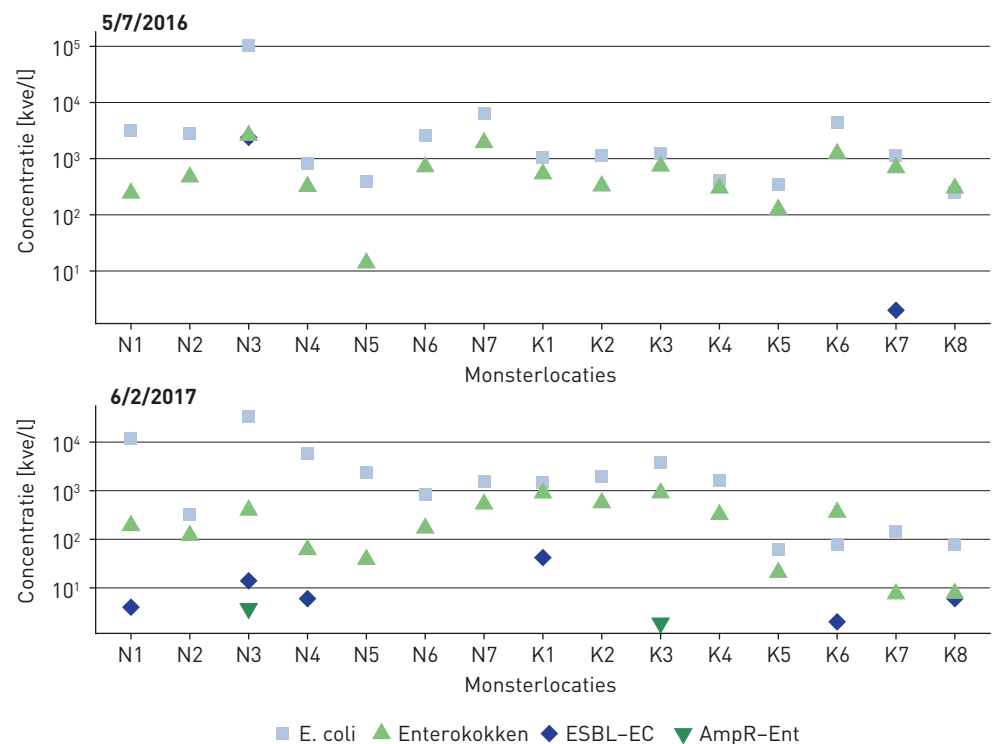
6.5.2 Soest en Amersfoort

Op alle locaties zijn *E. coli* en enterokokken aangetroffen. In totaal is ESBL-EC aangetroffen op achttien (64%) van de 28 locaties en AmpR-Ent op negen locaties (32%) (zie figuur 6.6 en figuur 6.7).

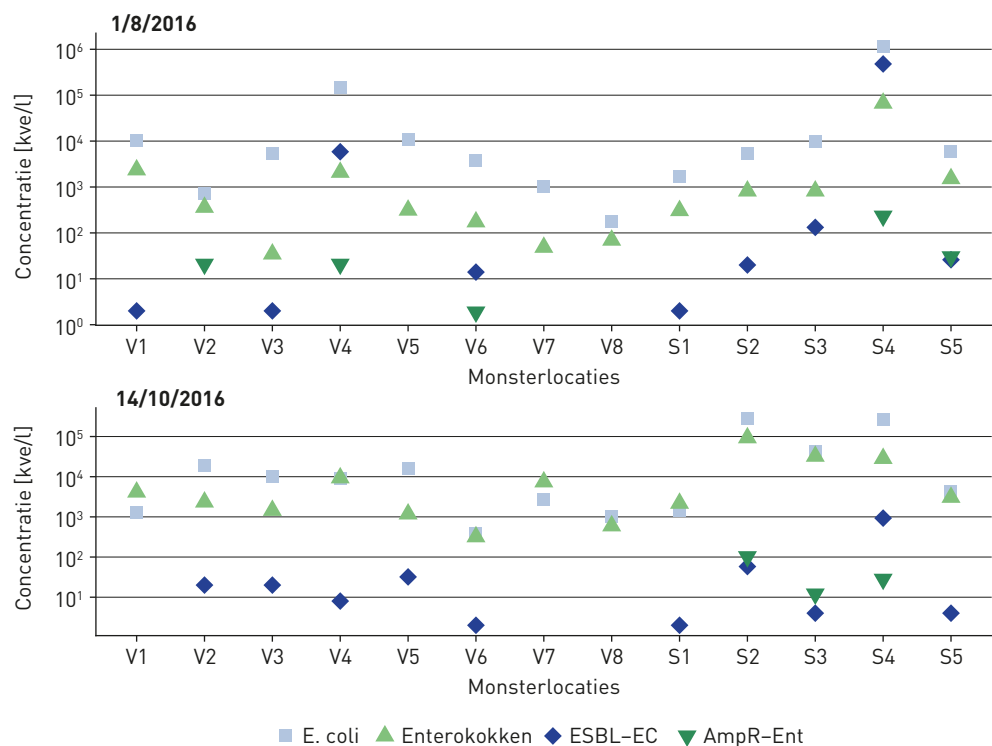
In de Amersfoortse wijken Nieuwland en Kattenbroek is een duidelijk effect van neerslag waarneembaar (zie figuur 6.6). Bij droog weer is op twee van de locaties ESBL-EC aangetroffen en op geen van de locaties AmpR-Ent (13% positief), bij neerslag zijn zeven locaties positief voor een of beide typen antibioticaresistente bacteriën (47% positief).

In de wijken Amersfoort Vathorst en Soest Overhees zijn beide typen resistente bacteriën zeer frequent aangetroffen (zie figuur 6.7). In Amersfoort Vathorst zijn respectievelijk 75% en 38% van de locaties minstens één keer positief voor ESBL-EC en AmpR-Ent, in Soest Overhees is dat respectievelijk bij 100% en 80% van de locaties het geval. Er is in deze wijken geen effect van neerslag te zien.

Figuur 6.6 Bacterieconcentraties in Amersfoort Nieuwland en Kattenbroek op 5 juli 2016 (boven) en 6 februari 2017 (beneden, bij neerslag)



Figuur 6.7 Bacterieconcentraties in Amersfoort Vathorst en Soest Overhees op 1 augustus 2016 (boven) en 14 oktober 2016 (beneden, bij neerslag)



Op achttien locaties zijn concentraties E. coli van ≥ 104 kve/l aangetroffen. Dat zijn vrij hoge concentraties die in zwemwater van 'goede kwaliteit' alleen incidenteel mogen voorkomen. Acht van deze locaties liggen in Almere (locaties 4, 5, 7, 9, 11, 13, 14 en 15), hier zijn de concentraties ≥ 104 kve/l alleen bij neerslag gemeten. Bij vier locaties komen de hoge concentraties zowel bij droog weer voor als bij regen (N3, S3, S4 en V5), bij de overige bij droog weer (S2, V2 en V3) of bij regen (N1, V1 en V4). Tabel 6.2 vat de resultaten voor alle gebieden samen.

Bacterie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan concentratie [log kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaard-afwijking [log kve/l]
E. coli	86	86	100	$2,1 \times 10^3$	3,4	1,0
Entero-kokken	86	85	99	$3,9 \times 10^2$	2,7	0,8
ESBL-EC	86	44	51	$1,0 \times 10^1$	1,3	1,2
AmpR-Ent	86	19	22	$2,1 \times 10^1$	1,2	0,6

Tabel 6.2 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in oppervlaktewater onder invloed van gescheiden riolering

6.6 Discussie

ESBL-EC en in iets mindere mate AmpR-Ent zijn frequent aangetoond in stedelijk oppervlaktewater. Belangrijke fecale bronnen als landbouw en lozingen van rwzi-effluent en vanuit gemengde overstorten zijn op deze locaties te sluiten. Wel is het mogelijk dat (een deel van) deze bacteriën uit huishoudelijk afvalwater via foutaansluitingen op het hemelwaterstelsel in het oppervlaktewater terechtkomen. Een andere mogelijke bron zijn dierlijke uitwerpselen, zoals van honden en (water)vogels. Onbekend is wat de te verwachten bijdrage van deze dieren is aan de resistente bacteriën (en totale E. coli en enterokokken), relatief ten opzichte van contaminatie met humane feces via huishoudelijk afvalwater en of dit verschillend is voor ESBL-EC en AmpR-Ent.

ESBL-EC en AmpR-Ent zijn onder meer gelijktijdig aangetroffen op twee van de vier locaties waar de beheerder vooraf al foutaansluitingen vermoedde (N3 en S4). Op deze locaties én op V4 zijn de concentraties ESBL-EC op minstens een van de meetdata zodanig hoog ($\geq 10^3$ kve/l bij droog weer) dat de concentraties vergelijkbaar zijn met concentraties gemeten in rwzi-effluent. Daarom is het onwaarschijnlijk dat hiervoor alleen watervogels of honden verantwoordelijk zijn. De resistente bacteriën zijn ook aangetroffen op een van de drie plekken die als 'aantrekkelijk voor recreatie' bestempeld zijn (V6).

Al met al zijn er sterke aanwijzingen dat foutaansluitingen op het gescheiden rioolstelsel de vermoedelijke bron zijn van op zijn minst een deel van de aangetroffen antibioticaresistente bacteriën. Maar omdat er nog onvoldoende kennis is over de bijdrage van dierlijke uitwerpselen, zijn de hier gepresenteerde data nog geen bewijs. De rol van foutaansluitingen als bron van antibioticaresistente bacteriën in stedelijk oppervlaktewater is nader te bestuderen door op locaties te meten waar het bestaan van foutaansluitingen bekend is en door de situatie vóór en na herstel van foutaansluitingen te vergelijken.

6.7 Conclusie

ESBL-EC en/of AmpR-Ent zijn aangetoond in stedelijk oppervlaktewater op diverse locaties met (verbeterd) gescheiden riolering in Amersfoort, Soest en Almere en ook op twee van de vier locaties waar vooraf al vermoedens van foutaansluitingen waren.

7 Gemengde overstorten: onderzoek op zes locaties

Op zes locaties in Nederland is de invloed van gemengde overstorten op de aanwezigheid van resistente bacteriën in het oppervlaktewater onderzocht.

7.1 Onderzoeksvraag

De onderzoeksvraag voor de gemengde overstorten is: hoeveel resistente bacteriën zitten in overstortwater?

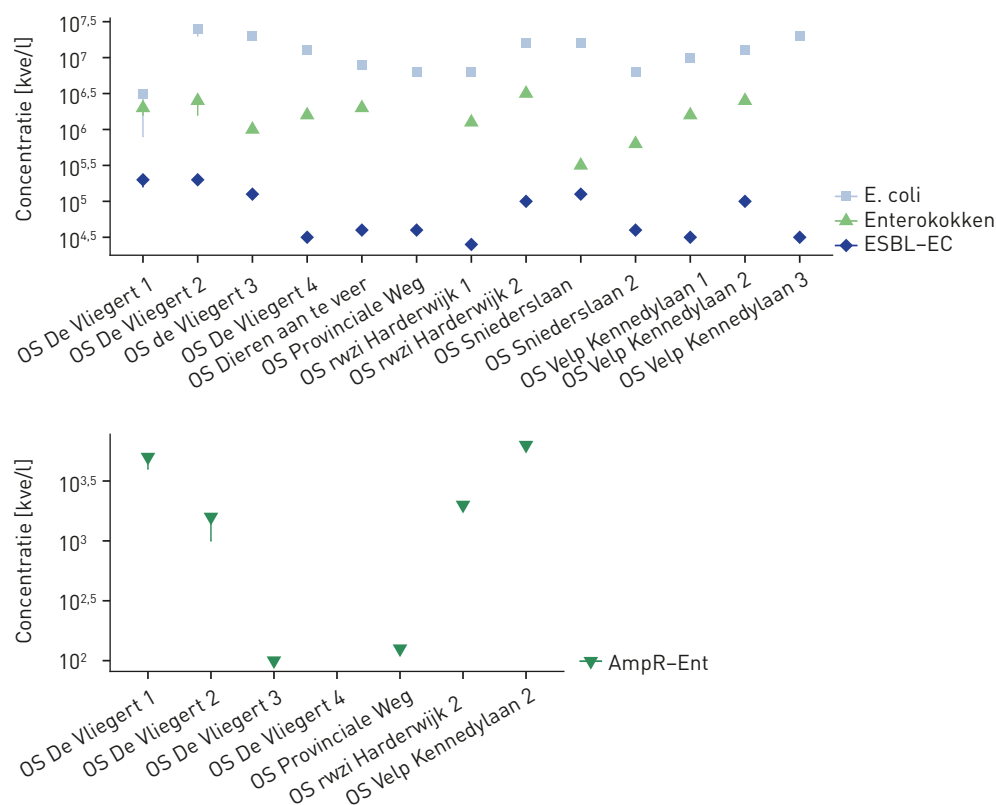
7.2 Monsternamelocaties

In de studie zijn zes gemengde overstorten onderzocht: OS De Vliegert (Hapert) en OS Sniederslaan (Bladel) (zie ook paragraaf 3.5.3), OS rwzi Harderwijk, OS 'aan te veer' (Dieren), OS Kanaalweg (Dieren) en OS Kennedylaan (Velp). Daarnaast is OS Provinciale Weg (Bladel) een keer bemonsterd omdat daar tijdens een overstorting toevallig een monsternemer was. Van deze overstorten zijn OS Provinciale Weg in Bladel en OS 'aan te veer' in Dieren directe overstorten, de andere hebben randvoorzieningen. Bij de overstorten in Harderwijk, Dieren en Velp zijn monsternamekasten aanwezig. OS Kanaalweg in Dieren heeft tijdens de studieperiode niet overgestort.

7.3 Meetresultaten

In alle monsters is ESBL-EC aangetroffen, AmpR-Ent is in 86% van de monsters gevonden (zie figuur 7.1). De concentraties van indicatorbacteriën en ESBL-EC zijn in de overstorten in alle gebieden vergelijkbaar en tonen relatief weinig variatie.

Figuur 7.1 Bacterieconcentraties in overstortwater voor *E. coli*, enterokokken en ESBL-EC (boven) en AmpR-Ent (onder)



In de overstorten in Dieren, Harderwijk (een van de twee monsters), Bladel (Sniederslaan) en Velp (twee van de drie monsters) is geen AmpR-Ent gemeten, in Velp (een van de monsters) geen enterokokken. In overstort De Vliegert is de concentratie AmpR-Ent bij de vierde meting lager dan de detectiegrens van 20 kve/l. In overstort Provinciale Weg zijn ook enterokokken gemeten, de concentratie ligt boven de detectielimiet van 300.000 kve/l.

Tabel 7.1 vat de gegevens van alle onderzochte overstorten samen.

Bacterie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan concentratie [log kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaard-afwijking [log kve/l]
E. coli	13	13	100	$1,2 \times 10^7$	7,0	0,3
Entero-kokken	12	12	100	$1,6 \times 10^6$	6,1	0,3
ESBL-EC	13	13	100	$4,0 \times 10^4$	4,8	0,3
AmpR-Ent	7	6	86	$1,8 \times 10^3$	3,0	0,8

Tabel 7.1 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in overstortwater

7.4 Conclusie

Op basis van de metingen is een goed beeld verkregen van de concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in overstortwater. Deze resistente bacteriën zijn in nagenoeg alle monsters aanwezig. De concentraties ESBL-EC liggen hoger dan in rwzi-effluent, de concentraties AmpR-Ent zijn variabel, waarbij de hoogste concentraties iets hoger zijn dan in rwzi-effluent.

8 Bronmetingen aan rwzi's

Bij honderd rwzi's in Nederland zijn met bronmetingen de concentraties resistente bacteriën in rwzi-effluent onderzocht.

8.1 Onderzoeksvragen

De onderzoeksvragen voor de bronmetingen zijn:

- 1) Hoeveel resistente bacteriën zitten in effluent van Nederlandse rwzi's?
- 2) Wat is de variatie aan resistente bacteriën in effluent in de tijd?

8.2 Monsternamelocaties

De metingen bij de honderd rwzi's zijn uitgevoerd in het kader van een verwant RIVM-onderzoek in opdracht van het ministerie van VWS (Schmitt et al., 2017). In het betreffende rapport vindt u meer informatie over de selectie van de honderd onderzochte rwzi's. Samenvattend zijn de rwzi's op meerdere parameters gekozen, zodat rwzi's van verschillende grootte, met en zonder ziekenhuizen en/of verpleeghuizen in de buurt en met verschillende zuiveringstechnieken zijn vertegenwoordigd. In alle rwzi's is in 2016 een keer een 24-uurs-monster genomen. Zowel het influent als het effluent is op *E. coli* en ESBL-EC onderzocht (ook beschreven in het RIVM-rapport), en het effluent op enterokokken en AmpR-Ent (niet beschreven in het RIVM-rapport). Om de variatie in de tijd binnen rwzi's vast te stellen, zijn rwzi Hapert en rwzi Zeewolde gedurende een jaar maandelijks bemonsterd.

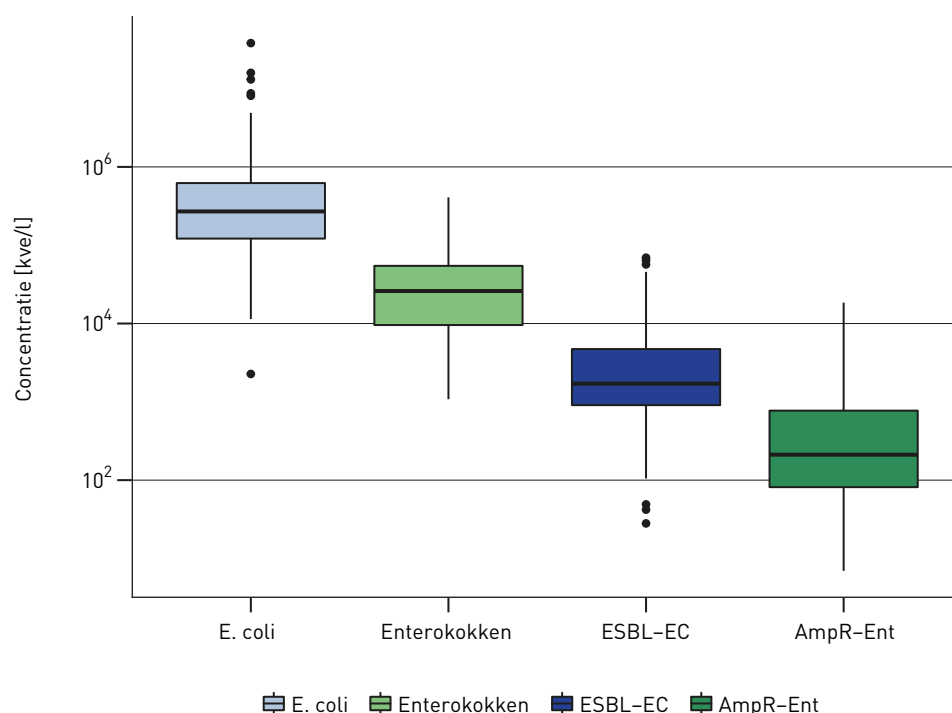
8.3 Meetresultaten

In effluent van alle honderd rwzi's is ESBL-EC aangetoond, AmpR-Ent is in 92% van de onderzochte rwzi's gevonden. De concentraties ESBL-EC liggen rond 2×10^3 kve/l, de concentraties AmpR-Ent tien keer lager (rond 200 kve/l) (zie figuur 8.1). De variatie van de concentraties is voor alle bacteriën (ook voor de indicatorbacteriën) ongeveer even groot: de standaardafwijking ligt tussen 0,6 en 0,7 log kve/l (zie tabel 8.1).

Tabel 8.1 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in rwzi-effluent honderd rwzi's

Bacterie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan [kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaardafwijking [log kve/l]
<i>E. coli</i>	99	99	100	$2,7 \times 10^5$	5,5	0,7
Enterokokken	77	77	100	$2,6 \times 10^4$	4,4	0,6
ESBL-EC	100	100	100	$1,7 \times 10^3$	3,3	0,7
AmpR-Ent	74	68	92	$2,1 \times 10^2$	2,4	0,7

Figuur 8.1 Bacterieconcentraties in effluent honderd rwzi's



In de twee herhaaldelijk onderzochte rwzi's zijn op alle momenten ESBL-EC en AmpR-Ent aangetroffen. De gemiddelde concentraties en de variatie tussen monsters liggen in dezelfde orde van grootte als bij de 100 rwzi's (zie tabel 8.2 en tabel 8.3). Ook de standaardafwijking is in dezelfde orde van grootte als de variatie tussen de 100 rwzi's: voor Hapert iets hoger (tussen de 0,6 en 0,8 log/kve/l), voor Zeewolde iets lager (tussen de 0,4 en 0,6 log kve/l).

Bacterie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan concentratie [log kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaardafwijking [log kve/l]
E. coli	12	12	100	$9,2 \times 10^4$	5,2	0,8
Entero-kokken	11	11	100	$1,4 \times 10^4$	4,2	0,7
ESBL-EC	12	12	100	$8,0 \times 10^2$	3,1	0,8
AmpR-Ent	11	11	100	$2,3 \times 10^2$	2,3	0,6

Tabel 8.2 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in rwzi-effluent gebaseerd op maandelijkse metingen in rwzi Hapert

Bacterie	Metingen	Positieve metingen	% positief	Mediaan concentratie [log kve/l]	Gemiddelde concentratie [log kve/l]	Standaardafwijking [log kve/l]
E. coli	11	11	100	$1,5 \times 10^5$	5,0	0,4
Entero-kokken	11	11	100	$2,1 \times 10^4$	4,2	0,4
ESBL-EC	11	11	100	$1,6 \times 10^3$	3,0	0,5
AmpR-Ent	10	10	100	$2,4 \times 10^2$	2,2	0,6

Tabel 8.3 Prevalenties en concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in rwzi-effluent gebaseerd op maandelijkse metingen in rwzi Zeewolde

8.4 Conclusie

Op basis van de bronmetingen is een goed en representatief beeld verkregen van de concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent in rwzi-effluenten. Deze resistente bacteriën zijn in nagenoeg alle monsters aanwezig. De resultaten bieden een betrouwbare basis om te bepalen hoeveel resistente bacteriën met rwzi-effluent het Nederlandse oppervlaktewater kunnen bereiken. De variatie in concentraties gevonden in herhaaldelijke metingen bij een enkele rwzi is bijna net zo groot als de variatie tussen verschillende rwzi's. Dit is mogelijk te verklaren door variaties in de aanvoer en zuiveringsefficiëntie.

9 Oostvaardersplassen

In de Oostvaardersplassen is de invloed van wilde dieren op aanwezigheid van resistente bacteriën in het oppervlaktewater onderzocht.

9.1 Onderzoeksvraag

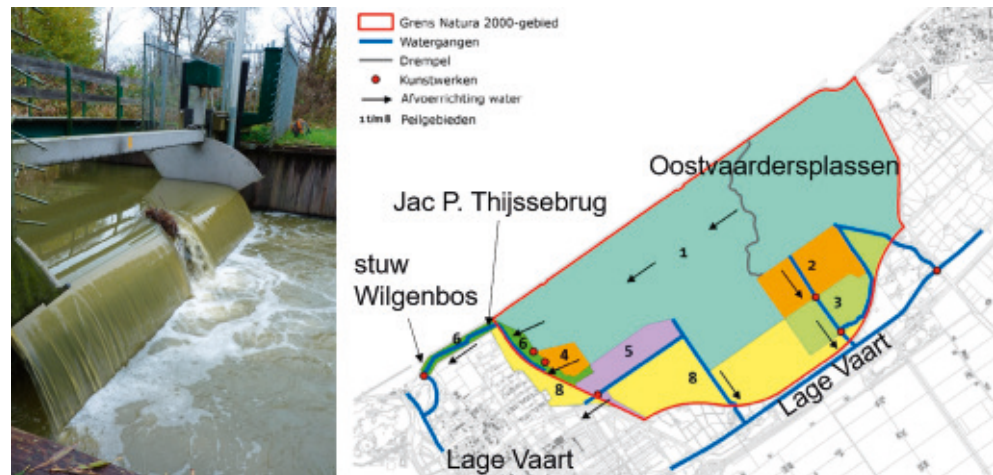
De onderzoeksvraag voor de Oostvaardersplassen is: zijn ESBL-EC en AmpR-Ent aanwezig in oppervlaktewater dat alleen wordt beïnvloed door wilde dieren?

9.2 Topografie en gebiedsinformatie

De Oostvaardersplassen vormen een groot natuurgebied (circa 6.000 ha) tussen Almere en Lelystad. Het bestaat grofweg uit twee delen (zie figuur 9.1): de wat hogergelegen droge delen in het zuidoosten met onder andere grote grazers en het grote plassengebied in het noorden en westen met voornamelijk vogels. De afwatering van beide delen verschilt. De droge delen wateren af in zuidoostelijke richting direct in de Lage Vaart, het plassengebied watert af in westelijke richting via de zogenaamde Wilgentocht. De Wilgentocht is een langgerekt stuk water langs de Oostvaardersdijk, dat is ingericht als helofytenveld. Via een stuw (Wilgenbos) loost het plassengebied in de Lage Vaart.

De interesse in het gebied voor dit onderzoek komt voort uit de aanwezigheid van wilde dieren en dan in het bijzonder van trekvogels die mogelijk antibioticaresistente bacteriën van elders met zich meevoeren. Bijzonder aan het gebied is dat er niet of nauwelijks mensen aanwezig zijn, waardoor de kans op vervuiling van het oppervlaktewater met humaan afvalwater nihil is. Ook kan door de relatief hoge ligging van de Oostvaardersplassen geen water vanuit de Lage Vaart (met eventueel rwzi-effluent) het gebied binnenkomen. Deze gebruikelijke bron van ESBL-EC en AmpR-Ent is dus op voorhand uit te sluiten.

Figuur 9.1 Overzicht afwatering Oostvaardersplassen (rechts) en stuw Wilgenbos (links)

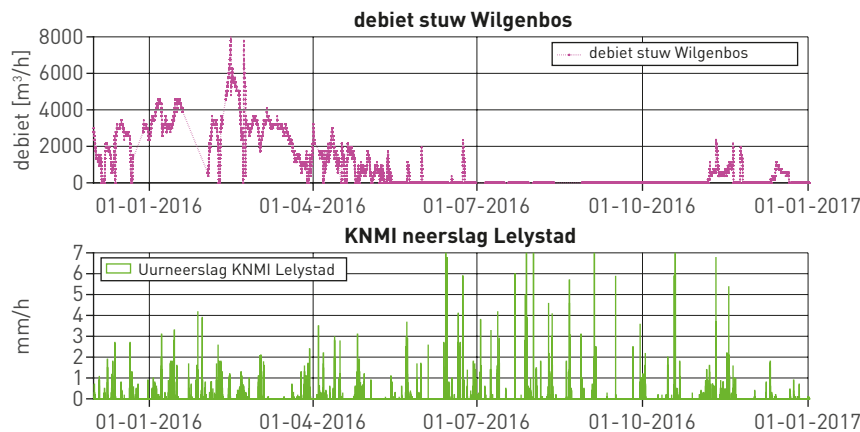


9.3 Hydraulisch functioneren

Het hydraulisch functioneren van het plassengebied is in beeld gebracht met metingen bij de stuw Wilgenbos. Het debiet over de stuw is berekend aan de hand van het bovenstroomse waterniveau (bij de stuw) en een bekende Q/h-relatie. Vrije afstromingscondities zijn geverifieerd aan de hand van het benedenstroomse waterniveau.

Historische metingen laten zien dat het debiet over de stuw varieert van circa 4.000 m³/h in het winterseizoen tot 0 m³/h in de zomer. Vooral in de zomer kan langere tijd niet of nauwelijks water over de stuw komen. In de monsternameperiode (december 2015 - december 2016) is aanvankelijk hetzelfde patroon waargenomen met relatief grote debieten (tot 8.000 m³/h) in het eerste kwartaal van 2016 (zie figuur 9.2). Vanaf april loopt de afvoer terug en vanaf medio mei stopt deze helemaal. Maar in tegenstelling tot eerdere jaren neemt de afvoer uit het gebied nauwelijks toe in de herfst. Behalve korte perioden in november en december blijft de afvoer uit het gebied nul.

Voor een indicatie van de hoeveelheid gevallen neerslag is de neerslagmeting van KNMI-station Lelystad gebruikt. Deze meter bevindt zich op ongeveer 25 km van de stuw en ongeveer 10 km van het oostelijke deel van de Oostvaardersplassen.



Figuur 9.2 Debiet over stuw Wilgenbos (boven) en neerslag bij KNMI-station Lelystad (onder)

9.4 Monsternamelocaties & -strategieën

Monstername uit het plassegebied van de Oostvaarderplassen zelf is niet toegestaan. Als alternatief is direct bij het uitstroompunt van het plassegebied bemonsterd vanaf de Jac P. Thijsssebrug. Deze locatie ligt nog bovenstrooms van de Wilgentocht en wordt dus niet beïnvloed door het helofytenveld.

Gelet op de omvang van het plassegebied en daarmee het watervolume in het gebied, is de verwachting vooraf dat er weinig dynamiek in een eventuele bacterieconcentratie is. Daarom is besloten dat handmatige steekmonsters voldoende informatie moeten opleveren. In de periode december 2015 - december 2016 is elke maand bemonsterd (zie tabel 9.1). Bij de planning is rekening gehouden met het feit dat in de zomer enkele monsters kunnen ontbreken als er geen afvoer uit het gebied is. Doordat er in de herfst/winter van 2016 ook geen afvoer was, was ook in deze periode geen monstername mogelijk. In totaal zijn zes monsters uit het gebied verzameld.

Locatie	Data monstername (2016)
Oostvaardersplassen	14 december (2015)
Oostvaardersplassen	11 januari
Oostvaardersplassen	15 februari
Oostvaardersplassen	14 maart
Oostvaardersplassen	11 april
Oostvaardersplassen	9 mei
Oostvaardersplassen	13 juni*
Oostvaardersplassen	11 juli*
Oostvaardersplassen	15 augustus*
Oostvaardersplassen	12 september*
Oostvaardersplassen	17 oktober*
Oostvaardersplassen	14 november*

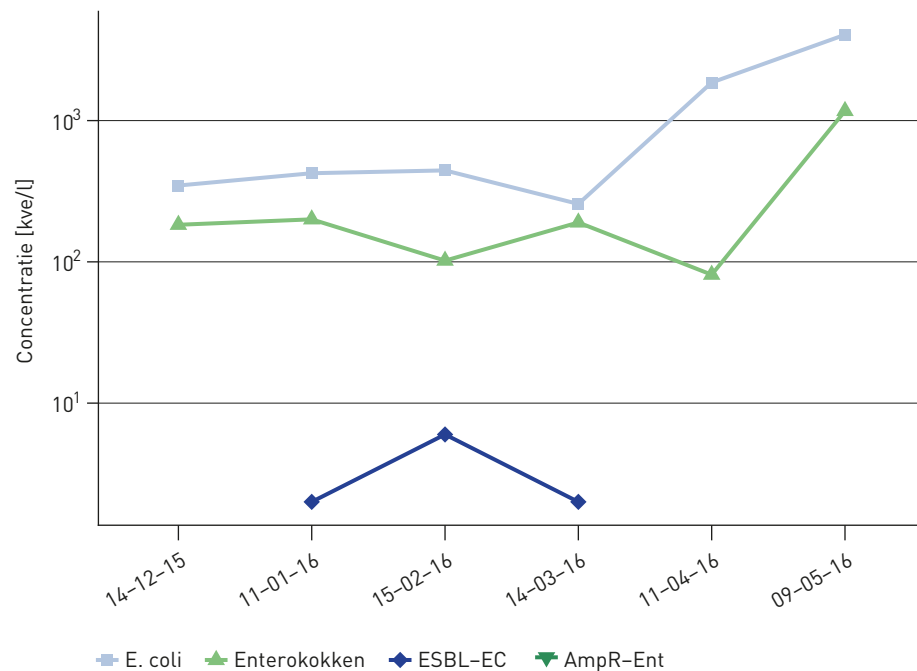
Tabel 9.1 Monsternamedata Oostvaardersplassen (Jac P. Thijsssebrug)

* Niet bemonsterd omdat er geen water over de stuw kwam.

9.5 Meetresultaten: concentraties en vrachten

In alle monsters zijn *E. coli* en enterokokken aangetroffen. ESBL-EC is in drie van de zes monsters in lage concentraties (< 10 kve/l) aangetoond, AmpR-Ent is niet aangetoond. De vrachten liggen gemiddeld bij $2,8 \times 10^8$ kve/dag voor ESBL-EC. Daarmee zijn de vrachten grofweg vergelijkbaar met die in het gebied Piet Oberman en in de Groote Beerze, terwijl Piet Oberman een duidelijk kleinere oppervlakte heeft. In totaal zijn vijf verschillende ESBL-EC-varianten aangetroffen: in alle drie de monsters verschillende en in februari zelfs drie verschillende varianten in één monster. Vier van deze vijf varianten zijn in geen van de andere monsters aangetroffen. Eén variant (ST10/CTX-M-15) komt vaak voor en is ook in de Groote Beerze en de Groote Wetering en op vijf verschillende locaties in Amersfoort gevonden.

Figuur 9.3 Bacterieconcentraties bij Jac P. Thijsssebrug, bij uitstroom Oostvaarderplassen



9.6 Discussie

De in het algemeen lage concentraties fecale bacteriën (*E. coli* en enterokokken) bevestigen de afwezigheid van grote fecale bronnen óf wijzen op aanzienlijke verdunning van de aanwezige fecale bronnen. ESBL-EC is aangetoond in de wintermaanden, wat een indicatie is van dragerschap bij wilde dieren. Welke dieren dit zijn, kon met dit onderzoek niet worden vastgesteld. De monsterlocatie is niet geschikt om tijdens zomermaanden te bemonsteren, omdat er dan geen water over de stuw komt. Om erachter te komen of sprake is van seizoensvariatie, is monsternamen in het gebied vanaf een boot nodig.

9.7 Conclusie

De onderzoeksresultaten geven een eerste indicatie dat ESBL-EC via wilde dieren in oppervlaktewater terecht kan komen. Wel kon alleen in de wintermaanden worden gemeten en zijn de gemeten concentraties in dit gebied laag.

10 Concentraties en (geschatte) jaarlijkse vrachten per bron

Dit hoofdstuk vat de gevonden concentraties resistente bacteriën per bron samen en geeft een schatting van de totale jaarlijkse vrachten.

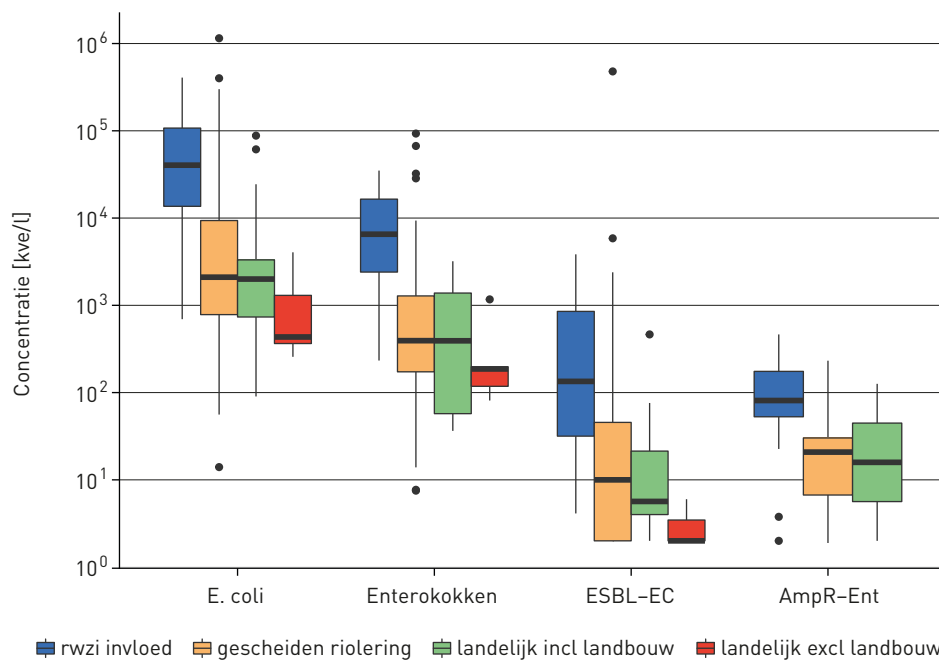
10.1 Concentraties in oppervlaktewater per bron

In tabel 10.1 ziet u de prevalenties en gemiddelde concentraties in oppervlaktewater in landelijk gebied met en zonder invloed van landbouw, in steden met gescheiden riolering en in oppervlaktewater beïnvloed door rwzi-effluent.

Over het algemeen zijn de concentraties in oppervlaktewater in landelijk gebied met landbouwinvloeden vergelijkbaar met die in oppervlaktewater in stedelijke gebieden met gescheiden riolering. Wel zijn er iets meer positieve monsters bij foutaansluitingen dan in gebieden onder invloed van landbouw, met name voor AmpR-Ent. Dit kan samenhangen met het feit dat AmpR-Ent vaker voorkomt bij mensen dan bij dieren.

De concentraties in oppervlaktewater onder directe invloed van rwzi-effluenten liggen ongeveer een factor 10 hoger dan de concentraties in oppervlaktewater onder invloed van landbouw of in gebieden met gescheiden riolering. Maar naarmate de afstand tot de effluent-lozing groter is (enkele km's), nemen de concentraties resistente bacteriën af (zie figuur 4.9 in hoofdstuk 4).

De laagste concentraties zijn gevonden in oppervlaktewater in landelijk gebied dat niet beïnvloed wordt door landbouw. In dit gebied is AmpR-Ent helemaal niet aangetoond. Van de concentraties resistente bacteriën in de bronnen zelf (overstorten en rwzi-effluenten) vindt u een samenvatting in respectievelijk hoofdstuk 7 en hoofdstuk 8.



Figuur 10.1 Bacterieconcentraties in oppervlaktewater onder invloed van rwzi-effluent, in gebieden met (verbeterd) gescheiden riolering en in landelijke gebieden met en zonder invloed van landbouw

Tabel 10.1 Prevalenties en concentraties resistente bacteriën in oppervlaktewater onder invloed van verschillende bronnen

Bron	Monster-locaties	E. coli		Enterokokken		ESBL-EC		AmpR-Ent	
	n	Prevalentie	Concentratie (mediaan, log standaard-afwijking)	Prevalentie	Concentratie (mediaan, log standaard-afwijking)	Prevalentie	Concentratie (mediaan, log standaard-afwijking)	Prevalentie	Concentratie (mediaan, log standaard-afwijking)
		%	[kve/l]	%	[kve/l]	%	[kve/l]	%	[kve/l]
rwzi-effluent	24 [20/4]	100	4,0x10 ⁴ [0,7]	100	6,5x10 ³ [0,7]	100	1,3x10 ² [0,9]	62	8,1x10 ¹ [0,7]
Foutaansluitingen	86 [30/46/10]	100	2,1x10 ³ [1]	99	3,9x10 ² [0,8]	44	1,0x10 ¹ [1,2]	19	2,1x10 ¹ [0,6]
Landelijk gebied, incl. landbouw	47 [18/25/4]	100	2,0x10 ³ [0,7]	100	3,9x10 ² [0,7]	43	5,7x10 ⁰ [0,6]	5	1,6x10 ¹ [1,3]
Landelijk gebied, excl. landbouw (wilde vogels)	6	100	4,3x10 ² [0,5]	100	1,9x10 ² [0,4]	50	2,0x10 ⁰ [0,3]	0	n.v.t.

kve = kolonievormende eenheden.
Het gemiddelde wordt uit het gemiddelde per onderzoekslocatie berekend.

10.2 Schattingen totale jaarlijkse vrachten per bron

De concentratie- en effectmetingen geven een indicatie van de rol van rwzi-effluent en landbouw op de onderzochte locaties. Daarnaast is aan de hand van bronmetingen in rwzi-effluent en overstortwater een schatting te maken van de totale Nederlandse vrachten die uit deze bronnen voortkomen. Daarvoor zijn de hier gerapporteerde concentraties met het totale volume rwzi-effluent en overstortwater in Nederland gecombineerd. Ook voor lozing via foutaansluitingen is een schatting gemaakt, aannemende dat de concentraties resistente bacteriën in afvalwater die via foutaansluitingen in de hemelwaterafvoer terecht komen even hoog zijn als in ruw afvalwater (influent, zoals gerapporteerd in Schmitt et al., 2017).

In tabel 10.2 ziet u dat volgens deze schattingen rwzi-effluent, overstorten en foutaansluitingen ongeveer voor vergelijkbare hoeveelheden resistente bacteriën zorgen. Dat de verschillende routes ongeveer evenveel bacteriën in het oppervlaktewater lozen, komt doordat de hoeveelheid water uit de bronnen omgekeerd evenredig is aan de concentratie bacteriën in dat water.

Tabel 10.2 Jaarlijks in Nederland geloosde volumes, concentraties en aantallen ESBL-EC en AmpR-Ent via drie transmissieroutes van afval- naar oppervlaktewater

Transmissieroute	Volume	ESBL-EC		AmpR-Ent	
		Concentratie	Vracht	Concentratie	Vracht
	[10 ⁶ m ³ /jaar]	mediaan [kve/l] (standaard-afwijking [log kve/l])	[kve/jaar], mediaan (variatie)	[mediaan [kve/l] (standaard-afwijking [log kve/l])]	[kve/jaar], mediaan (variatie)
Rwzi-effluent	1.921	1,7x10 ³ [0,7]	3x10 ¹⁵ (8x10 ¹⁴ - 2x10 ¹⁶)	2,1x10 ² [0,7]	4x10 ¹⁴ (1x10 ¹⁴ - 2x10 ¹⁵)
Overstort gemengde rioolstelsels	37**	4,0x10 ⁴ [0,3]	1x10 ¹⁵ (1x10 ¹⁵ - 5x10 ¹⁵)	1,8x10 ³ [0,8]	7x10 ¹³ (6x10 ¹² - 2x10 ¹⁴)
Foutaansluitingen	2,7***	9,3x10 ⁵ [0,3]****	3x10 ¹⁵ (1x10 ¹⁵ - 5x10 ¹⁵)	NA	NA

kve = kolonievormende eenheden

** 957 km² verhard oppervlak x 480 mm nettoneerslag x 8% afvoer via de overstort. Deze schatting heeft dezelfde orde van grootte als het kengetal voor overstorten in de emissieregistratie: 29 mio m³/jaar.

*** 2% foutaansluitingen x 3 miljoen inwoners x 46 m³/jaar per inwoner.

**** geen concentraties in een foutaansluiting zelf gemeten – hier wordt aangenomen dat de concentraties in foutaansluitingen gelijk zijn aan de concentraties in rwzi-influent (ruw afvalwater).

NA = niet geanalyseerd.

11 Synthese onderzoeksresultaten en conclusies

In dit project is de invloed van verschillende bronnen op de aanwezigheid van resistente bacteriën (en specifiek ESBL-EC en AmpR-Ent) in oppervlaktewater onderzocht. Dit hoofdstuk vat de resultaten per type bron samen en bespreekt ze.

11.1 Invloed rwzi-effluent op resistente bacteriën in oppervlaktewater

11.1.1 Resistente bacteriën bijna altijd aanwezig in rwzi-effluenten

In de effluenten van honderd rwzi's zijn concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent onderzocht (zie paragraaf 8.3). ESBL-EC is in elk geanalyseerd monster aangetroffen, AmpR-Ent in 92%. De concentraties liggen gemiddeld rond 200 kve/l (AmpR-Ent) en 2.000 kve/l (ESBL-EC). De onderzochte resistente bacteriën komen dus op grote schaal in rwzi-effluent voor.

11.1.2 Hogere prevalenties en concentraties in oppervlaktewater na lozing rwzi-effluent

In de Groote Beerze en de Groote Wetering zijn herhaaldelijk metingen boven- en benedenstrooms van een rwzi-lozingspunt gedaan. Ook is het rwzi-effluent zelf gemeten (zie paragrafen 3.5.2, 4.5.2 en 8.3).

Resistente bacteriën zijn benedenstrooms duidelijk vaker aanwezig dan bovenstrooms. In ongeveer de helft van de bovenstroomse monsters is ESBL-EC gevonden, terwijl dezelfde resistente bacterie in alle benedenstroomse monsters zit. AmpR-Ent is in de bovenstroomse monsters nagenoeg niet gevonden, maar wel in 56% (Groote Beerze) en 100% (Groote Wetering) van de benedenstroomse monsters.

Gemiddeld over alle meetdagen leidt lozing van rwzi-effluent tot significant hogere concentraties resistente en indicatorbacteriën. De concentraties bij de benedenstroomse meetpunten liggen gemiddeld over alle bacteriën (resistente bacteriën en indicatoren) en meetmomenten ongeveer een factor 10 tot 100 hoger dan op de bovenstroomse locaties.

	Mediaan concentratie (kve/l)			
	Groote Beerze (n=18)		Groote Wetering (n=4)	
	Boven	Beneden	Boven	Beneden
E. coli	2,3x10 ³	2,7x10 ⁴	2,9x10 ³	1,4x10 ⁵
Enterokokken	4,1x10 ²	2,8x10 ³	1,7x10 ³	2,2x10 ⁴
ESBL-EC	6,9x10 ⁰	6,4x10 ¹	3,0x10 ¹	1,2x10 ³
AmpR-Ent	2,0x10 ⁰	7,1x10 ¹	ND	2,3x10 ²

Tabel 11.1 Concentraties boven- en benedenstrooms rwzi

In het Vinkel-gebied is de reikwijdte van de verhoging van de concentraties resistente bacteriën na een rwzi-lozing onderzocht. Hieruit blijkt dat de concentraties op 3,5 km afstand van het lozingspunt nog verhoogd kunnen zijn.

De concentraties in effluent van de twee onderzochte zuiveringen in de Groote Beerze en de Groote Wetering zijn van dezelfde orde van grootte als gevonden in het landelijke onderzoek en zijn daarmee representatief. Maar afhankelijk van de grootte van het ontvangende oppervlaktewater kan de verdunning van rwzi-effluent variëren. Grotere oppervlaktewateren kunnen ook door meerdere rwzi's worden beïnvloed. De concentraties en de bijdragen van rwzi-lozingen zijn daardoor sterk afhankelijk van het oppervlaktewatersysteem.

11.1.3 Rwzi-lozingen bepalend voor totale hoeveelheid bacteriën benedenstrooms

Voor twee locaties en voor achttien (Groote Beerze) en vier (Vinkel) monsterdagen zijn zowel concentratiemetingen in als gepasseerde watervolumes van de rivier beschikbaar. Hierdoor zijn de totale aantallen bacteriën voor en na het lozingspunt en in het effluent te berekenen (= massabalans) (zie figuur 3.12 in hoofdstuk 3 en figuur 4.8 in hoofdstuk 4).

De totale hoeveelheid bacteriën in het ontvangende oppervlaktewater benedenstrooms wordt voornamelijk bepaald door de lozing van het rwzi-effluent. De vrachtenberekening heeft een relatief grote foutenmarge door onnauwkeurigheid in de debietbepaling en door de relatief lage precisie van concentratiebepalingen van bacteriën in water in het algemeen. Toch geven deze metingen aan dat het merendeel van de resistente bacteriën benedenstrooms van de onderzochte lozingspunten van de rwzi afkomstig is.

11.1.4 Conclusie bijdrage rwzi-lozingen aan contaminatie oppervlaktewater

Uit dit onderzoek blijkt dat lozingen van rwzi-effluenten de concentraties resistente bacteriën in oppervlaktewater duidelijk kunnen verhogen. Bovendien blijkt dat deze lozingen de totale hoeveelheid resistente bacteriën in de onderzochte oppervlaktewateren voor nagenoeg 100% kunnen verklaren. De concentraties die op de twee onderzochte locaties in effluent zijn gevonden, zijn representatief voor rwzi-effluenten in het algemeen.

11.2 Invloed landelijke achtergrond op resistente bacteriën in oppervlaktewater

Door het bemesten van landbouwgrond of afspoeling van landbouwbedrijven kan dierlijke mest in het oppervlaktewater terechtkomen. Het onderzoek in gebied Piet Oberman was vooral gericht op de invloed van het bemesten van landbouwgrond (zie hoofdstuk 5), terwijl in de Groote Beerze invloeden van zowel uitgereden mest als afspoeling van melkveemest en van mest van veehouderijen zelf te verwachten waren (zie paragraaf 3.5.1). Voor de Groote Wetering was er geen informatie over de typen agrarische invloeden bovenstrooms van de rwzi (zie paragraaf 4.5.1). In alle drie de gebieden is mogelijk ook een bijdrage van wilde dieren. Het gebied Oostvaardersplassen geeft een indicatie van landelijke achtergrond zonder agrarische invloeden (zie hoofdstuk 9). Meten in de Oostvaardersplassen was alleen mogelijk tussen december en mei.

11.2.1 Prevalenties en concentraties bij landbouw lager dan bij rwzi

In oppervlaktewater in landelijk gebied met invloed van landbouw zijn ESBL-EC en AmpR-Ent waargenomen. Terwijl ESBL-EC relatief vaak is gevonden (prevalentie 32 - 56% in de drie gebieden), is de prevalentie van AmpR-Ent heel laag (0 - 6% van de monsters in de drie gebieden positief). Maar over het algemeen liggen de prevalenties en concentraties van ESBL-EC en AmpR-Ent in oppervlaktewater onder invloed van landbouw lager (ongeveer twintig keer) dan in oppervlaktewater onder invloed van rwzi-effluent. De prevalentie in landelijk gebied zonder landbouw is in dezelfde orde van grootte: 0% voor AmpR-Ent en 50% voor ESBL-EC (waarbij de bemonstering in dit gebied, de Oostvaardersplassen, met zes monsters beperkter was dan in de andere gebieden).

Verskil in prevalentie

Voor ESBL-EC zijn verschillen in prevalentie tussen de meetlocaties gevonden: Piet Oberman, gedomineerd door bemesting als fecale bron, toont de laagste prevalenties van ESBL-EC (32%). In de Groote Beerze, de Groote Wetering en de Oostvaardersplassen is iets vaker ESBL-EC aangetoond (respectievelijk 56%, 50% en 50%) (zie tabel 3.4 in hoofdstuk 3, tabel 4.2 in hoofdstuk 4, tabel 5.2 in hoofdstuk 5 en figuur 9.3 in hoofdstuk 9). Het verschil in prevalentie tussen ESBL-EC en AmpR-Ent in de landelijke gebieden hangt mogelijk samen met het feit dat dierlijke feces de belangrijkste bron vormen in deze gebieden en dat AmpR-Ent minder vaak voorkomt bij dieren.

Mogelijke reden voor de lagere prevalentie bij Piet Oberman vergeleken met de andere gebieden onder invloed van landbouw is dat de uitgereden mest in dit relatief kleine gebied meestal geen ESBL-EC bevat. Daarnaast kunnen resistente bacteriën in de Groote Beerze en de Groote Wetering afkomstig zijn van bedrijven, bijvoorbeeld door erfafspoeling bij neerslag of na reiniging van stallen of verhard oppervlak. Een eerdere studie heeft bijvoorbeeld aangetoond dat verhoogde concentraties ESBL-EC kunnen voorkomen in slootjes in de nabije omgeving van pluimveebedrijven, met name tijdens het schoonmaken van stallen (Blaak et al., 2015). De concentraties die in dergelijke slootjes zijn gevonden, zijn gemiddeld bijna twintig keer hoger dan wat in de huidige studie in de landelijke gebieden is gevonden. Voor de Groote Wetering is daarnaast niet bekend wanneer overstortingen optraden, het effect van overstorten is hier dus niet uit te sluiten.

Vergelijkbare concentraties

De concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent gevonden in positieve monsters bij Piet Oberman, Groote Wetering en Groote Beerze zijn echter vergelijkbaar (tussen de 6 - 30 kve/l ESBL-EC en 2 - 17 kve/l AmpR-Ent). In de Oostvaardersplassen zijn de concentraties nog lager dan de gemeten concentraties in landelijke gebieden onder invloed van landbouw (2 - 6 kve/l ESBL-EC, AmpR-Ent is niet gedetecteerd (< 2 kve/l)).

Vogels

De metingen in de Oostvaardersplassen zijn enigszins beperkt, omdat deze niet in de zomer konden plaatsvinden. In de zomer kunnen andere trekvogels uit het zuiden in Nederland aanwezig zijn, die mogelijk eerder drager zijn van resistente bacteriën omdat de prevalenties in de humane bevolking in zuidelijkere landen duidelijk hoger liggen dan in Nederland. Gezien de bevindingen is het goed mogelijk dat vogels een relatief grote bron voor kleinere oppervlaktewateren vormen.

11.2.2 Geen duidelijke invloed bemesting en neerslag

De invloed van landbouw is tijdsafhankelijker dan de invloed van een rwzi. Pieken van afspoeling van resistente bacteriën zijn te verwachten als recent is bemest en resistente bacteriën in de mest aanwezig zijn, en als het voldoende regent. Binnen dit project zijn debietproportionele monsters genomen om pieken in een kort tijdsbestek (één meetdag) te kunnen opvangen. Ook is geprobeerd in droge en natte perioden te meten en metingen binnen en buiten het mestuitrijdseizoen te vergelijken.

In en buiten mestuitrijdseizoen

Buiten het mestuitrijdseizoen zijn in de Groote Beerze en in Piet Oberman (in vier metingen) geen resistente bacteriën gevonden. Bij de Groote Beerze is geen uitspraak te doen over invloed van mestuitrijden op korte tijdsschaal, omdat de precieze dagen van uitrijden niet bekend zijn. In het kleinere onderzoeksgebied Piet Oberman, waar de precieze data van bemesting voor bijna alle landbouwbedrijven wél bekend zijn, is geen sterk effect tussen bemesting en de aanwezigheid van resistente bacteriën gevonden. Het is mogelijk dat ESBL-EC en AmpR-Ent niet vaak in Piet Oberman zijn aangetroffen omdat de prevalentie van deze bacteriën in de gebruikte mest laag was (slechts één keer is ESBL-EC aangetoond en niet alle uitgereden mest kon op de aanwezigheid van resistente bacteriën worden onderzocht). Van één tijdpunt is bekend dat zes dagen eerder ESBL-positieve mest was uitgereden. Maar deze bacteriën zijn niet in het water teruggevonden. Bemesting met ESBL-positieve mest leidt dus niet noodzakelijkerwijs tot contaminatie van het oppervlaktewater op lokale schaal.

Droge en natte perioden

Er is ook geen duidelijk verband tussen natte perioden en de aanwezigheid van resistente bacteriën waargenomen. Zo zijn resistente bacteriën in de Groote Beerze in natte perioden (bijvoorbeeld eind mei) gevonden, maar net zo vaak in droge perioden tijdens het mestuitrijdseizoen. Wellicht is dit te verklaren doordat het tijdstip van bemesting op lokale schaal onbekend was. Het is mogelijk dat in de Groote Beerze kort voor de natte perioden weinig mest is uitgereden. Een tweede verklaring kan zijn dat mogelijke invloeden van afspoeling van landbouwgronden in natte perioden door bezinking van de bacteriën niet op langere afstanden in een oppervlaktewater zichtbaar zijn (zie metingen benedenstrooms van rwzi Vinkel in paragraaf 4.5). Ook in Piet Oberman zijn resistente bacteriën in natte en droge perioden in het mestuitrijdseizoen gevonden.

Samenvattend zijn in dit project waarschijnlijk niet alle pieken van afspoeling van landbouwgronden bemonsterd, omdat in de tijd met de vermoedelijk meest intensieve bemesting relatief weinig regen viel (vooral tussen februari en april) en omdat niet op alle regenachtige dagen monsters zijn genomen (door laboratoriumwerkzaamheden zijn monsters alleen op maandag, dinsdag en woensdag genomen).

11.2.3 Conclusie bijdrage landelijke achtergrond aan contaminatie oppervlaktewater

Uit dit onderzoek volgt dat resistente bacteriën (vooral ESBL-EC) in oppervlaktewater in landelijk gebied onder invloed van bemesting en/of veehouderijen kunnen voorkomen, maar dat landbouw vermoedelijk niet de hoofdbron van resistente bacteriën in deze oppervlaktewateren is. Maar het aantal onderzochte locaties is laag (drie) en in het onderzochte jaar vielen mogelijk weinig regendagen in de bemestingsperiode. Daardoor is niet in te schatten of de gemeten concentraties ook representatief zijn voor piekmomenten. Het advies is dan ook om op meer meetlocaties en met meer metingen aanvullend onderzoek te doen naar de aanwezigheid van resistente bacteriën. Door de piekbelastingen en de diffuse belasting van oppervlaktewater door bemesting en afspoeling van veehouderijen zijn de in dit project gemeten concentraties ook nog niet te vertalen naar totale vrachten.

11.3 Invloed gemengde riooloverstorten op resistente bacteriën in oppervlaktewater

In dit onderzoek zijn zeven verschillende overstorten onderzocht en dertien metingen gedaan (zie hoofdstuk 7).

11.3.1 Hoge prevalenties en concentraties in riooloverstorten

In alle monsters zijn de indicatorbacteriën *E. coli* en enterokokken en ook ESBL-EC gevonden. AmpR-Ent is in 86% van de monsters aangetroffen (zie tabel 7.1 in hoofdstuk 7). De concentraties ESBL-EC liggen ongeveer tien keer hoger dan in rwzi-effluent en daarmee tussen de ESBL-EC-concentraties in rwzi-influent en -effluent in. Dit is aannemelijk omdat overstortwater bestaat uit ruw afvalwater verdund met regenwater. De concentraties AmpR-Ent zijn variabel en liggen tussen een factor 1 en 100 keer de effluentconcentraties. Waarschijnlijk ligt de prevalentie van AmpR-Ent in de bevolking zo laag dat alleen enkele AmpR-Ent-dragers in de overstorten lozen. Als het aantal dragers in een gebied zeer laag wordt, zou dat tot grotere variaties in de concentraties kunnen leiden dan bij frequenter voorkomende resistente bacteriën.

11.3.2 Totale hoeveelheid bacteriën benedenstrooms riooloverstorten

Het effect van lozingen van riooloverstorten op het ontvangende oppervlaktewater kon slechts in een meting direct worden onderzocht. Dat komt doordat de meeste onderzochte overstorten randvoorzieningen hebben en/of niet extern hebben overgestort (bij locaties met monsternamekasten) of niet op het moment dat een monsternemer aanwezig was (bij handmatige bemonsteringen). Bij die ene meting vond toevallig een overstorting plaats vanuit een overstort zonder randvoorziening. In deze meting is benedenstrooms van de overstort een licht verhoogde concentratie resistente bacteriën waargenomen. De overeenstemmende ESBL-typen in het overstortmonster en in het benedenstroomse monster bevestigen de invloed van de overstort. Maar het is niet uit te sluiten dat het benedenstroomse monster tijdens deze meting ook door rwzi-effluent is beïnvloed, gezien de grote hoeveelheid afgevoerd effluent en het feit dat het effluentlozingspunt slechts enkele meters bovenstrooms van het meetpunt ligt.

11.3.3 Conclusie bijdrage gemengde riooloverstorten aan contaminatie oppervlaktewater

Zoals verwacht zijn in water afkomstig uit gemengde riooloverstorten resistente bacteriën gevonden, met concentraties tussen rwzi-influent en -effluent in. ESBL-EC is altijd aanwezig, AmpR-Ent iets minder vaak. Een mogelijke invloed van riooloverstorten op resistente bacteriën in oppervlaktewater ligt daarmee voor de hand.³

11.4 Invloed gescheiden riolering op resistente bacteriën in oppervlaktewater

11.4.1 Hogere prevalenties en concentraties in oppervlaktewater na lozing uit gescheiden riolering

In vijf wijken met gescheiden riolering zijn in totaal 86 monsters van oppervlaktewater onder mogelijke invloed van foutaansluitingen genomen, met twee monsternamen in elk gebied (zie hoofdstuk 6). Daarbij zijn regelmatig ESBL-EC en AmpR-Ent aangetroffen. In totaal is ESBL-EC in 51% van de monsters gevonden, AmpR-Ent in 22% (zie tabel 6.2 in hoofdstuk 6) en beide resistente bacteriën op 16% van de locaties (veertien van de 86). Op twee van deze locaties bestond een specifieke verdenking van foutaansluitingen, maar de meeste locaties zijn willekeurig gekozen in de gebieden met gescheiden riolering.

De concentraties liggen op de meeste locaties ongeveer zo hoog als in oppervlaktewater in landelijk gebied (rond 101 kve/l), maar in enkele monsters ($n=7$) zijn ongeveer honderd keer hogere concentraties gevonden. Dit zijn concentraties vergelijkbaar met die in rwzi-effluent. Op één locatie is de ESBL-EC-concentratie zelfs net zo hoog als in rwzi-influent. Hoge concentraties vergeleken met landelijke waarden wijzen op humane bronnen en daarmee op een invloed van foutaansluitingen in het gescheiden rioolstelsel. Maar andere dan humane bronnen zijn niet uit te sluiten, zoals afspoeling van dierlijke feces van de straat of feces van plaagdieren in het rioolstelsel.

Rol neerslag

De verwachting vooraf was dat neerslag tot hogere concentraties resistente bacteriën in oppervlaktewater in gebieden met gescheiden riolering zou kunnen leiden. Maar in dit onderzoek is geen eenduidig beeld van de rol van neerslag gevonden. In Almere en Amersfoort Nieuwland en Kattenbroek zijn duidelijk hogere concentraties gevonden op een dag met neerslag, maar in Amersfoort Vathorst en Soest was dit niet het geval.

11.4.2 Conclusie bijdrage gescheiden riolering aan contaminatie oppervlaktewater

In gebieden met gescheiden riolering zijn over het algemeen vaker resistente bacteriën gevonden dan verwacht. Ook liggen de concentraties voor een deel van de locaties op een vergelijkbaar niveau als voor rwzi-effluent en een enkele keer zelfs op het niveau van rwzi-influent. Mede daaruit en uit de relatief hoge prevalentie van AmpR-Ent vergeleken met landelijke gebieden is te concluderen dat gescheiden riolering als bron van resistente bacteriën een rol van betekenis kan spelen. Omdat de afkomst van deze resistente bacteriën niet eenduidig terug te leiden is naar mensen of andere bronnen, is het aan te bevelen de bronnen van dergelijke verontreinigingen nader te onderzoeken.

11.5 Vergelijking alle bronnen

Uit schattingen van de totale hoeveelheid resistente bacteriën geloosd met rwzi-effluenten, gemengde overstorten en foutaansluitingen blijkt dat deze drie humane bronnen op jaar-basis ongeveer een even grote bijdrage leveren aan ESBL-EC in oppervlaktewater. Onzekerheden in deze schattingen betreffen vooral de concentraties resistente bacteriën in foutaansluitingen (hier is aangenomen dat deze gelijk zijn aan concentraties in influent, dus ruw afvalwater) en concentraties in overstorten (deze schattingen zijn gebaseerd op dertien metingen in negen verschillende overstorten, die weliswaar relatief constante concentraties resistente bacteriën tonen). Hoewel veel minder water uit overstorten en foutaansluitingen het oppervlaktewater bereikt, zorgen de hogere concentraties resistente bacteriën in overstortwater en water uit gemengde systemen met foutaansluitingen voor vergelijkbaar hoge emissies als rwzi-effluenten.

De bijdrage van de diffuse bronnen (landbouw en wilde dieren) is aan de hand van de hier gerapporteerde metingen nog niet uit te drukken als totale emissie. Wel heeft dit onderzoek getoond dat concentraties in landelijke gebieden (met of zonder invloed van landbouw) lager zijn dan in oppervlaktewater direct benedenstrooms van rwzi-lozingen.

11.6 Vergelijking ESBL-EC en AmpR-Ent

De concentraties ESBL-EC liggen in afvalwater en oppervlaktewater onder invloed van rwzi-effluent ongeveer tien keer hoger dan de concentraties AmpR-Ent, beide resistente bacteriën zijn nagenoeg altijd in deze monsters gevonden. In landelijke gebieden komt AmpR-Ent duidelijk minder vaak voor dan ESBL-EC. De gemiddelden van de positieve monsters liggen voor beide bacteriën rond de detectielimiet en zijn (vermoedelijk daarom) vergelijkbaar laag. In stedelijk oppervlaktewater onder invloed van gescheiden riolering is de prevalentie van AmpR-Ent duidelijk lager dan in humaan afvalwater, maar iets verhoogd ten opzichte van dat in oppervlaktewater in landelijke gebieden. In positieve monsters zijn de concentraties ESBL-EC en AmpR-Ent vergelijkbaar.

11.7 Conclusies en uitkijk

Rwzi-effluent en gemengde overstorten

Dit project heeft laten zien dat de resistente bacteriën ESBL-EC en AmpR-Ent vaak voorkomen in rwzi-effluenten en gemengd overstortwater. De concentraties en prevalenties van AmpR-Ent zijn over het algemeen lager dan die van ESBL-EC. Uit metingen blijkt dat rwzi-effluenten de dominante bron van resistente bacteriën zijn net benedenstrooms van de effluentlozing en dat deze de concentraties resistente bacteriën in het ontvangende oppervlaktewater ook enkele kilometers verderop duidelijk kunnen verhogen. De concentraties ESBL-EC liggen in gemengd overstortwater ongeveer tien keer hoger dan in rwzi-effluent, de concentraties AmpR-Ent zijn variabel maar ten dele ook hoger dan de effluentconcentraties. Aan hand van schattingen is aangetoond dat overstorten tot lozingen van resistente bacteriën kunnen leiden, die vergelijkbaar zijn met rwzi-effluentlozingen.

Gescheiden riolering en foutaansluitingen

Resistente bacteriën zijn ook aangetroffen in stedelijk oppervlaktewater in gebieden met gescheiden riolering waar mogelijk foutaansluitingen aanwezig zijn. De totale hoeveelheid resistente bacteriën die met foutaansluitingen in het oppervlaktewater terechtkomen, kunnen volgens schattingen vergelijkbaar hoog zijn als lozingen van rwzi-effluenten. In welke mate de in deze studie aangetoonde resistente bacteriën in stedelijk oppervlaktewater in gebieden met gescheiden riolering door foutaansluitingen zijn te verklaren en in welke mate door afspoeling van dierlijke feces, is nog niet bekend. De bijdrage van foutaansluitingen zal verder onderzocht worden in een project in Almere, in een samenwerking van de gemeente Almere, Waterschap Zuiderzeeland, het RIVM en Partners4UrbanWater.

Landbouw en wilde dieren

De concentraties resistente bacteriën in oppervlaktewater in landelijke gebieden met diffuse invloeden van landbouw zijn lager dan de concentraties gemeten direct benedenstrooms van rwzi-effluentlozingen. De laagste concentraties zijn gevonden in een gebied waarin alleen invloed van wilde dieren te verwachten is (Oostvaardersplassen). De bijdrage van landbouw en wilde dieren is aan de hand van de hier gerapporteerde metingen nog niet uit te drukken als totale emissie. De bevinding dat de concentraties en prevalenties in het landelijke gebied zonder landbouw nog net iets lager zijn dan in landelijke gebieden met landbouw suggereert een geringe invloed van landbouw. Kanttekening hierbij is wel dat de metingen in de Oostvaardersplassen slechts indicatief zijn, vanwege de zeer beperkte dataset. Het verdient aanbeveling om de invloed van wilde dieren en vogels (dat wil zeggen de natuurlijke achtergrond) in de toekomst beter te onderzoeken.

De in deze studie gevonden geringe invloed van landbouw op de concentraties antibiotica-resistente bacteriën kan een onderschatting zijn. Het is immers niet uit te sluiten dat de gevonden concentraties niet representatief zijn voor piekmomenten in afspoeling van uitgereden mest en van boerenerven. Op dit moment lopen nog twee RIVM-studies die kunnen bijdragen aan een beter beeld van het effect van bemesting op resistente bacteriën in oppervlaktewater. In één studie (gefinancierd door het ministerie van VWS) worden aantallen ESBL-EC in mest bepaald en worden via modellering de vrachten geschat die op land worden gebracht en vervolgens afspoelen naar oppervlaktewater. In een tweede studie (gefinancierd door de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA)) worden aantallen ESBL-EC bepaald in een selectie van oppervlaktewater niet onder invloed van afvalwater (het Meetnet Nutriënten Landelijk Specifiek Oppervlaktewater (MNLISO)).

12 Literatuur

- Anastasiou, I. and Schmitt, H. (2011). *Hospital-associated Enterococcus faecium in the water chain Association of River Waterworks - RIWA*.
- Blaak, H. et al. (2014). "Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants." *Vet Microbiol* 171(3-4): 448-59.
- Blaak, H. et al. (2015). "Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment." *PLoS One* 10(8): e0135402.
- Costa, da P.M. et al. (2007). "Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients." *Vet Microbiol* 120(1-2): 122-31.
- Fierer, N. et al. (2005). "Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays." *Appl Environ Microbiol* 71(7): 4117-20.
- Heuer, H. and Smalla, K. (2007). "Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months." *Environ Microbiol* 9(3): 657-66.
- Heuer, H. et al. (2008). "Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil." *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1892-1900.
- Iseppi, R. et al. (2015). "Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats." *New Microbiol* 38(3): 369-78.
- Knapp, C.W. et al. (2010). "Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions." *Environ Pollut* 158(5): 1506-12.
- Novais, C. et al. (2013). "Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment." *J Antimicrob Chemother* 68(12): 2746-54.
- Sadowy, E. and Luczkiewicz, A. (2014). "Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin." *BMC Microbiol* 14: 66.
- Schijven, J.F. et al. (2015). "Fate of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Faecal Sources in Surface Water and Probability of Human Exposure through Swimming." *Environ Sci Technol* 49(19): 11825-33.
- Schmitt, H. et al. (2017). *Bronnen van antibioticaresistentie in het milieu en mogelijke maatregelen*. RIVM Rapport. Bilthoven, RIVM, 2017-0058.
- Veldman, K. et al. (2017). *MARAN 2017*, Central Veterinary Institute of Wageningen University and Research Centre.
- Walsh, F. et al. (2011). "Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems." *J Microbiol Methods* 86(2): 150-5.
- Willems, R.J. and Schaik, van W. (2009). "Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen." *Future Microbiol* 4(9): 1125-35.

Dankwoord

In dit project hebben verschillende instellingen intensief samengewerkt. Voor de zeer prettige samenwerking willen we de volgende mensen in het bijzonder bedanken:

Voor het beschikbaar stellen van monsterlocaties en monsternameapparatuur: Wim van der Hulst (Waterschap Aa en Maas), Oscar van Zanten (Waterschap De Dommel), Frans de Bles en Richard van Hoorn (Waterschap Vallei en Veluwe) en Joan Meijerink en Melanie Kuiper (Waterschap Zuiderzeeland).

Voor hulp met de monsternamekasten en het inregelen van de monstername:

- Vinkel: Thijs van Osch en Vincent Smits (Waterschap Aa en Maas).
- Groote Beerze: Peter van Dijk en Han van Happen (Waterschap De Dommel).
- Rwwi Zeewolde en Piet Oberman: Martijn Jansen, Willem de Vries en Gerrit Bultman (Waterschap Zuiderzeeland).
- Gemeente Rheden: Jacques Quaadvlieg, Henk Nijenhuis en Peter van Wieren.
- Gemeente Harderwijk: Mahatma Geerdink en Johan Dirksen.
- Rwwi Harderwijk: Alfred van Essen.

Ook de labmedewerkers en studenten die hebben meegewerkt aan monstername en -bewerking (ook als de overstortingen op vrijdag rond 17:00 uur plaatsvonden, terwijl de monsters binnen 24 uur in het lab verwerkt moesten zijn), willen we hartelijk bedanken: Siegfried de Wind, Daisy de Vries, Nena Burger, Dominique Narain, Alex Criado Monleon, Lianne Kerkhof en Sharona de Rijk.

Summary

Background and rationale

The usage of antibiotics in human health care and in livestock farming has led to the development of bacteria that are resistant to antibiotics. Certain forms of resistance occur naturally in bacteria, but newly developed resistances are also found in bacteria that were previously sensitive. Resistant bacteria can be found in patients in healthcare institutions and among the general population, in farm animals and pets. Recently, certain resistant bacteria were also detected in wastewater treatment plants (WWTPs) and surface water, both in the Netherlands and well as in other countries. Because these studies were focused on a few specific sources (wastewater treatment plants or livestock farms), the relative contribution of different sources to the introduction of resistant bacteria into the aquatic environment is not yet known. In addition, it is not precisely known in how far the presence of resistant bacteria in Dutch surface water leads to adverse health outcomes. However, knowledge about the importance of different sources is necessary in order to make informed choices about the use of possible intervention measures, with the aim to reduce the emissions of resistant bacteria to the environment.

Research question

Here we investigate the contribution of different human sources to the introduction of resistant bacteria into surface water, namely sewage effluent, mixed overflows, and faulty joints in areas with separate sewers. These are compared with rural background as influenced by run-off of manure-fertilized farmland, run-off from livestock farms, or from wild animals. This project focuses on two types of resistant bacteria: Extended Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) and ampicillin-resistant enterococci (AmpR-Ent). ESBL-EC belong to the most relevant category of resistant bacteria for which the development of new antibiotics is needed according to the WHO, and are found in humans and farm animals. AmpR-Ent are mainly found in hospital patients.

Approach

This research was conducted at various research locations, which were repeatedly measured over a period of more than a year. At least one of the sources mentioned above was studied per location. At some of the locations, 'source measurements' were carried out in order to describe the distribution of concentrations of resistant bacteria in the sources (in overflows and in WWTP effluents). At other locations the concentrations were investigated in surface water under the influence of a single (diffuse) source (rural background in the Groote Beerze and in the area Piet Oberman, the influence of faulty connections in separate sewage systems in a number of municipalities, and the influence of wild birds in the Oostvaardersplassen). In some locations (Groote Beerze and Groote Wetering, two rivers in Brabant) 'effect measurements' are carried out: concentrations and types of resistant bacteria were compared between locations downstream and upstream from the discharge point of effluent of a wastewater treatment point. On the basis of the measured concentrations and the water volumes, total loads of resistant bacteria were determined. As far as possible, sampling was performed by use of flow-proportional sampling equipment. Sampling was performed during wet and dry periods, and in months with and without application of manure.

Influence of WWTP

During 'source measurements' in effluents of 100 WWTPs that were sampled once, the resistant bacteria ESBL-EC and AmpR-Ent were found in almost all samples, in concentrations of approximately 2×10^3 cfu/l ESBL-EC and 2×10^2 cfu/l AmpR-Ent. In the Groote Beerze and Groote Wetering, where the influence of effluent discharge on the receiving surface water system was examined by means of repeated measurements ($n = 24$), resistant bacteria were found more often downstream of the discharge point (ESBL-EC in all samples, AmpR-Ent in 56 -100% of the samples) than in upstream samples. At a short distance from the effluent discharge, the bacterial load was almost entirely determined by the WWTP effluent. An influence of WWTP discharge on the concentrations of the indicator bacteria *E. coli* and enterococci was observed up to a distance of several kilometers.

Influence of overflow

ESBL-EC and AmpR-Ent were found in all resp. 86% of the examined overflow samples (n = 13 from 6 overflows, most of them taken from flow storage facilities of the overflows). The concentrations of ESBL-EC were approximately 10x higher than the concentrations measured in WWTP effluent, the concentrations of AmpR-Ent were more variable but some were also higher than the effluent concentrations.

Rural background including agriculture

The rural background of concentrations of resistant bacteria in surface water was investigated in the Groote Beerze and in the Groote Wetering (in measurements upstream of the WWTP, where possible sources of resistant bacteria include runoff of fertilized agricultural land and of livestock farms, in addition to wild birds) and at Piet Oberman (where run-off of fertilized agricultural land, run-off from one livestock farm, wild birds and IBAs can play a role). ESBL-EC were found in 32-56% of the samples in the three regions, and AmpR-Ent in 0-6% of the samples (n = 47). The concentrations in the rural background samples from the Groote Beerze and the Groote Wetering were approximately 10-100 times lower than in the same areas downstream the discharge of WWTP effluent. A clear influence of rainfall was not observed, possibly related to the fact that manure fertilization had not taken place before or during wet periods, or that the manure did not always contain resistant bacteria. The measurements performed were not sufficient to determine peak loads (expected after rainy days shortly after fertilization with manure containing resistant bacteria).

Influence of faulty connections in areas with separate sewers

In areas with separate or improved separate sewerage, where rainwater drainage is separated from sewage drainage, faulty connections can occur. In that case, raw waste water can enter the surface water directly through the rainwater drainage. In several districts in Almere, Amersfoort and Soest with separated or improved separate sewerage, surface water that was possibly under the influence of faulty connections was investigated (n = 86, distributed over several measurement moments and districts). ESBL-EC and AmpR-Ent were found in 51% and 22% of the urban surface water samples. In most cases, the concentrations were comparable to concentrations measured in rural areas, despite lack of influences from manure or farms. In a few samples, however, much higher concentrations were found, concentrations comparable to WWTP effluent and even influent. In some of the municipalities investigated, the concentrations were higher after precipitation than during dry weather, but a clear effect of precipitation was not found in all areas.

Influence of wild animals (rural background excluding agriculture)

The influence of wild animals was investigated at the outflow point of the surface water of the Oostvaardersplassen. This was only possible in the winter months, because no outflow from the area took place in the summer and the Oostvaardersplassen were not publicly accessible. ESBL-EC was detected in 3 out of 6 measurements, AmpR-Ent were not detected. The ESBL-EC concentrations were just above the detection limit

Comparison of all sources

The total annual Dutch emissions of resistant bacteria through the routes of wastewater effluent, mixed overflows and faulty connections were estimated by combining total volumes and concentrations measured in WWTP effluents and overflows as well as estimates of concentrations in rainwater drainage due to faulty connections. Despite the total volumes of overflows and faulty connections being much lower, the estimated total emissions of ESBL-EC through these routes are in the same order of magnitude as the emissions with WWTP effluent (3×10^{15} (8×10^{14} - 2×10^{16}) cfu / year). Although much less overflow water and contaminated rainwater reaches the surface water, the higher concentrations of resistant bacteria result in similarly high discharges as with WWTP effluents.

The contribution of the diffuse sources (run-off from fertilized soils, animal farms and grazing animals as well as from and wild animals) can not (yet) be aggregated into total national emissions, despite the measurements reported here. In surface water under the influence of diffuse rural sources (run-off from fertilized agricultural land and livestock farms and wild animals) resistant bacteria are found less frequently, and the concentrations found are lower than in surface water under the influence of sewage effluent. It is still unknown whether peak loads after fertilization can temporarily and locally lead to higher concentrations.

The prevalence and concentrations of AmpR-Ent are generally lower than the concentrations of ESBL-EC, which is probably due to the fact that these occur less often in humans and rarely in farm animals.

Conclusions

This project has shown that the resistant bacteria ESBL-EC and AmpR-Ent often occur in WWTP effluents and in stormwater overflow. The concentrations and prevalence of AmpR-Ent are generally lower than those of ESBL-EC. WWTP effluents were shown to significantly increase the concentrations of resistant bacteria in the receiving surface water on a scale of several kilometers. The concentrations of resistant bacteria in surface water in areas with diffuse influences from agriculture were lower than concentrations measured directly downstream discharges of WWTP effluent. The lowest concentrations were measured in areas with wild animals. Estimates have shown that mixed overflows and faulty connections can lead to annual emissions of resistant bacteria that are comparable to the emissions of WWTP effluents.

STOWA en Stichting RIONED in het kort

Stichting RIONED is de koepelorganisatie voor de riolering en het stedelijk waterbeheer in Nederland. In RIONED participeren alle partijen die bij de rioleringszorg betrokken zijn: overheden (gemeenten, waterschappen, rijk en provincies), bedrijven (leveranciers, adviesbureaus, inspectiebedrijven en aannemers) en onderwijsinstellingen. De belangrijkste taak van Stichting RIONED is het beschikbaar stellen van kennis aan de vakwereld. Dit doet RIONED door onderzoek, het bundelen van bestaande kennis en het op vele manieren informeren en bij elkaar brengen van professionals.

STOWA is het kenniscentrum van de regionale waterbeheerders (veelal de waterschappen) in Nederland. STOWA ontwikkelt, vergaart, verspreidt en implementeert toegepaste kennis die de waterbeheerders nodig hebben om de opgaven waar zij in hun werk voor staan, goed uit te voeren. Deze kennis kan liggen op toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied.

© 2018 Stichting RIONED en STOWA

Teksten en figuren uit dit rapport mogen alleen worden overgenomen met bronvermelding.

Disclaimer

Deze uitgave is met de grootst mogelijke zorg samengesteld. Niettemin aanvaarden de auteurs en de uitgever geen enkele aansprakelijkheid voor mogelijke onjuistheden of eventuele gevolgen door toepassing van de inhoud van deze publicatie.

auteurs

Hetty Blaak (RIVM), Remy Schilperoort (Partners4UrbanWater) en Heike Schmitt (IRAS en RIVM)

omslagfoto

Hetty Blaak (RIVM)

vormgeving

Jeroen Brugman, gaw ontwerp+communicatie b.v., Wageningen

druk

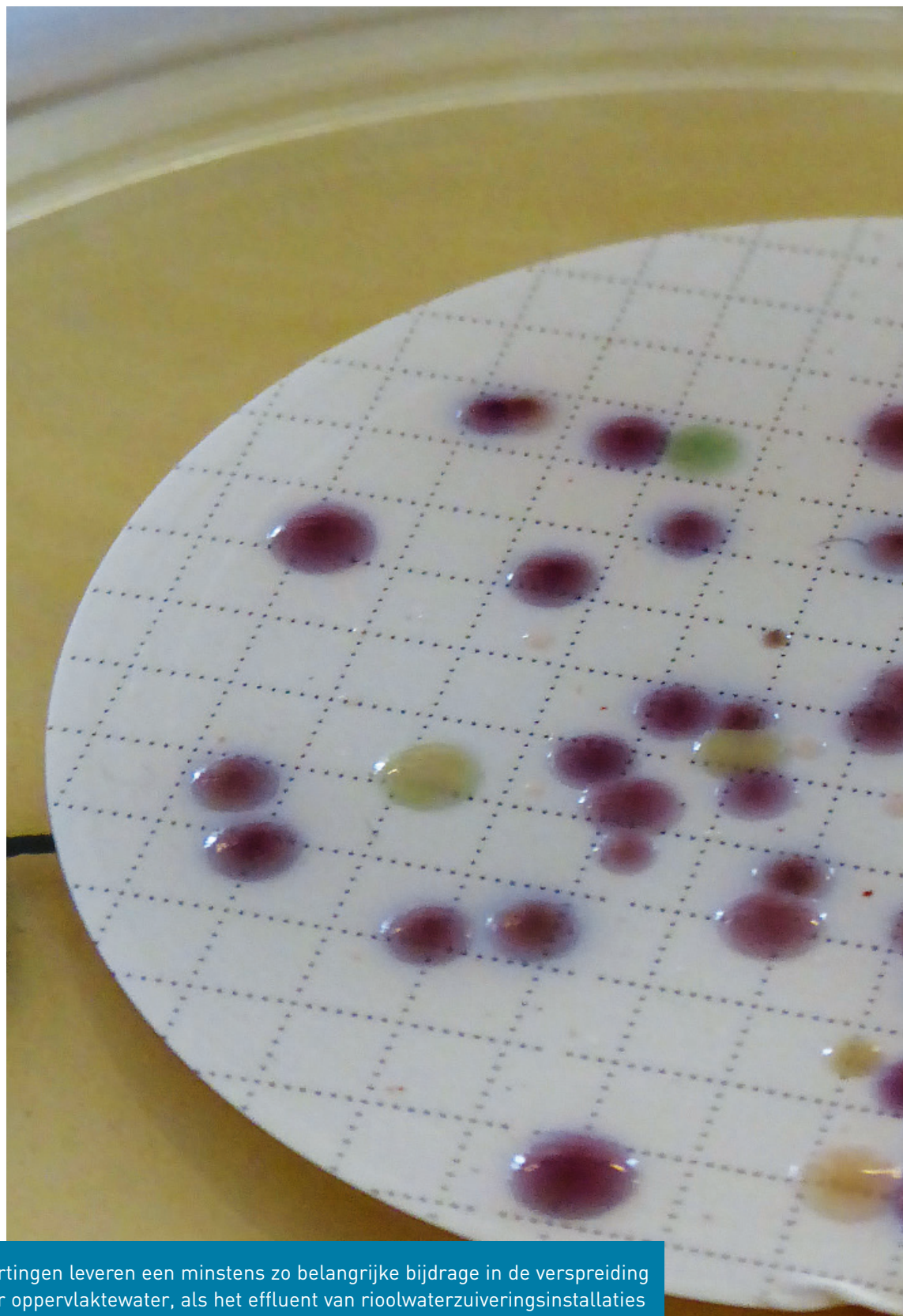
Drukkerij Modern, Bennekom

rapportnummer

2018-11

isbn/ean

978 90 5773 783 1



Foutaansluitingen en overstortingen leveren een minstens zo belangrijke bijdrage in de verspreiding van antibioticaresistentie naar oppervlaktewater, als het effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's). De kans op blootstelling aan antibioticaresistentie lijkt daarnaast bij oppervlaktewater in de woonomgeving groter dan bij de lozingslocaties van rwzi's. Alertheid is op zijn plaats.