stowa

VERWIJDERING VAN ANTIBIOTICA-RESISTENTIE BIJ VERGAANDE ZUIVERINGSTECHNIEKEN

INNOVATIE PROGRAMMA MICROVERONTREINIGINGEN UIT RWZI-AFVALWATER (IPMV)

RAPPORT 2024 30

stowa

VERWIJDERING VAN ANTIBIOTICARESISTENTIE BIJ VERGAANDE ZUIVERINGSTECHNIEKEN

INNOVATIE PROGRAMMA MICROVERONTREINIGINGEN UIT RWZI-AFVALWATER (IPMV)

RAPPORT 2024 30

ISBN 978.94.6479.087.0

stowa@stowa.nl www.stowa.nl
TEL 033 460 32 00
Stationsplein 89 3818 LE Amersfoort
POSTBUS 2180 3800 CD AMERSFOORT

Publicaties van de STOWA kunt u gratis downloaden via www.stowa.nl/publicaties

COLOFON

Amersfoort, oktober 2025

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

AUTEURS Imke Leenen (H2Oké Water & Gezondheid Advies)
Bas van der Zaan (KWR)
Heike Schmitt (RIVM)

BEGELEIDINGSCOMMISSIE
Cora Uijterlinde (STOWA)
Mirabella Mulder (Mirabella Mulder Waste Water Management)
Ruud Schemen (Waterschap de Dommel)
Christa Morgenschweis (Waternet)
Maarten Nederlof (Waterschap Rijn en IJssel)
Roger Vingerhoeds (Waterschap Brabantse Delta)
Wim van der Hulst (Waterschap Aa en Maas)
Anouk Koelen (Waterschap Vechtstromen)
Anja Derksen (AD eco advies)

VORMGEVING Buro Vormvast
STOWA STOWA 2024-30
ISBN 978.94.6479.087.0

De inhoud van deze uitgave is met de grootst mogelijke zorg samengesteld. Niettemin aanvaarden de auteurs en de uitgever geen enkele aansprakelijkheid voor mogelijke onjuistheden in de publicatie, of eventuele gevolgen door toepassing van de inhoud ervan.
STOWA spant zich in de rechthebbenden van in de uitgave gebruikte afbeeldingen te respecteren conform het auteursrecht. Indien u desondanks van mening bent dat uw rechten in het geding zijn, dan verzoeken wij u contact met ons op te nemen.

TEN GELEIDE

De meeste vergaande zuiveringstechnieken voor organische microverontreinigingen (waaronder geneesmiddelen) verwijderen geen antibioticaresistente bacteriën en/of genen, of slechts in beperkte mate. Bronaanpak heeft de voorkeur.

Het onderzoek naar verwijdering van antibioticaresistente bacteriën bij vergaande zuiveringstechnieken is uitgevoerd in het kader van het Innovatieprogramma Microverontreinigingen uit rwzi-afvalwater (IPMV). In de periode 2019-2023 is binnen het IPMV een aantal innovatieve technieken verkend op haalbaarheid en, indien kansrijk, opgeschaald naar een pilot. In 12 van de in totaal 15 pilot onderzoeken is naast de verwijdering van medicijnresten aanvullend ook de verwijdering van antibioticaresistentie onderzocht. Ter referentie zijn ook drie demonstratie installaties onderzocht die zijn uitgerust met een (voor medicijnresten) bewezen effectieve vergaande zuiveringstechniek.

Omdat het aantal bemonsterde locaties en het aantal herhalingen per techniek beperkt is moeten de resultaten als indicatief beschouwd worden en kunnen slechts met de nodige voorzichtigheid naar andere locaties worden door vertaald.

Uit het onderzoek komt naar voren dat onder de geteste procescondities de verwijdering van antibioticaresistentie in de meeste gevallen nihil of beperkt is. Echter de filtratietechnieken (nano- of microfiltratie) bleken in staat om antibioticaresistente bacteriën tot onder de detectielimiet te verwijderen. De onderzochte technieken met ozon bleken alleen antibioticaresistentie deels te verwijderen bij doseringen hoger dan 0,45 g ozon/g DOC.

Bij de keuze voor een techniek voor vergaande zuivering van rwzi-effluent is de mate van verwijdering van antibioticaresistentie één van de factoren om mee te wegen indien het effluent gebruikt wordt voor bijvoorbeeld zwem- of recreatiewater of als irrigatiewater voor de land- en tuinbouw.

Mark van der Werf
Directeur STOWA

SAMENVATTING

Antibioticaresistentie is een wereldwijd groeiend probleem en er zijn diverse verspreidingsroutes, waarbij ook water een rol speelt. 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. Door veelvoudig gebruik van antibiotica kunnen bacteriën die vroeger goed te behandelen waren ongevoelig worden voor antibiotica. Dan wordt zo'n bacterie 'antibioticaresistent' genoemd. De huidige rioolwaterzuiveringen verwijderen lang niet alle antibioticarestente bacteriën, genen en ziekteverwekkers: vergaande zuivering van afvalwater kan een aangrijpingspunt zijn om de emissie terug te brengen.

In het vijfjarige Innovatieprogramma Microverontreinigingen uit rwzi-afvalwater (IPMV) zijn een groot aantal innovatieve technieken onderzocht op hun effectiviteit in het verwijderen van medicijnresten. Of deze technieken ook in staat zijn antibioticaresistentie (antibioticaresistente bacteriën en resistentiegenen) te verwijderen is onderzocht door middel van een monitoringcampagne op de diverse pilots van het IPMV en enkele demonstratie installaties met (voor medicijnresten bewezen effectieve) vergaande zuiveringstechnieken.

Het doel is het vergaren en verbreden van kennis van het effect van toepassing van zuiveringstechnieken op de aanwezigheid en verwijdering van antibioticaresistente bacteriën en genen.

De resultaten van de meetcampagne moeten als indicatief beschouwd worden en kunnen niet een op een naar andere locaties door vertaald worden: er zijn maar een beperkt aantal locaties bemonsterd en het aantal herhalingen per techniek en/of instelling is beperkt: de rwzi's zijn 1 tot 10 keer bemonsterd, elke instelling maximaal 2 keer.

RESULTATEN

- In alle onderzochte rwzi-effluenten zijn hoge aantallen antibioticaresistente bacteriën (in dit onderzoek ESBL) en *E. coli* aangetroffen (2,5-4,5 log).
- De analyse van *E. coli* is eenvoudiger en goedkoper dan antibiotica resistente bacteriën. In deze studie is onderzocht of de verwijdering van E. coli een maat kan zijn voor de verwijdering van antibioticaresistente bacteriën (in dit onderzoek ESBL). In deze studie zijn de gevonden waarden van *E. coli* ongeveer 2 factoren hoger dan die van ESBL. Deze verhouding blijft gelijk na de zuiveringsstap, onafhankelijk van de soort techniek. Deze resultaten geven aan dat de verwijdering van *E. coli* vergelijkbaar is met de verwijdering van ESBL bij vergaande zuiveringen, en daarom als indicator gebruikt kan worden. Voor andere resistente bacteriën is de relatie ten aanzien van *E.coli* niet onderzocht, maar is mogelijk ook vergelijkbaar.
- De zuiveringstechnieken met actief kool verwijderen onder de in dit onderzoek geteste procescondities geen of nauwelijks antibioticaresistente bacteriën en genen. Ozon verwijdert beperkt, terwijl nanofiltratie meerdere log-eenheden reduceert.
- De technieken gebaseerd op adsorptie (Poeder actief kool en granulair actief kool en overige materialen) verwijderen, zoals verwacht, nagenoeg geen ESBL en resistentiegenen. De gevonden verwijderingrendementen waren voornamelijk rond de 0 tot 0,5 logeenheid en in lijn met de waarden gevonden in de literatuur.

- De onderzochte pilots met technieken met ozon hadden voornamelijk een relatief lage dosis (<0,45 g O_3/g DOC) en verwijderden nagenoeg geen antibioticaresistente bacteriën (< 1 log-eenheid), bij de enkele pilots met een hogere dosis is de verwijdering iets hoger voor de antibioticaresistente bacteriën (2-4 log), maar was het effect op de resistentiegenen lager tot maximaal 1,5 log.
- Beide onderzochte filtratietechnieken in deze studie (nanofiltratie en keramische microfiltratie) verwijderen ESBL en E.coli tot onder de detectielimiet, waardoor het echte verwijderingsrendement niet goed is vast te stellen. De log-verwijdering is meer dan 4 log-eenheden voor *E. coli* en meer dan 2 logeenheden voor ESBL. Nanofiltratie (alle geteste poriegroottes) en het filterdoek zijn effectieve methodes om ESBL te verwijderen.
- In deze studie lijkt voor de verwijdering van resistentiegenen nanofiltratie effectiever dan microfiltratie, afhankelijk van de poriegrootte.
- De bevindingen bevestigen de verwachtingen ten aanzien van de technieken onder de geteste procescondities.

AANBEVELINGEN

- Aanbevolen wordt om bij her/gebruik van rwzi-effluent aandacht te hebben voor de gezondheidsrisico's bij het direct gebruik hiervan, omdat er pathogenen en antibioticaresistentie in rwzi-effluent aanwezig zijn. Een aanvullende zuivering is dan, afhankelijk van de toepassing, noodzakelijk. Let hierbij ook op bypasses.
- Als er aanleiding is, meet *E.coli* om een indruk te krijgen van de aanwezigheid van antibiotica resistentie
- Om de conclusies uit dit onderzoek ten aanzien van effecten van zuiveringstechnieken op de verwijdering van antibioticaresistentie te verifiëren is uitgebreidere monitoring van verschillende technieken wenselijk.

STOWA IN HET KORT

KENNIS OVER WATER, VOOR NU ÉN LATER

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer – kortweg STOWA – is het kennisplatform van regionale waterbeheerders in Nederland. Vanuit ons kantoor in Amersfoort werken we aan het ontwikkelen, verzamelen, verspreiden en implementeren van toegepaste kennis. Die kennis hebben waterbeheerders nodig om de opgaven waar zij voor staan, goed uit te kunnen voeren. Of het nu gaat om klimaatadaptatie (zowel stedelijk als landelijk gebied), een goede waterkwaliteit, duurzame en effectieve afvalwaterzuivering, veilige dijken en kaden, energietransitie of circulaire economie.

Het soort kennis dat wij ontwikkelen, is breed: technisch en natuurwetenschappelijk, maar soms ook bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk. Om te zorgen dat die kennis maximaal kan worden toegepast in de praktijk, presenteren we onze onderzoeksresultaten indien mogelijk in de vorm van praktische handreikingen, tools en instrumenten. Ook faciliteren we met het oog op kennisdoorwerking Communities of Practice en organiseren we daarvoor allerlei bijeenkomsten en webinars. Via onze eigen en andermans media geven we uitleg over de achtergronden bij ons werk.

STOWA werkt vraaggestuurd. We inventariseren welke kennisvragen waterbeheerders hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers: universiteiten, kennisinstituten, kennisbedrijven of adviesbureaus. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van gezamenlijke kennisprojecten op ons. Maar wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook 'eigenaar' van zijn. Dit om te waarborgen dat de projectresultaten de deelnemers praktische handelingsperspectieven bieden. Ieder project wordt om die reden begeleid door een commissie waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoekslijnen worden vastgesteld door programmacommissies, waar waterbeheerders ook zitting in hebben.

STOWA is onafhankelijk, onpartijdig en transparant. De afnemers van onze kennis moeten erop kunnen vertrouwen dat de inhoud van onze rapporten objectief en representatief is. Alleen zo kan onze kennis worden ingezet voor beter waterbeheer en innovaties die antwoord geven op de uitdagingen van vandaag en morgen. Het is aan waterbeheerders te bepalen hoe ze de kennis van STOWA in de praktijk gebruiken.

STOWA is een stichting die de richtlijnen volgt voor organisaties zonder winstoogmerk (RJ-640). In ons jaarverslag is daarom naast een cijfermatige jaarrekening ook een directieverslag opgenomen over de stichting en haar activiteiten. Het budget bedraagt jaarlijks ongeveer 20 miljoen euro. Onze deelnemers leggen gezamenlijk ieder jaar ongeveer 10 miljoen in als structurele bijdrage. Daarnaast ontvangen we jaarlijks ongeveer 10 miljoen euro in de vorm van bijdragen aan afzonderlijke projecten.

VERWIJDERING VAN ANTIBIOTICA-RESISTENTIE BIJ VERGAANDE ZUIVERINGSTECHNIEKEN

INNOVATIE PROGRAMMA MICROVERONTREINIGINGEN UIT RWZI-AFVALWATER (IPMV)

INHOUD

TEN GELEIDE
SAMENVATTING
STOWA IN HET KORT

1 INLEIDING 1
1.1 Aanleiding 1
1.2 Doel en afbakening 1
1.3 Leeswijzer 2

2 ANTIBIOTICARESISTENTIE IN WATER 3
2.1 Wat is antibioticaresistentie? 3
2.2 Antibioticaresistentie in (riool)water? 4
2.3 Relevante antibioticaresistentie bacteriën in (riool)water? 5

3 OPZET ONDERZOEK 6
3.1 Opzet op hoofdlijnen in (riool)water 6
3.2 Onderzochte demo installaties (referentietechnieken) 7
3.3 Beschrijving onderzochte pilots 8
3.3.1 Adsorptie aan Poeder Actief Kool (PAK) 8
3.3.2 Adsorptie aan Granulair Actief Kool (GAK) 9
3.3.3 Alternatieve adsorptiematerialen 11
3.3.4 Oxidatieve technieken 13
3.3.5 Filtratietechnieken in combinatie met oxidatie 15
3.4 Bemonstering en logistiek 16
3.5 Uitgevoerde analyses en interpretatie 16
3.6 Verwachte resultaten 19

4 RELATIE *E.COLI* EN ANTIBIOTICARESISTENTE BACTERIËN IN RWZI-AFVALWATER 21
4.1 Vergelijking analysemethode voor *E.coli* 21
4.2 Relatie tussen *E. coli* en antibioticaresistente bacteriën (ESBL) 21

5		PRESTATIES ZUIVERINGSTECHNIEKEN	23
	5.1	Adsorptie aan Poeder Actief Kool (PAK)	23
	5.2	Adsorptie aan Granulair Actief Kool (GAK)	25
	5.3	Adsorptie aan overige niet-fossiele materialen	27
	5.4	Oxidatieve technieken	29
	5.5	Filtratietechnieken in combinatie met oxidatie	33
	5.6	Demo-installaties	34
6		CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	36
	6.1	Representativiteit van de resultaten	36
	6.2	Verwijdering van antibioticaresistentie door vergaande zuiveringstechnieken	36
	6.3	Relatie *E.coli* en antibioticaresistente bacteriën in rwzi-afvalwater	37
	6.4	Slotopmerkingen	37
	6.5	Aanbevelingen	38
7		LITERATUUR	39
BIJLAGE I		RELATIE TWEE ANALYSEMETHODEN E. COLI	40

1

INLEIDING

1.1 AANLEIDING

Recent is er veel aandacht voor het verwijderen van organische microverontreinigingen (micro's), waaronder medicijnresten, uit afvalwater, onder ander binnen de 'Ketenaanpak medicijnresten', ondersteund door het ministerie van IenW en door STOWA. Hiervoor zijn de afgelopen jaren innovatieve geavanceerde technieken getest in pilotprojecten binnen het Innovatieprogramma Microverontreinigingen uit rwzi-afvalwater IPMV. Daarnaast worden bestaande, bewezen technieken zoals ozondosering of poederkool (PACAS) op full-scale getest en geoptimaliseerd in demonstratie-installaties in een speciaal versnellingsprogramma.

De bestaande veldstudies zijn meestal beperkt tot één kleinschalige (lab)installatie, één procesinstelling en één type afvalwater. De resultaten van de verwijderingsefficiëntie van resistente bacteriën en genen in de verschillende typen installaties zijn daarom vaak niet goed te vergelijken.

De vraag is op welke wijze de onderzochte technologieën voor vergaande verwijdering van microverontreinigingen kunnen bijdragen aan vermindering van antibioticaresistente bacteriën en genen. Deze rapportage heeft als doel om hier inzicht in te geven. Door dit project te koppelen aan de al lopende pilots en demo's binnen het IPMV en het Versnellingsprogramma, is op enkele locaties onderzocht of en in welke mate er sprake is van afname van antibioticaresistentie.

1.2 DOEL EN AFBAKENING

Antibioticaresistentie is een wereldwijd groeiend probleem en er zijn diverse verspreidingsroutes, waarbij ook water een rol speelt. De huidige rioolwaterzuiveringen verwijderen weinig tot geen antibioticaresistentie bacteriën, genen en ziekteverwekkers: vergaande zuivering van afvalwater kan een aangrijpingspunt zijn om de emissie terug te brengen.

Het doel van deze rapportage is het vergaren en verbreden van kennis van het effect van toepassing van zuiveringstechnieken voor vergaande verwijdering van organische micro's op de aanwezigheid en verwijdering van antibioticaresistente bacteriën en genen. Dit onderzoek richt op de effectiviteit van verschillende bestaande en te ontwikkelen technieken in het IPMV-programma.

Doel van het onderzoek is het vergaren en verbreden van de kennis over:

- De verwijdering van antibioticaresistente bacteriën (ABR) en genen door zuiveringstechnieken voor vergaande verwijdering van microverontreinigingen uit rwzi-effluent
- De potentie van de verwijdering van *E. coli* als maat/indicatie voor de verwijdering van antibioticaresistente bacteriën.
- Dit rapport geeft conclusies en aanbevelingen over de mate waarin de nu bekende (innovatieve) technologieën voor vergaande verwijdering van microverontreinigingen kunnen bijdragen aan de verwijdering van AMR in rwzi-effluent.

- Het onderzoek is nadrukkelijk een verkenning naar het effect van zuiveringstechnieken. De verschillende technieken zijn op een beperkt aantal locaties onderzocht en met een beperkt aantal monsters. Generieke conclusies kunnen daarom slechts met de nodige voorzichtigheid en voorbehouden getrokken worden.

1.3 LEESWIJZER

In hoofdstuk 2 wordt ingegaan op antibioticaresistentie in water. De opzet van het onderzoek wordt beschreven in hoofdstuk 3. In dit hoofdstuk worden tevens de onderzochte pilots kort toegelicht. In hoofdstuk 4 wordt onderzocht of de verwijdering van *E. coli* een goede indicator is voor de verwijdering van antibioticarestente bacteriën. De resultaten van de vergaande zuiveringstechnieken voor antibioticaresistente bacteriën en genen worden uitgewerkt en bediscussieerd in hoofdstuk 5 De conclusies en aanbevelingen tenslotte staan in hoofdstuk 6.

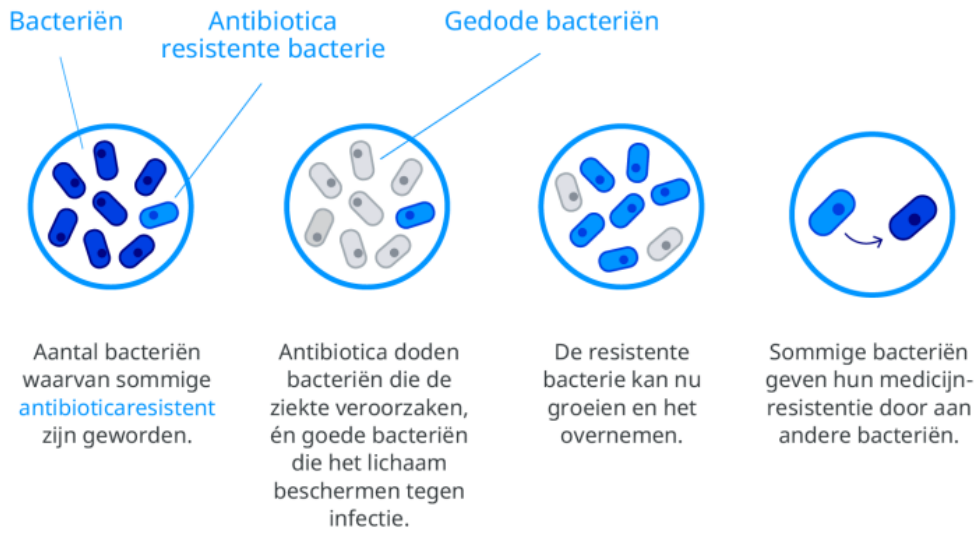
2

ANTIBIOTICARESISTENTIE IN WATER

2.1 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. Door veelvoudig gebruik van antibiotica kunnen bacteriën die vroeger goed te behandelen waren ongevoelig worden voor antibiotica. Dan wordt zo'n bacterie 'antibiotica-resistent' genoemd. Antibioticaresistentie (zie figuur) wordt overgedragen door celdeling of door het doorgeven van resistentiegenen. Genoverdracht vindt vaak plaats in systemen met hoge dichtheden van micro-organismen, waar de kans hoger is dat geschikte organismen dicht bij elkaar komen.

Figuur 2.1 **Hoe ontstaat antibioticaresistentie?**



Een infectie met een resistente bacterie kan moeilijker te behandelen zijn dan een infectie met een niet-resistente bacterie. In het ergste geval zijn bacteriën tegen zo veel antibiotica tegelijk resistent geworden (multiresistentie) dat infecties met dergelijke bacteriën niet meer te behandelen zijn. 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. 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 ziekenhuis-patiënten) kan dit tot infecties met resistente bacteriën leiden.

2.2 ANTIBIOTICARESISTENTIE IN (RIOOL)WATER?

Met humane en dierlijke feces kunnen resistente bacteriën het oppervlaktewater bereiken. In Nederland is dit aangetoond in diverse typen oppervlaktewater (Leenen, 2015; Blaak et al., 2018), waaronder officiële zwemlocaties (Blaak et al., 2014), oppervlaktewater onder directe invloed van veehouderijen (Blaak et al., 2015) en oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor irrigatie.

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 intestinale enterococcen 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 antibioticaresistente bacteriën via zwemmen mogelijk is (Schijven et al., 2015). Dat deze resistente bacteriën 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 voor de meeste resistente bacteriën nog niet bekend is. Voor een bepaalde resistente bacterie, Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) *E. coli*, werd gevonden dat regelmatige blootstelling door zwemmen in oppervlaktewater tot een hogere dragerschap leidt in vergelijking met de algemene bevolking (RIVM rapport 2019-0113).

De meeste humane antibioticaresistente bacteriën en genen zullen via feces in het rioolwater terecht komen en dus getransporteerd worden naar de rwzi en via het effluent in het oppervlaktewater terecht komen. Veterinaire antibioticaresistentie zal voornamelijk via af- of uitspoeling van mest of afvalwater uit mestverwerkingsbedrijven in het oppervlaktewater terecht komen.

Ook het STOWA/Rioned onderzoek (Blaak et al, 2018) heeft aangetoond dat resistente bacteriën vaak en in hoge mate voorkomen in rwzi-effluenten en overstorten. Rwzi-effluenten kunnen de concentraties resistente bacteriën in het ontvangende oppervlaktewater binnen een schaal van enkele kilometers duidelijk 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 resultaten gaven verder aan dat gemengde overstorten en foutaansluitingen kunnen leiden tot jaarlijkse emissies van resistente bacteriën die vergelijkbaar zijn met de emissies van rwzi-effluenten.

Rioolwaterzuiveringsinstallaties zijn niet ontworpen, en daardoor onvoldoende in staat, om antibioticaresistentie te verwijderen, waardoor rwzi-effluenten een belangrijke bron zijn van antibioticaresistente bacteriën en genen in het oppervlaktewater. Geavanceerde zuiveringstechnieken kunnen resistente bacteriën en genen mogelijk (gedeeltelijk) verwijderen.

2.3 RELEVANTE ANTIBIOTICARESISTENTIE BACTERIËN IN (RIOOL)WATER?

Bepaalde antibioticaresistente 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).

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

Er zijn geen normen voor antibioticaresistente bacteriën en/of genen in water. Ook voor andere pathogenen zijn deze er sporadisch. Wetgeving waar indicatoren van pathogenen worden meegewogen in water zijn:

- Europese zwemwaterrichtlijn, waar *E. coli* en intestinale enterococcen als indicatoren voor fecale verontreiniging en dus kans op ziekte wordt genormeerd. Afhankelijk van de klasse zwemwater (uitstekend, goed, aanvaardbaar) is er een norm voor deze bacteriën. In Nederland hanteren we een waarde van 1800 kve/100 ml als richtwaarde voor een overschrijding en er een acuut gezondheidsrisico is.
- De EU verordening voor gebruik van stedelijk effluent voor de landbouw (Verordening EU 2020/741), waarin per klasse gewas (bv wel/niet rauw gegeten) gekoppeld aan de irrigatiemethode een normering voor *E. coli* is opgenomen tussen de 10 (rauw geconsumeerd en contact met water) en 10.000 kve/100ml (gewassen die behandeld worden). zijn aanvullende eisen bij rauw gewassen en aerosolvormende irrigatie. Daarnaast is het verplicht om een risicobeheerplan te maken.

Rwzi's zijn niet gedimensioneerd om pathogenen te verwijderen. Over het algemeen worden bacteriën tussen de 1 en 2 log verwijderd (dus 90-99%) en voor virussen is dit nog lager. Als effluent gebruikt zou worden voor klasse 2 van de verordening dan is daar maximaal 100kve/100 ml inzetten. Dat betekent een benodigd verwijderingsrendement van 5 tot 6 log-eenheden voor *E. coli.*

3

OPZET ONDERZOEK

3.1 OPZET OP HOOFDLIJNEN IN (RIOOL)WATER

Het onderzoek naar de verwijdering van antibioticaresistentie bij vergaande zuiveringstechnieken is uitgevoerd bij de pilotinstallaties uit het IPMV-programma. Het IPMV-programma was een 5-jarig programma dat liep van 1 januari 2019 tot en met 31 december 2023 (zie https://www.stowa.nl/sites/default/files/assets/PUBLICATIES/Publicaties%202019/STOWA%202019-12%20innovatieprogramma.pdf). Het doel van het programma was om technologieën voor de verwijdering van microverontreinigingen uit rwzi-effluent te ontwikkelen of bestaande technieken te verbeteren, die ten opzichte van bewezen technieken voor verwijdering van microverontreinigingen uit rwzi-afvalwater (anno 2019) een significante verbetering kunnen geven op het gebied van kosten, CO_2-voetafdruk of effluentkwaliteit. Daarnaast is er aandacht besteed aan de mogelijke bijvangst, zoals een verbetering van de verwijdering van stikstof, fosfaat, PFAS en microplastics, vermindering van antibioticaresistentie en pathogenen en het hergebruik van effluent.

Daarnaast zijn ter referentie drie demo installaties uit het Versnellingsprogramma Medicijnresten uit rwzi-afvalwater onderzocht (MinIenW, 2023). Demo installatie zijn uitgerust met — voor wat betreft de verwijdering van medicijnresten - bewezen technieken. De bewezen technieken betreffen ozon (met een dosering van 0,7 g O_3/g DOC), PACAS (met een dosering van 15 mg PAK/l) en GAK (met een standtijd van 4 maanden). Ten aanzien van ozon en GAK waren alle pilots uit het IPMV-programma gericht op een verlaging van de ozondosering en een verlenging van de standtijd van het GAK. In het onderzoek naar de verwijdering van antibioticaresistentie zijn drie demo installaties onderzocht: twee met ozon en een met PACAS.

De achtergrond, doelen en opzet van het IPMV-programma zijn in meer detail beschreven in het evaluatierapport van het programma (Clevering-Loeffen et al., 2024). In het kader van het onderzoek naar de verwijdering van antibioticaresistentie bij vergaande zuiveringstechnieken zijn 10 rwzi's en 15 (combinaties van) technieken onderzocht. Het betreft 12 pilotopstellingen en 3 demo installaties. In tabel 1 is samengevat welke technieken en rwzi's zijn onderzocht. Niet alle pilots uit het IPMV-programma konden onderzocht worden op de verwijdering van antibioticaresistentie omdat een aantal pilots reeds afgerond was bij aanvang van het antibioticaresistentie onderzoek. De technieken zijn ingedeeld in een aantal hoofdgroepen. De resultaten van het onderzoek zullen worden besproken aan de hand van deze indeling. Combinatietechnieken zijn in meerdere hoofdgroepen opgenomen en komen dan ook meerdere keren terug in de bespreking.

In paragraaf 3.2 en 3.3 en tabel 3.1 worden de onderzochte pilot- en demo installaties kort beschreven.

Tabel 3.1 Indeling van de onderzochte technieken. Combinatietechnieken komen meerdere keren terug

Principe / Technologie	Subcategorie	Opmerking	Rwzi	Antibiotica-resistentie?
Pilot installaties				
1. Adsorptie aan Poeder Actiefkool (PAK)				
PAK +doek			Vinkel	nee
PACAS Nereda			Simpelveld	ja
PAK+O_3		ook bij oxidatie	Leiden Noord	ja
2. Adsorptie aan Granulair Actiefkool (GAK)				
O_3-STEP	niet belucht	ook bij oxidatie	Horstermeer	ja
Continue upflow GAK	niet belucht		Hapert	ja
BODAC+O_2	belucht		Emmen	ja
Bio-GAK + lucht	belucht		Emmen	ja
Aurea (BO_3)	belucht	ook bij oxidatie	Horstermeer	ja
3. Adsorptie aan overige niet-fossiele materialen				
DEXfilter			Lelystad	ja
AdOx			Leiden Noord	ja
4. Oxidatieve technieken				
ZF+UV/H_2O_2			Aarle Rixtel	nee
O_3+Ultrasound			Winterswijk	nee
O_3-STEP	combinatie van oxidatie en actief kool	ook bij GAK	Horstermeer	ja
PAK+O_3	combinatie van oxidatie en actief kool	ook bij PAK	Leiden Noord	ja
Microforce	combinatie van oxidatie en biologische afbraak		Walcheren	ja
Aurea (BO_3)	combinatie van oxidatie en biologische afbraak, belucht GAK	ook bij GAK	Horstermeer	ja
NF+H_2O_2	combinatie van oxidatie en filtratie	ook bij filtratie	Asten	ja
O_3+keramischeMF	combinatie van oxidatie en filtratie	ook bij filtratie	Wervershoof	ja
5. Filtratietechnieken in combinatie met oxidatie				
NF+H_2O_2		ook bij oxidatie	Asten	ja
O_3+keramischeMF		ook bij oxidatie	Wervershoof	ja
Demo installaties				
PACAS			Leipan Noord	ja
Ozon			Houten	ja
Ge(o)zond			Wervershoof	ja

3.2 ONDERZOCHTE DEMO INSTALLATIES (REFERENTIETECHNIEKEN)

Om de innovatieve technologieën te kunnen vergelijken met de huidige praktijk, zijn drie technieken als referentietechnieken gesteld (Clevering-Loeffen et al., 2024). Deze zijn reeds op praktijk schaal toegepast in Nederland of in Europa:

- PACAS, ofwel: Powder Activated Carbon in Active Sludge. Hierbij wordt actief kool in poedervorm gedoseerd in de bestaande actief-slibtanks van een rwzi en samen met de daar aan gebonden microverontreinigingen met het slib afgevoerd naar de slibeindverwerking.
- Ozonisatie. Hierbij worden microverontreinigingen afhankelijk van de dosering geheel of gedeeltelijk afgebroken door het doseren van ozon (O_3).
- GAK, ofwel: Granulair Actief Koolfiltratie. Hierbij adsorberen microverontreinigingen aan granulair actief kool in een nageschakeld filter.

Van deze drie technieken zijn alleen PACAS en ozonisatie meegenomen in het onderzoek naar antibioticaresistentie. Het PACAS proces is onderzocht bij rwzi Leiden Noord. Ozonbehandeling is onderzocht bij rwzi Houten en rwzi Wervershoof.

De PACAS installatie bij rwzi Leiden Noord wordt beschreven in paragraaf 3.3.1, waarbij in beide zuiveringstraten poederkool is gedoseerd. De ozoninstallatie bij Wervershoof wordt ook beschreven in paragraaf 3.3.4, waarbij in de demo installatie geen keramische microfiltratie is uitgevoerd. De ozonbehandeling bij rwzi Houten betreft een nageschakelde ozonbehandeling.

3.3 BESCHRIJVING ONDERZOCHTE PILOTS

De technologieën zijn in het evaluatierapport (Stowa 2024-28) beschreven en onderling vergeleken. De technieken zijn onderverdeeld in hun werkingsprincipes. Een aantal technieken valt onder meerdere werkingsprincipes en wordt op meerdere momenten met verschillende andere technologieën vergeleken. Alle rapportages van de individuele pilotonderzoeken zijn beschikbaar via https://www.stowa.nl/onderwerpen/waterkwaliteit/nieuwe-stoffen/innovatieprogramma-microverontreinigingen-uit-rwzi-afvalwater-ipmv#2246

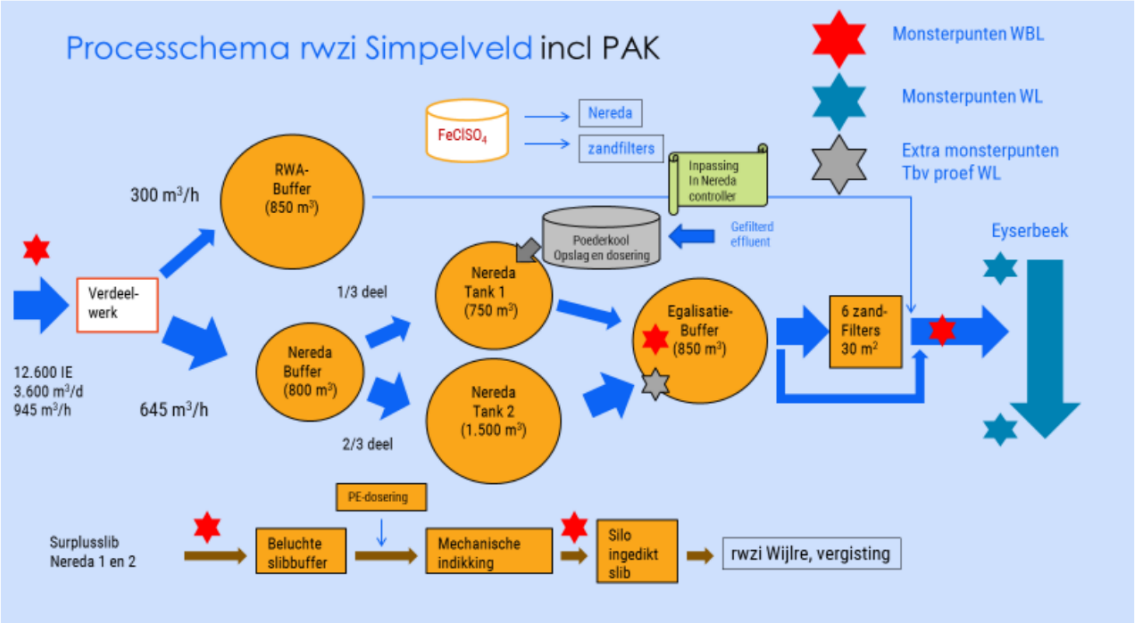
3.3.1 ADSORPTIE AAN POEDER ACTIEF KOOL (PAK)

Actief kool is een beproefde techniek voor de verwijdering van microverontreinigingen. Bij PACAS wordt actief kool in poedervorm gedoseerd in de bestaande actief-slibtanks van een rwzi en samen met de daar aan gebonden microverontreinigingen met het slib afgevoerd naar de slibeindverwerking.

PACAS-NEREDA (RWZI SIMPELVELD)

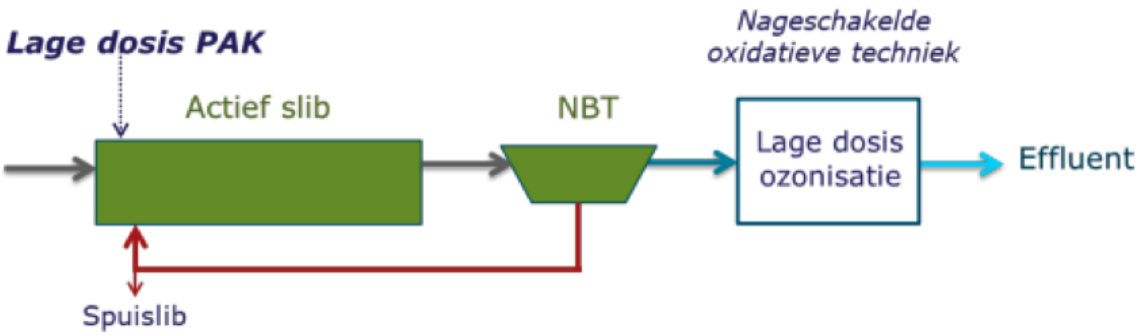
Bij PACAS Nereda wordt poederkool gedoseerd in een korrelslibreactor (Nereda) in plaats van een conventioneel actief slibsysteem. De microverontreinigingen worden gebonden aan de poederkool en worden daarna samen met het spuislib uit de Nereda afgevoerd via de reguliere slibroute (gisting, ontwatering, droging en verbranding). De dosering is 20 mg PAK/l influent.

Om het effect van de PACAS dosering te kunnen vaststellen worden de concentraties in het effluent van de PACAS-Nereda (1/3 van het behandelde debiet) vergeleken met het effluent van de Nereda in de referentiestraat (2/3 van het behandelde debiet). Deze monsterpunten zijn *niet* in het processchema weergegeven.



PAK+O_3 (RWZI LEIDEN NOORD)

PAK+O_3 is een technologie waarbij poederactiefkool (PAK) in het actiefslibproces gedoseerd wordt én het effluent met ozon wordt behandeld. Een PACAS met lagere dosering en een nageschakelde ozonisatie met een lage specifieke ozon dosis. Door gebruik te maken van twee reactiemechanismen, adsorptie en oxidatie, kunnen beide mechanismen in minder intensieve vorm worden bedreven dan wanneer deze als individuele technologie (stand-alone) worden toegepast. In deze pilot waren de gebruikte doseringen 7,5 mg PAK/l influent en 0,05 g O_3/g DOC.

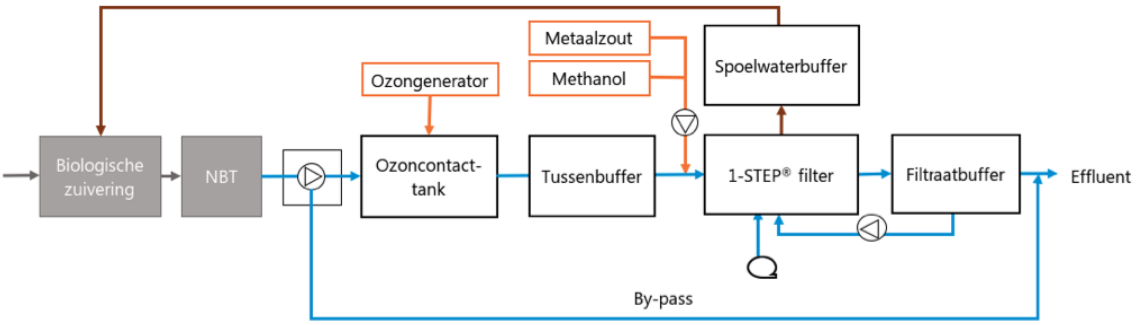


3.3.2 ADSORPTIE AAN GRANULAIR ACTIEF KOOL (GAK)

Granulair actief kool (GAK) bestaat uit korrels die in een koolfilter achter een bestaande zuivering wordt geplaatst voor adsorptie van microverontreinigingen. Het is mogelijk om het verzadigde GAK te regenereren. Daarnaast kunnen op het granulaire kool bacteriën groeien, die mogelijk microverontreinigingen afbreken. Binnen de IPMV zijn verschillende optimalisaties onderzocht, zowel met als zonder beluchting.

O3-STEP (RWZI HORSTERMEER)

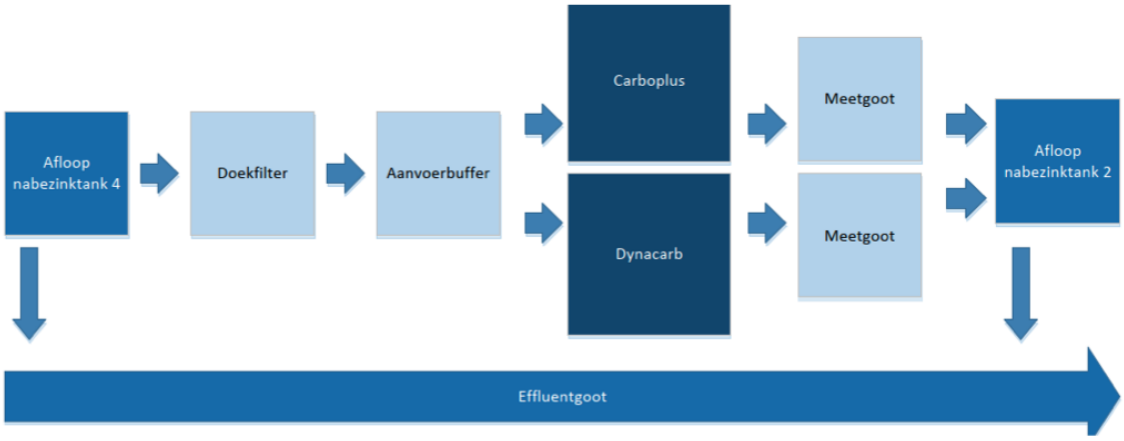
Op rwzi Horstermeer is voor het eerst in 2012 een full scale granulair actiefkool filter gebouwd, een filter dat in één stap zowel fosfaat, stikstof als microverontreinigingen verwijdert door toevoeging van methanol en metaalzouten. Vandaar de naam '1- STEP filter'. In de praktijk blijkt dat het 1- STEP filter effectief, maar dat de standtijd voor verwijdering van microverontreinigingen kort is. Al na drie maanden neemt het verwijderingsrendement voor microverontreinigingen sterk af, hoewel er nog steeds vergaand nutriënten worden verwijderd. Voor een goede verwijdering van microverontreinigingen moet de kool daarom relatief snel worden geregenereerd. Bij de binnen het IPMV onderzochte O3-STEP pilot is voorafgaand aan het 1-STEP filter een ozonisatiestap toegevoegd om organische microverontreinigingen gedeeltelijk te oxideren. De beoogde voordelen t.o.v. de referentie zijn onder andere een hoger en breder verwijderingsrendement van microverontreinigingen en een verhoging van de standtijd van het actief kool. De ozondosering bedroeg 0,4 gO_3/gDOC. Sinds 2024 is op RWZI Horstermeer een fullscale O3-STEP in bedrijf



UPFLOW GAK (RWZI HAPERT)

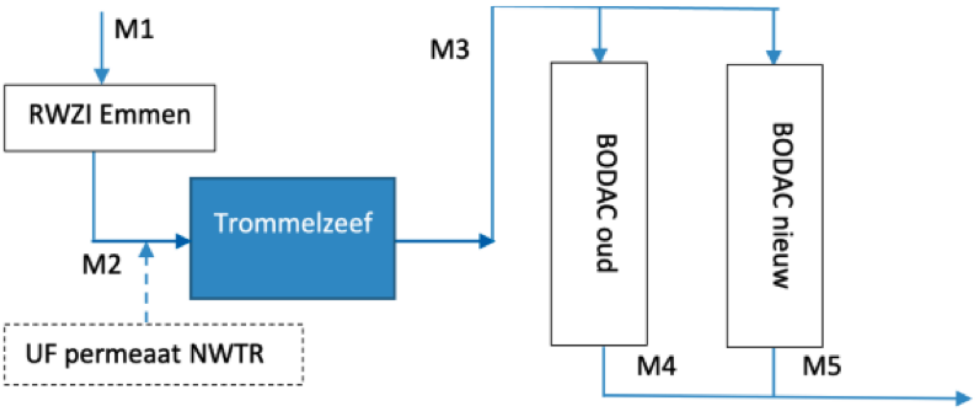
In tegenstelling tot het conventionele GAK-filter wordt het Upflow-GAK-filter van onder naar boven doorstroomd. Door de opwaartse stroming is het actief kool in beweging met als resultaat beter contact tussen actief kool en het water. Hierdoor zou een beter verwijderingsrendement gehaald kunnen worden.

De Carboplus is een gefluïdiseerd bed actief kool filter, waar meerdere malen per week, afhankelijk van de behandelde hoeveelheid (afval)water, vers actief kool wordt toegevoegd en beladen kool wordt onttrokken. Hierdoor kan het filter continu worden bedreven. De Dynacarbon is een moving bed reactor, waar eenmalig actief kool in wordt gebracht dat met een mammoetpomp continu wordt gewassen. Beide pilots werden bedreven met reeds gereactiveerde kool.



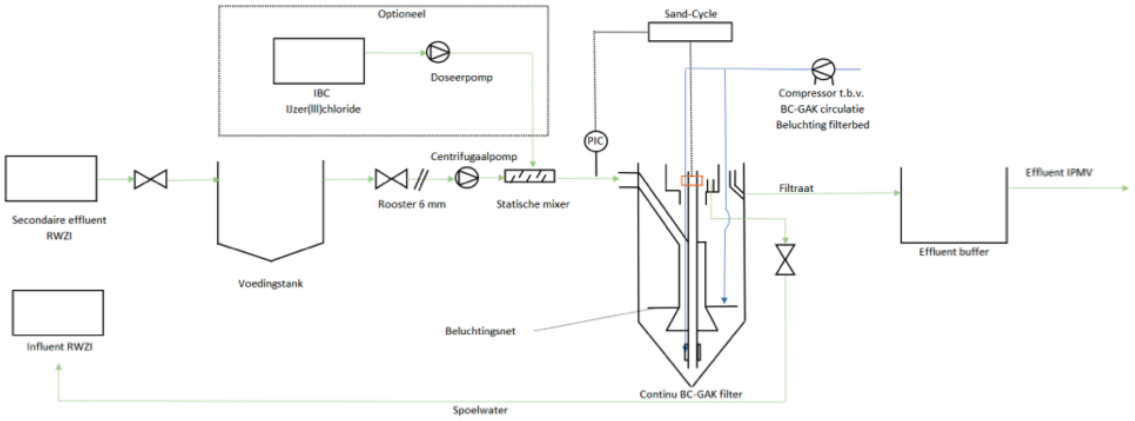
BODAC+O_2 (RWZI EMMEN)

BODAC staat voor Biological Oxygen-Dosed Active Carbon. De pilot BODAC-installatie bestaat uit twee parallel opgestelde actief kool filtratiestappen. Het ene filter is gevuld met reeds verzadigde BODAC GAK (BODAC oud), terwijl het andere filter gevuld is met vers GAK. Aan het influent van beide filtratiestappen wordt zuivere zuurstof gedoseerd. Bij biologische actief koolfiltratie ontwikkelt zich een biofilm op het actief kool, waardoor zowel biologische afbraak als adsorptie van microverontreinigingen plaatsvindt. Door biologische afbraak worden geadsorbeerde microverontreinigingen afgebroken wat leidt tot bioregeneratie van de actieve kool. Hierdoor wordt minder GAK verbruikt. Voor het antibioticaresistente onderzoek zijn beide GAK filters (oud en nieuw) apart onderzocht.



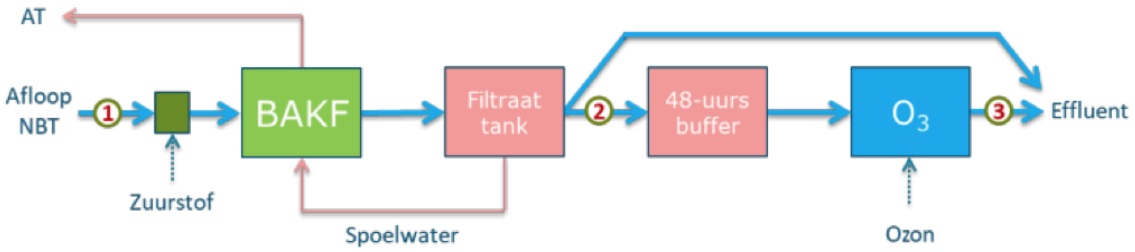
BIO-GAK (RWZI EMMEN)

Dit betreft een continue bedreven opwaarts doorstroomt GAK-filter wat actief belucht wordt. In de pilot is het concept van continufiltratie met een filtervulling van vers granulair actief kool onderzocht voor de verwijdering van microverontreinigingen. Door de beluchting wordt de groei van bacteriën op de actief kool bevorderd, wat bij kan dragen aan de verwijdering van microverontreinigingen. Daardoor wordt de standtijd van de actief kool verlengd.



BO3 (RWZI HORSTERMEER)

De BO_3 (ook wel Aurea technologie genoemd) is een tweestapsproces bestaande uit respectievelijk biologische actief- koolfiltratie (een vorm van GAK) en ozon behandeling voor verregaande verwijdering van microverontreinigingen. In de eerste stap worden in een zuurstofrijk milieu organische stoffen biologisch (gedeeltelijk) afgebroken. In de tweede stap wordt ozon gedoseerd. Door de (gedeeltelijke) afbraak in de eerste stap kan worden volstaan met een lage ozondosering. Er zijn drie verschillende ozonbehandelingen getest: 0,1 gO_3/gDOC, 0,2 gO_3/gDOC en 0,4 gO_3/gDOC.



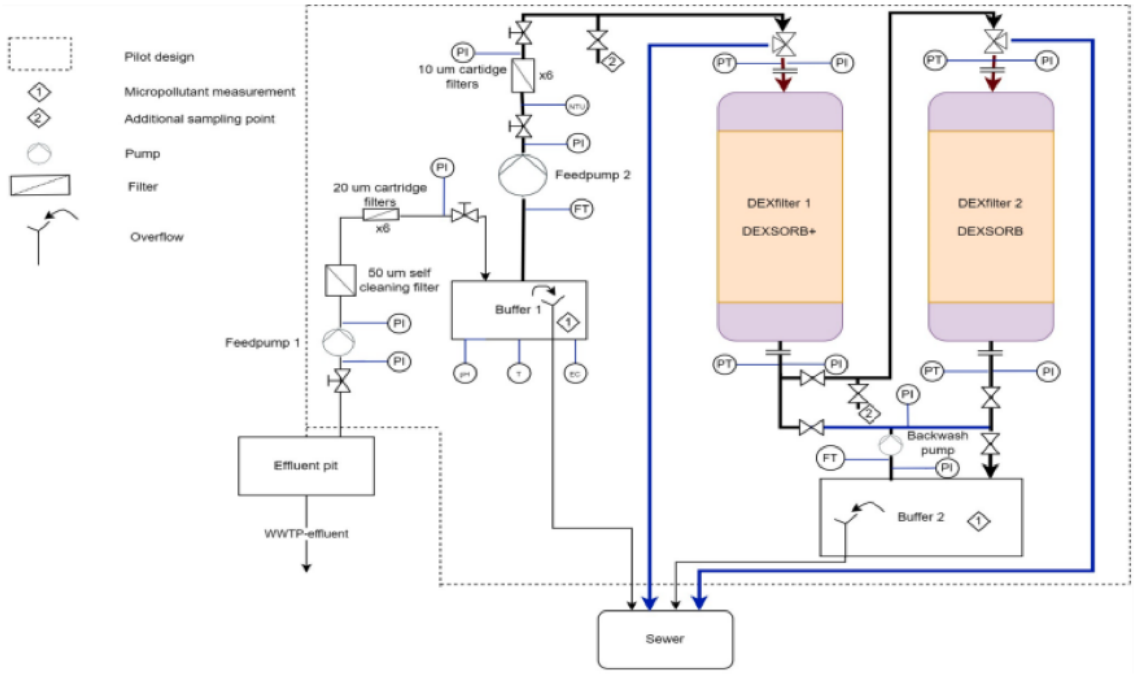
De 48-uurs buffer in de figuur heeft enkel betrekking op de pilot-installatie en is geen onderdeel van een praktijkinstallatie.

3.3.3 ALTERNATIEVE ADSORPTIEMATERIALEN

Actief kool is doorgaans van fossiele oorsprong (steenkool of bruinkool). De uitdaging is om het actief kool duurzamer te gaan produceren, bijvoorbeeld door actief kool van biologische oorsprong te gebruiken (met een lagere CO2-voetafdruk), dan wel te vervangen door alternatieve adsorptiemiddelen, zoals cyclodextrines of zeoliet. Beide genoemde alternatieven zijn onderzocht.

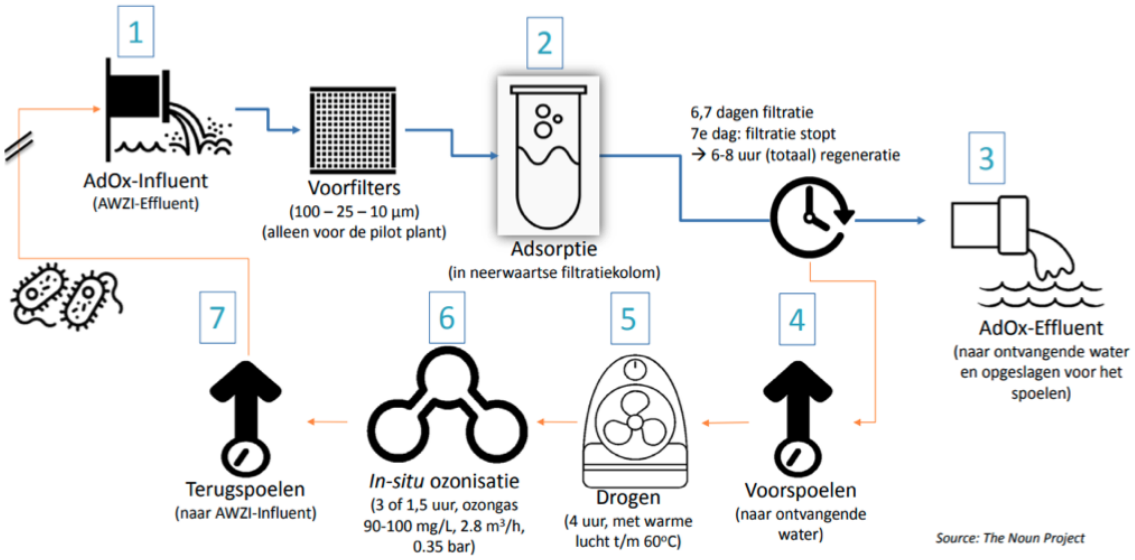
DEX-FILTER (RWZI LELYSTAD)

DEXSORB is de merknaam voor cyclodextrines geproduceerd door CycloPure voor toepassing in waterbehandeling. Cyclodextrines zijn ringvormige moleculen, opgebouwd uit suikers. Ze vormen een soort cupjes met een positieve of negatieve lading waar de microverontreinigingen aan kunnen adsorberen door een combinatie van elektrostatische-, hydrofobe interacties en een uitsluitingsmechanisme op basis van molecuulgrootte. De adsorbens kan on-site op kamertemperatuur worden geregenereerd met methanol.



ADOX-FILTER (RWZI LEIDEN NOORD)

AdOx is een adsorptie-oxidatie proces voor de verwijdering van organische microverontreinigingen. AdOx maakt gebruik van high-silica zeolieten in korrelvorm in een neerwaarts doorstroomde vastbed reactor. In deze adsorptiekolom worden microverontreinigingen uit het afvalwater geadsorbeerd. Na verzadiging van de adsorptiekolom wordt deze in-situ geregenereerd met ozongas. Met dit proces wordt een selectieve verwijdering van microverontreinigingen gerealiseerd, natuurlijk organisch materiaal (NOM) wordt niet geadsorbeerd. De beoogde voordelen van gecombineerde adsorptie met zeolieten en in-situ regeneratie met ozon zijn: geen vorming van bij- en nevenproducten zoals bromaat in het behandelde rwzi-effluent doordat geen ozon gedoseerd wordt in de hoofdstroom en weinig transportbewegingen door in-situ regeneratie. Tevens wordt geen ozon gebruikt voor oxidatie van NOM omdat NOM niet adsorbeert aan de zeolieten. Hiermee is ook het ozon verbruik laag ten opzichte van ozon technieken waarbij ozon ingebracht wordt in het afvalwater.



3.3.4 OXIDATIEVE TECHNIEKEN

Er bestaat een scala aan zogenoemde oxidatieve zuiveringstechnieken voor de behandeling van rwzi-afvalwater. De microverontreinigingen worden hierbij afgebroken, ze blijven niet intact zoals bij adsorptie- en filtratietechnieken. Deze afbraak vindt geen volledige mineralisatie tot CO_2 plaats, maar worden allerlei afbraakproducten (transformatieproducten) gevormd. Deze zijn vaak, maar niet altijd, minder toxisch dan de microverontreinigingen waaruit ze gevormd zijn. Daarnaast kunnen uit andere organische en anorganische componenten in het rwzi-effluent (de matrix) andere oxidatie nevenproducten worden gevormd. Een voorbeeld daarvan is bromaat.

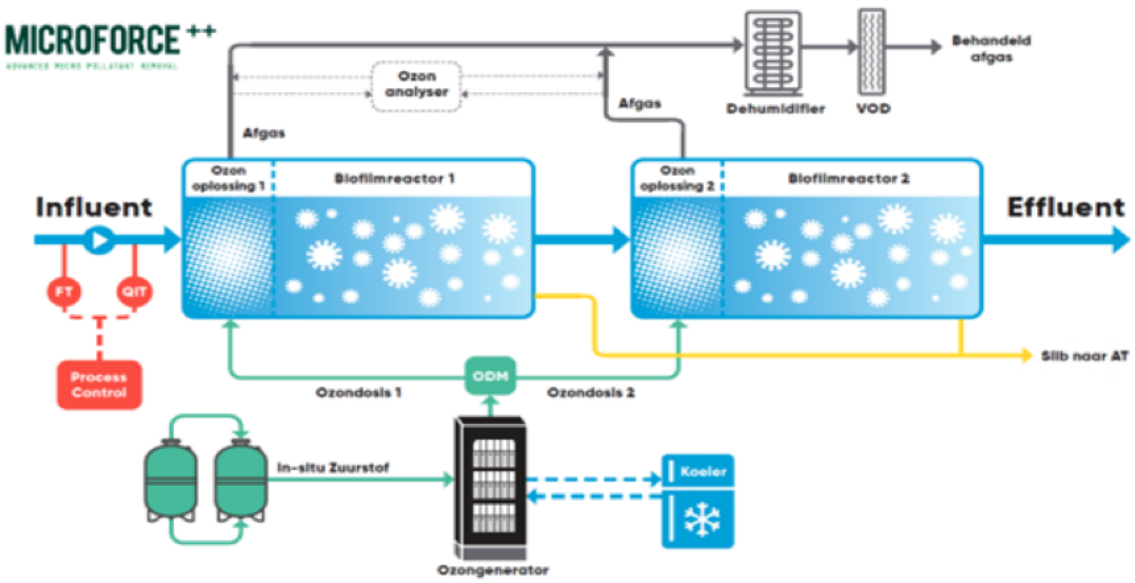
Ozonisatie (het doseren van O_3) wordt het vaakst toegepast als oxidatieve techniek. Naast ozonisatie kunnen andere technologieën worden toegepast, bijvoorbeeld UV-licht in combinatie met waterstofperoxide.

De combinatie technologieën O_3-STEP en PAK-O_3 en BO_3 zijn reeds beschreven in paragraaf 3.3.2, 3.3.1 en 3.3.2. De andere oxidatieve technieken (Microforce, nanofiltratie met UV/H_2O_2 en ozon + keramische microfiltratie) worden hier beschreven.

MICROFORCE (RWZI WALCHEREN)

MicroForce++ staat voor ozonisatie en biologische oxidatie. Het MicroForce++ proces bestaat uit twee opeenvolgende, in serie geschakelde O_3/Bioreactoren waarbij in elke O_3/Bioreactor een specifieke ozondosis wordt gehanteerd. In iedere reactor wordt het effluent eerst behandeld met ozon in het ozoncompartiment, gevolgd door een biologische reactor met een biofilm-op-drager technologie waar verdere afbraak plaatsvindt. Door de combinatie met een biologische stap is minder ozondosering nodig.

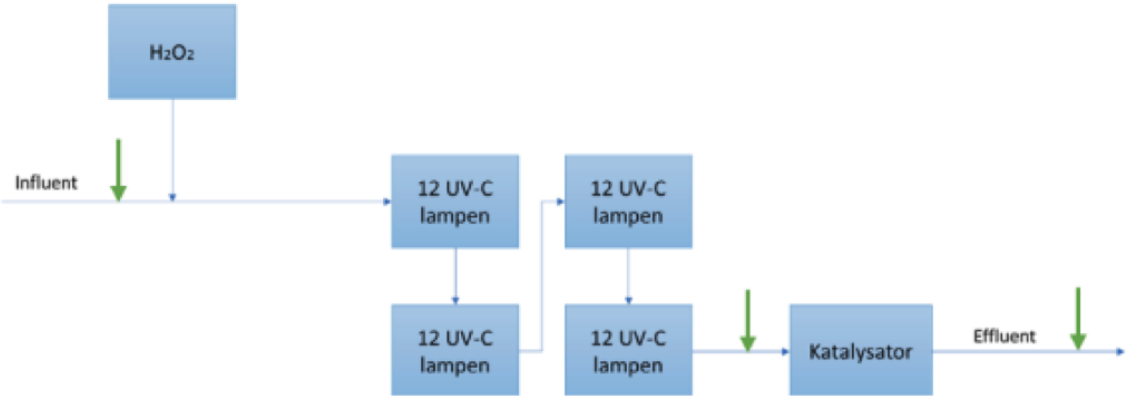
In het onderzoek naar de verwijdering van antibioticaresistentie is maar één bioreactor onderzocht omdat de tweede bioreactor ten tijde van het onderzoek niet goed functioneerde. De ozondosering bedroeg 0,43 gO_3/gDOC.



NANOFILTRATIE + UV/H_2O_2 (RWZI ASTEN)

Bij deze techniek wordt nanofiltratie gecombineerd met UV/ H_2O_2 behandeling. In deze paragraaf wordt gefocust de UV/ H_2O_2 behandeling. Bij de oxidatieve techniek UV in combinatie met waterstofperoxide (H_2O_2) wordt eerst H_2O_2 (in overmaat) gedoseerd, waarna dit wordt bestraald door UV licht (golflengte 254 nm). Door de bestraling van H_2O_2 worden hydroxylradicalen geproduceerd. Niet alle H_2O_2 wordt verbruikt. Om te voorkomen dat het resterende H_2O_2 met het effluent op het oppervlaktewater wordt geloosd wordt het water door een katalysatorbed gevoerd. Hier wordt het resterende H_2O_2 katalytisch omgezet in H_2O en O_2 (water en zuurstof). Bij deze techniek treden drie reacties op, namelijk (1) fotolyse, (2) oxidatie met hydroxylradicalen en (3) oxidatie met H_2O_2. Hierdoor kan naar verwachting een bredere range aan stoffen worden afgebroken. Doordat de nanofiltratiemembranen de “kleurcomponenten” verwijderen neemt de UV-transmissie van het water aanzienlijk toe, waardoor behandeling met UV efficiënt kan plaatsvinden.

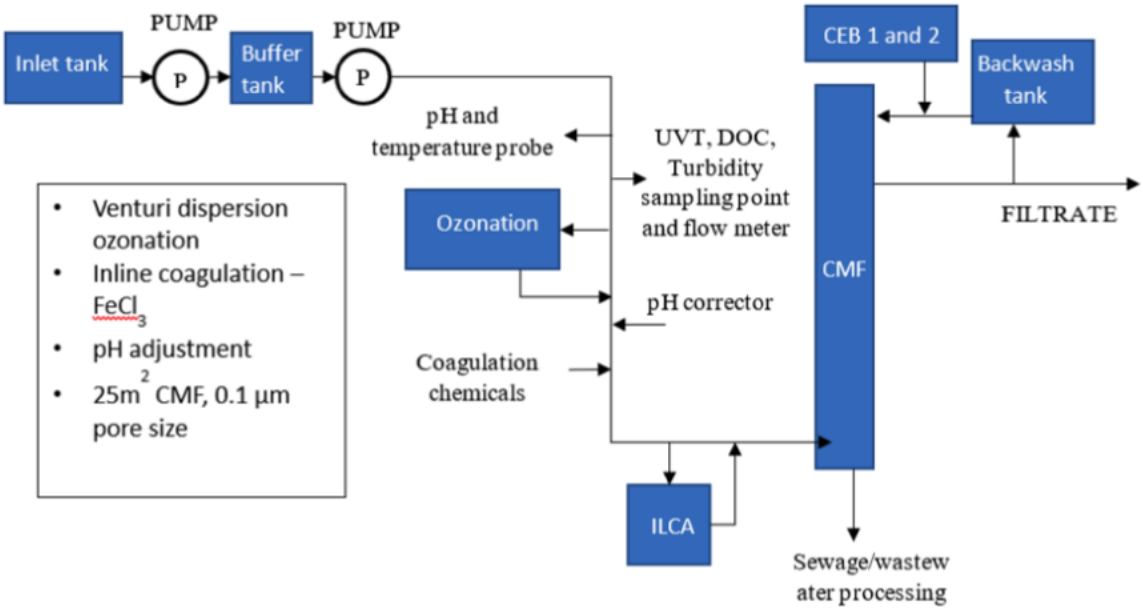
Er zijn vier verschillende UV doseringen onderzocht: 3000, 4000, 8000 en 12000 J/m^2. De H_2O_2 dosering bedroeg 30 mg/l.



OZON + KERAMISCHE MICROFILTRATIE (RWZI WERVERSHOOF)

Deze pilot wordt ook wel Waterfabriek Ge(O)zond genoemd. In de eerste stap vindt een nageschakelde ozonisatiestap plaats, waarbij microverontreinigingen worden afgebroken. Na ozonbehandeling wordt een coagulant (ijzerchloride) toegevoegd (ILCA in de figuur) en wordt het water gefiltreerd over een keramisch microfilter. Deze keramische microfiltratie heeft als doel om gesuspendeerde deeltjes, microplastics en bacteriën/virussen te verwijderen.

De gebruikte ozondosering bedroeg 0,6 gO_3/gDOC (meting 1 en 2) of 1,0 — 1,1 gO_3/gDOC (meting 3 en 4). Het keramische microfilter heeft een poriegrootte van 0,1 µm.



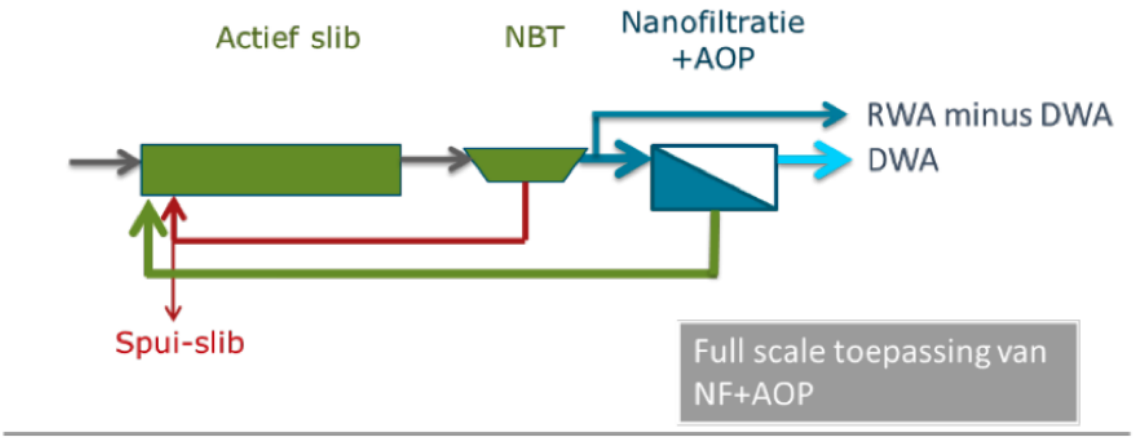
3.3.5 FILTRATIETECHNIEKEN IN COMBINATIE MET OXIDATIE

Er zijn twee pilots onderzocht die filtratie combineren met oxidatie.

NANOFILTRATIE + UV/H_2O_2 (RWZI ASTEN)

Bij deze techniek wordt nanofiltratie gecombineerd met UV/H_2O_2 behandeling. In deze paragraaf wordt gefocust de nanofiltratie. Nanofiltratie is een scheidingstechniek. Nanofiltratiemembranen zijn fysieke barrières met openingen in het bereik van 1 — 10 nm. Pathogenen en zwevende stof kunnen daarmee nagenoeg volledig worden afgescheiden van water. Grotere, opgeloste moleculen worden ook nagenoeg volledig afgescheiden, waaronder humuszuren en een deel van de microverontreinigingen, maar ook fosfaat en nitraat. Ammonium wordt niet verwijderd. De afgescheiden stoffen belanden in een concentraatstroom, die eventueel kan worden nabehandeld. In vergelijking met de referentietechnieken heeft nanofiltratie een grote bijvangst. Om het verwijderingsrendement te verhogen wordt na de nanofiltratiestap een nabehandeling met UV en waterstofperoxide geplaatst (zie paragraaf 3.3.4).

Er zijn membranen met drie verschillende poriegroottes getest: 40, 80 en 120 dnf. Dnf is een aanduiding van de fabrikant NX filtration voor de poriegrootte van het membraan. Hoe kleiner het getal, hoe fijner het membraan.



OZON + KERAMISCHE MICROFILTRATIE (RWZI WERVERSHOOF)

Deze pilot wordt ook wel Waterfabriek Ge(O)zond genoemd. Voor een schematische voorstelling wordt verwezen naar paragraaf 3.3.4. Na ozonbehandeling wordt een coagulant (ijzerchloride) toegevoegd en wordt het water gefiltreerd over een keramisch microfilter. Deze keramische microfiltratie heeft als doel om gesuspendeerde deeltjes, microplastics en bacteriën/virussen te verwijderen. Het keramische microfilter heeft een poriegrootte van 0,1 µm.

3.4 BEMONSTERING EN LOGISTIEK

Per rwzi zijn debietsproportionele 24-uurs monsters genomen van het reguliere effluent (influent van de pilot), het effluent van de pilot en in sommige gevallen ook van enkele tussenstappen in het proces. Bij PACAS installaties zijn monsters genomen van regulier influent en regulier effluent met en zonder poederkooldosering.

De bemonstering ten behoeve van antibioticaresistentie is door IMD uitgevoerd. De bemonstering is uitgevoerd door een monsternemer van IMD volgens voorschrift NEN 6600-1. Dit houdt onder andere in dat er specifieke eisen worden gesteld aan de monsterapparatuur en dat de bemonstering moet voldoen aan de daarvoor gestelde criteria.

Watermonsters zijn gekoeld in het laboratorium van KWR Water Research ontvangen en binnen 24 uur na monstername ingezet voor kweek en gebruikt voor DNA-isolatie ten behoeve van verdere antibioticaresistentie (AMR) gen-analyse.

3.5 UITGEVOERDE ANALYSES EN INTERPRETATIE

In dit onderzoek is gekozen om antibioticaresistente bacteriën (ESBL) en antibioticaresistente genen (zie tabel 3.2) te analyseren. Aangezien ESBL ook een *E. coli* is wordt verwacht dat het verwijderingsrendement van beide bacteriën vergelijkbaar zal zijn.

Er zijn drie types analyses uitgevoerd: analyse van *Escherichia coli* (*E. coli*), analyse van ESBL-*E. coli* en analyse van antibioticaresistente genen.

E. COLI ANALYSES

E.coli is gekweekt op twee soorten media (LSA en TBX-medium), om te onderzoeken welke methode de beste geschikt is voor rioolwater. De ene methode wordt vooral gebruikt in schone matrixes (LSA) en de ander in meer vervuilde matrixes (TBX). Qua kosten en complexiteit zijn beide vergelijkbaar.

Kweek E.coli op LSA

In watermonsters is in duplo *E. coli* bepaald met behulp van membraanfiltratie (*E. coli* blijft achter op het filter), volgens ISO 9308-1, de 'rapid test' op LSA medium. Van Influent (regulier effluent rwzi) monsters is 0,01 ml, 0,1 ml en 1 ml gefiltreerd, van monsters in of na vergaande zuivering is 0,1 ml, 1 ml, 10 ml, en incidenteel 100 ml gefiltreerd, om tot een goed telbaar aantal kolonies te komen. Deze worden vervolgens op LSA medium geplaatst.

Kweek E.coli op TBX

Watermonsters zijn in duplo gefiltreerd door een membraanfilter. Voor de enumeratie van *E.coli* is 3 ml, 10 ml, 30 ml en 100 ml gefiltreerd. De filters zijn vervolgens op TBX geplaatst en 4 tot 5 uur geïncubeerd bij 36±2° gevolgd door 21±3 uur bij 44±0,5°C. De hoge temperatuur wordt gebruikt om de groei van stoorflora, wat veel aanwezig is in water, te remmen. Na incubatie werden de *E.coli* kolonies geteld (groen). De bacterieconcentraties werden berekend als de som van de kolonies geteld op alle filters met minder dan 200 kolonies, gedeeld door de som van het volume gefiltreerd door alle filters met minder dan 200 kolonies (Naar ISO 9199).

ESBL ANALYSE

Watermonsters zijn in duplo gefiltreerd door membraanfilters met een poriegrootte van 0,45µm. Voor het vaststellen van de concentratie van ESBL *E.coli* is 3 ml, 10 ml, 30 ml en 100 ml gefiltreerd. De filters zijn vervolgens op ChromID ESBL agar geplaatst en 4 tot 5 uur geïncubeerd bij 36±2° gevolgd door 21±3 uur bij 44±0,5°C. De hoge temperatuur wordt gebruikt om de groei van stoorflora, wat veel aanwezig is in water, te remmen. Na incubatie werden de ESBL *E.coli* kolonies geteld. De bacterieconcentraties werden berekend als de som van de kolonies geteld op alle filters met minder dan 200 kolonies, gedeeld door de som van het volume gefiltreerd door alle filters met minder dan 200 kolonies.

INTERPRETATIE VAN DE ESBL EN E.COLI DATA:

Voor elk van de monsters zijn de *E.coli* bacterieconcentraties berekend evenals de concentratie ESBL. De relatie *E.coli* / ESBL is vervolgens vastgesteld. De resultaten van de twee *E.coli* kweekmethodes voor *E.coli* zijn met elkaar vergeleken om te onderzoeken welke van deze methoden het beste resultaat geeft bij analyse van deze bacteriën in afvalwater.

Tevens is deze informatie gebruikt om het verwijderingsrendement van een zuiveringsstap te bepalen door de totale bacterie-concentratie voor en na zuiveringsstap met elkaar te vergelijken.

ANALYSE VAN ANTIBIOTICARESISTENTIE GENEN

Er is gekozen om specifiek naar genen te kijken en geen qPCR toe te passen voor een enkel gen of type. Op deze manier wordt een breed aantal resistentie genen beschouwd. Dit is de gouden standaard voor ABR-onderzoek.

Het DNA van de watermonsters is geëxtraheerd met behulp van de DNeasy PowerBiofilm® Kit (QIAGEN Benelux B.V). De extractie is uitgevoerd volgens de instructies van de fabrikant. DNA-extracten zijn tot de resistomap-analyse bij -20 °C bewaard.

Monsters zijn geanalyseerd met behulp van Resistomap Smartchip multiplex qPCR in twee verschillende batches. De monsters die waren genomen tot en met 2022 zijn in de eerste batch verstuurd en geanalyseerd, de monsters die zijn genomen vanaf 2023 zijn in de tweede batch geanalyseerd. Verdeeld over de locaties, zijn de monsters van Simpelveld, Hapert, Horstermeer, Wervershoof, Leiden-Noord en Asten in de eerste batch geanalyseerd. De monsters van locaties Horstermeer (pilot), Leiden-Noord (AdOx pilot), Emmen, Houten, Lelystad, Wervershoof (pilot) en Walcheren zijn geanalyseerd in de tweede batch. Ook de monsters van Asten die genomen zijn in januari en februari van 2023 zijn in de tweede batch geanalyseerd. Van Asten zijn monsters dus in de twee verschillende batches geanalyseerd.

De DNA concentratie in de DNA-extracten is gemeten met Qubit Fluorometer (Thermo-Fisherscientific). Waar nodig zijn de extracten verdund, om aan de vereisten van Resitomap te voldoen. Vervolgens zijn de monsters bevroren per koerier verstuurd naar Resistomap, Finland om volgens hun kwaliteitsstandaarden te analyseren op een selectie van 24 verschillende genen (zie tabel 1) met behulp van Resistomap SmartChip multiplex qPCR. De 24 genen zijn geselecteerd uit een totaal van 384 beschikbare genen op de Resistomap chip, en bevatten naast het 16S rNA gen twee integrons, 18 AMR genen verdeeld over 8 type antibiotica, en drie andere resistentiegenen. De selectie is gemaakt op basis van eerdere ervaring met aanwezigheid van type genen in vergelijkbare monsters (*Van der Zaan, BTO rapport 2024.049, KWR*). De aanname daarbij was dat deze genen voor dit type monsters het meest relevant zijn, en voorkomen in een concentratie ruim boven de detectiegrens. Een 2e criterium was dat de belangrijkste relevante ARG groepen vertegenwoordigd moeten zijn.

Tabel 3.2 **Overzicht van de geanalyseerde genen met de Resistomap SmartChip multiplex qPCR. Vetgedrukte genen zijn in de tweede batch als positieve controle monsters als verdunningsreeks mee geanalyseerd**

nummer	groep	Gen	nummer	groep	gen
1		16S rRNA	13	MDR	qacF/H
2	Aminoglycoside	strB	14		emrB/qacA_1
3		aadA_1	15	MLSB	ermF
4		aadA10	16		ereA
5	Beta Lactam	blaNDM	17	Tetracycline	tetM
6		blaVIM	18		tetW
7		blaGES	19		tetQ
8		blaVEB	20	Sulfonamide	sul1_2
9		blaOXA51	21	Vancomycin	vanA
10	Integrons	intI1_1	22	Other	merA
11		intI1_2	23		qacEâˆ†1_1
12	MGE	tnpA_1	24		mcr1

Bij de tweede batch met monsters is tevens een calibratiereeks van 8 positieve controle monsters van de in tabel 1 vetgedrukte genen met een bekende concentratie (verkregen via het RIVM) meegenomen. Hiermee kon de effectiviteit van de SmartChip analyse voor deze genen worden vastgesteld, en bleek over een concentratie range van ca. 1.100 - 3.105 genen/sample een goede efficiëntie te tonen.

INTERPRETATIE VAN DE AMR-GEN DATA:
Voor elk van de monsters is het aantal aanwezige genen vastgesteld, evenals de relatieve concentratie van de individuele genen ten opzicht van het 16S rRNA gen in dat monster.

Daarnaast zijn van de 8 ijklijnen die bij de 2e batch zijn meegenomen, de concentraties in de monsters uitgezet tegen de Ct-value (cycle treshold) van de Resistomap-analyse. De gemiddelde richtingscoëfficiënt van deze 8 ijklijnen is gebruikt om ook voor de andere genen op basis van de Ct-value een concentratie van het specifieke gen in het monster te bepalen. Deze data zijn per locatie voor de verschillende monsters in een bar-plot weergegeven als de som van de totale gen-concentratie. Tevens is deze informatie gebruikt om het verwijderingsrendement van een zuiveringsstap te bepalen door de totale gen-concentratie voor en na zuiveringsstap met elkaar te vergelijken.

3.6 VERWACHTE RESULTATEN

Er is (in vergelijking met de verwijdering van medicijnresten) minder kennis over de verwijdering van resistente bacteriën en pathogenen (Per et al., 2019). Veel bestaande data zijn verkregen in lab opstellingen (Schmitt et al., 2017), deze gegevens kunnen echter niet zondermeer worden vertaald naar veldsituaties. De bestaande veldstudies zijn meestal beperkt tot één installatie, en één instelling en **éé**n type afvalwater, en een bepaalde vorm van resistentie. De resultaten van de verwijderingsefficiëntie van resistente bacteriën en pathogenen in de verschillende typen installaties zijn daarom vaak niet goed onderling te vergelijken. Het is aannemelijk dat zuiveringstechnieken die effectief en kostengunstig medicijnresten kunnen verwijderen niet altijd even effectief zijn voor de verwijdering van pathogenen en resistente bacteriën.

Wat wordt er verwacht qua verwijdering van antibioticaresistentie bij vergaande zuiveringstechnieken.

- De concentratie van ABR, *E. coli* van regulier effluent is naar verwachting 2 tot 5 log-eenheden
- De verwijdering van ABR, *E.coli* in een reguliere rwzi's bedraagt naar verwachting voor de bacteriën 1 tot 2log-eenheden en voor genen is dit nog onbekend.
- Adsorptie (Poeder of granulair actief kool). Er zijn enkele onderzoeken waaruit blijkt dat op adsorptie op kool gebaseerde technieken een zeer laag rendement voor de verwijdering van bacteriële pathogenen hebben (Lüddeke et al., 2015). Ditzelfde geldt voor de overige adsorptietechnieken. De verwachting is dan ook dat het verwijderingsrendement van antibioticaresistentie (bacteriën en genen) van deze technieken zeer laag zal zijn (0-1 log-verwijdering).
- Oxidatieve technieken. Oxidatiemiddelen reageren met (an)organische stoffen en microorganismen, waaronder pathogenen, in het water. Een deel van het desinfectiepotentieel wordt weggevangen door reacties met deze stoffen, welke vaak sneller reageren met oxidatieve stoffen dan de pathogenen. De benodigde dosis voor de verwijdering van stoffen is dus vaak lager dan die voor verwijdering van pathogenen. De effectiviteit van oxidatieve technieken hangt dus (naast de vuilgraad van de te behandelen stroom) sterk af van de dosering en de contacttijd (met de overgebleven restconcentratie). Bij lage dosering en contacttijden zal het verwijderingsrendement hierdoor waarschijnlijk laag (0-1 log-verwijdering) zijn voor bacteriën en genen. Hogere doseringen kunnen het rendement voor resistente bacteriën verhogen (tot 4 log-verwijdering). Er is nog weinig bekend wat het effect op genen is.

- Filtratietechnieken (nanofiltratie, micro-filtratie) in combinatie met oxidatie). Verwijdering vindt hier plaats doordat micro-organismen 'botsen' met het filtermateriaal en daar worden afgevangen. Belangrijke factor hierbij is de poriegrootte (past een pathogeen erdoorheen). Hoe kleiner de poriën hoe hoger het verwijderingsrendement. De verwijdering bij technieken met microfiltratie zal daardoor dus lager (2-4 log-verwijdering) zijn dan bij nanofiltratie (>5 log-verwijdering). Inzet van een coagulant voor filtratie of nabehandeling met oxidatie zal het rendement verhogen.

4

RELATIE E.COLI EN ANTIBIOTICA-RESISTENTE BACTERIËN IN RWZI-AFVALWATER

4.1 VERGELIJKING ANALYSEMETHODE VOOR *E.COLI*

E. coli is een parameter die gebruikt wordt in diverse wetgevingen (o.a. Zwemwater- en/of Drinkwaterrichtlijn) als bacteriële indicator voor de aanwezigheid van fecale pathogenen. Deze indicator is zelf meestal niet ziekteverwekkend, maar wel altijd aanwezig in feces van mens en dier. De analyse van deze indicatorbacterie is vrij eenvoudig en kan door vele laboratoria goedkoop worden uitgevoerd.

In deze studie is *E. coli* op twee manieren bepaald. De standaardmethode voor het bepalen van *E. coli* in (drink)water (LSA) is vergeleken met de methode voor het bepalen van *E. coli* in meer vervuilde matrices (TBX), omdat onbekend was welke methode het beste is voor rwzi-afvalwater.

De waarden van beiden methoden zijn met elkaar vergeleken (zie bijlage I) en het blijkt dat beide methoden vergelijkbare waarden geven (correlatiecoëfficiënt 0,988) . In dit rapport worden daarom steeds de analyseresultaten van de TBX methode weergegeven. Aangezien deze meetmethode voor vuilere monsters is wordt aanbevolen om deze methode als standaard te gebruiken bij analyses in afvalwater.

4.2 RELATIE TUSSEN *E. COLI* EN ANTIBIOTICARESISTENTE BACTERIËN (ESBL)

De analyse van *E. coli* is eenvoudiger en goedkoper dan antibiotica resistente bacteriën (in dit onderzoek ESBL). Uit eerdere onderzoeken lijkt het dat voor rioolwater een verband is tussen de aanwezigheid van *E. coli* en ESBL. In dit onderzoek is gekeken of dit verband er ook is als rwzi-effluent vergaand gezuiverd wordt.

De aanwezigheid van *E. coli* (log-eenheden) is vergeleken met de aanwezigheid van ESBL in alle pilots. Enkele van deze resultaten zijn weergegeven in tabel 4.1.

Tabel 4.1 **Overzicht van de aanwezigheid (kve log-waardes) van *E. coli* en ESBL in enkele van de uitgevoerde pilots en de ratio tussen deze twee parameters**

Hapert upfl GAK	E.coli	ESBL	Ratio
influent pilot	5,6	3,5	2,1
effluent pilot	4,7	2,6	2,0
Simpelveld PACAS			
effluent ref zonder pacas	4,4	2,4	2,0
effluent pacas	4,8	2,5	2,3
Horstermeer Ozon GAK			
Influent ozon	5,6	3,4	2,2
effluent ozon	5,1	3,0	2,0
effluent gak+ozon	4,9	2,7	2,2
Asten NF UV/H2O2			
influent pilot nano	5,4	3,3	2,1
effluent nano	1,7	<1	nvt
effluent UV/ 6,1 ppm H2O2	1,2	<1	nvt
Wevershoof ozon + filter			
influent ozon	5,6	3,6	2,0
effluent ozon	4,8	2,7	2,0
effluent ozon+filter	1,8	<1	nvt
Leiden–Noord			
influent pilot (=effluent pacas)	6,1	4,2	1,9
effluent pilot O3 0,3	5,1	3,4	1,6
effluent pilot O3 0,5	3,8	2,2	1,6
effluent zonder pacas	5,8	4,0	1,8

Uit de resultaten lijkt er inderdaad een verband: de logaritmische waarden van *E. coli* zijn ongeveer 2 maal de waarden van ESBL in nagenoeg alle onderzochte pilots, onafhankelijk van de soort techniek. Deze verhouding blijft gelijk na de zuiveringsstap.

In de pilots van Leiden-Noord en Houten ligt deze verhouding net iets lager en zijn de logaritmische waarden van *E.coli* ongeveer 1,5 of 1,6 maal de waarden van ESBL. De ratio tussen de twee bacteriegroepen blijft wel hetzelfde gedurende de processen.

Deze resultaten geven aan dat de verwijdering van *E.coli* een goede indicator is voor de verwijdering van ESBL bij vergaande zuiveringen.

5

PRESTATIES ZUIVERINGSTECHNIEKEN

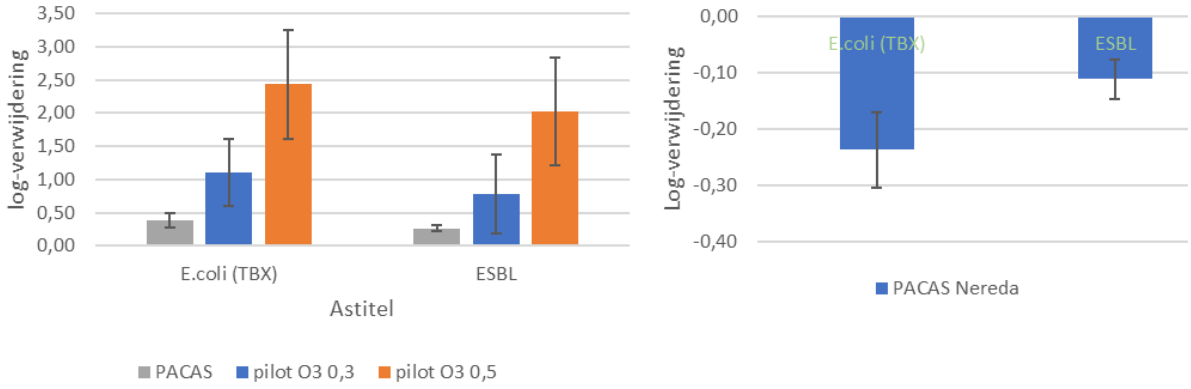
In deze paragraaf worden de prestaties van de verschillende zuiveringstechnieken besproken. Daarbij is de indeling uit tabel 3.1 aangehouden. Dit betekent dat sommige combinatietechnieken meerdere keren terug komen en in de betreffende paragraaf alleen de resultaten van de betreffende techniek wordt besproken. De resultaten van de demo installaties worden apart besproken.

5.1 ADSORPTIE AAN POEDER ACTIEF KOOL (PAK)

Er zijn twee installaties onderzocht waarbij Poeder Actiefkool (PAK) is toegepast in de actief slib tank (PACAS): rwzi Simpelveld waarbij de PACAS-Nereda techniek is onderzocht en rwzi Leiden Noord waarbij na de PACAS behandeling het effluent verder is behandeld met ozon. Daarbij zijn twee ozondoseringen onderzocht: 0,3 gO_3/gDOC en 0,5 gO_3/gDOC. De focus in deze paragraaf ligt op de PACAS stap.

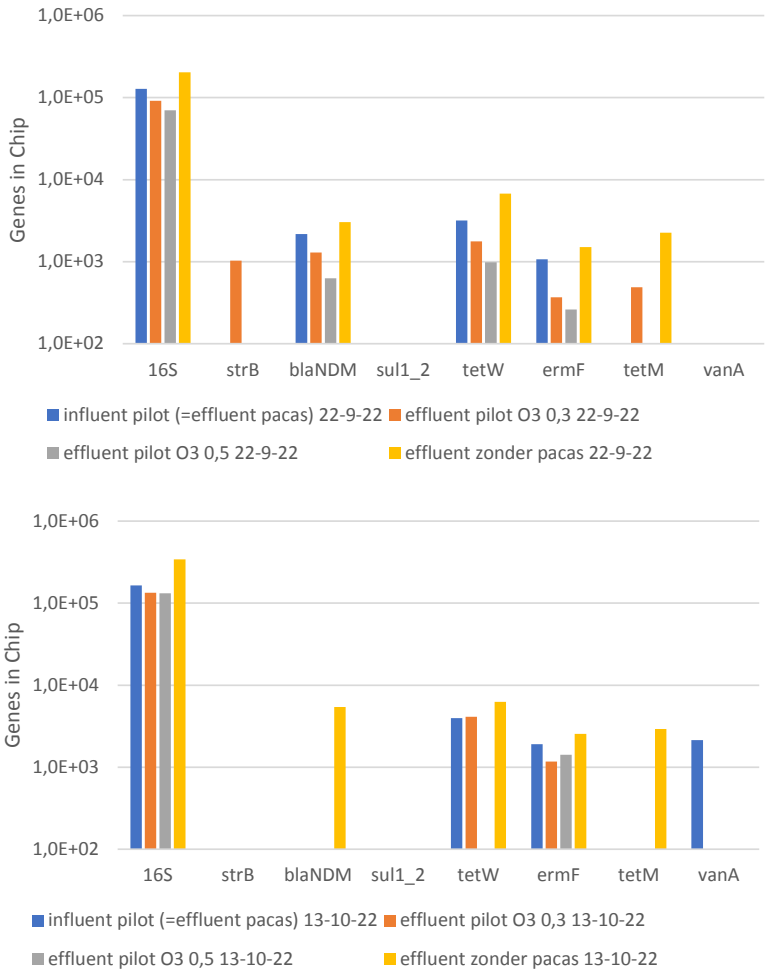
De resultaten voor *E. coli* en ESBL zijn weergegeven in figuur 5.1 en de resultaten van de genenanalyse in figuur 5.2 en figuur 5.3.

Figuur 5.1 **Log-verwijdering bij de pilots met PAK. Links: Leiden Noord waarbij twee ozondoseringen (0,3 g O_3/g DOC en 0,5 g O_3/g DOC) zijn getest en B: Simpelveld**

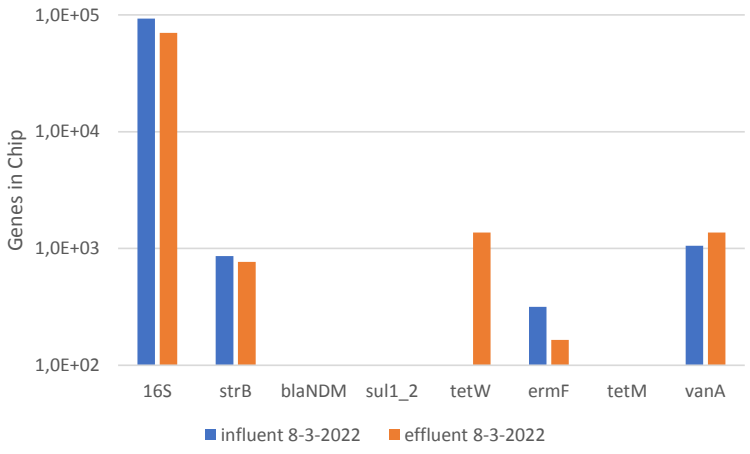


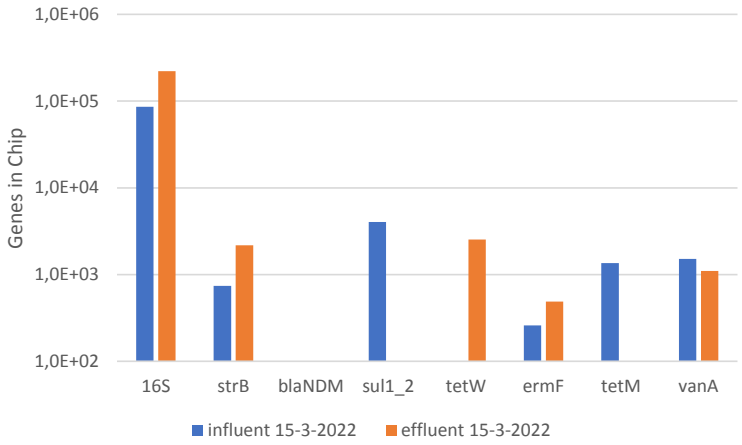
Uit figuur 5.1 blijkt duidelijk dat de PACAS-behandeling nauwelijks effect heeft op de verwijdering van *E. coli* en ESBL. Er zijn minimale verschillen waargenomen tussen influent en effluent van de PACAS, deze waren ook niet constant. In Simpelveld lijkt er zelfs een kleine toename te zijn. Dit komt waarschijnlijk doordat bij de bemonstering niet voldoende rekening is gehouden met de verblijftijd in de reactor.

Figuur 5.2 **Genconcentraties bij de pilot met PAK in Leiden Noord op twee dagen (22-9-22 en 13-10-22) waarbij twee ozondoseringen (0,3 g O_3/g DOC en 0,5 g O_3/g DOC) zijn getest**



Figuur 5.3 **Genconcentraties bij de pilot met PAK op twee dagen (8-3-22 en 15-3-22) in Simpelveld**





De figuren 5.2. en 5.3 geven aan dat er nagenoeg geen verschuivingen zijn in de genconcentraties na behandeling met PACAS. Er zijn minimale verschillen zichtbaar maar deze zijn niet constant.

Geconcludeerd wordt dat PACAS geen antibioticaresistente bacteriën en genen verwijderen. NB de resultaten van de ozonisatie wordt bij 5.4 besproken.

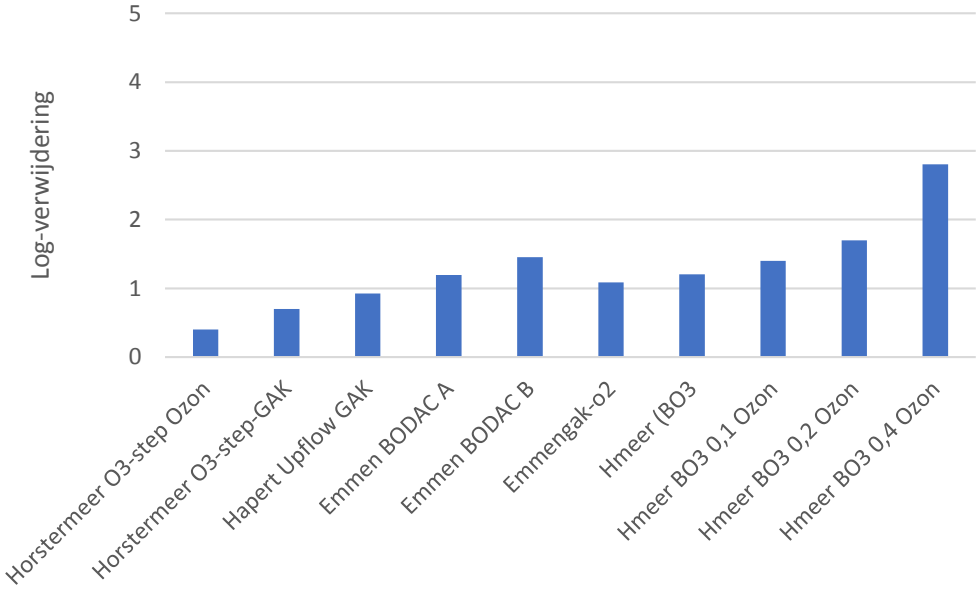
5.2 ADSORPTIE AAN GRANULAIR ACTIEF KOOL (GAK)

Er zijn vijf installaties onderzocht waarbij (een combinatie met) Granulair Actiefkool (GAK) is toegepast:

- O_3-STEP bij rwzi Horstermeer. Het reguliere effluent is behandeld met ozon (0,4 gO_3/gDOC) en vervolgens door een 1-STEP filter is geleid. De focus in deze paragraaf ligt voor rwzi Horstermeer op het 1-STEP filter.
- Upflow GAK bij rwzi Hapert.
- BODAC+O_2 bij rwzi Emmen. Er is zowel een oude GAK kolom (12 jaar standtijd) als een nieuwe GAK kolom (1 jaar standtijd) onderzocht.
- GAK-O_2 bij rwzi Emmen.
- Aurea (B-O3) bij rwzi Horstermeer. Er zijn drie verschillende ozonbehandelingen getest: 0,1 gO_3/gDOC, 0,2 gO_3/gDOC en 0,4 gO_3/gDOC. Het effect van ozon wordt verderop behandeld.

De resultaten voor de verwijdering van ESBL staan weergegeven in figuur 5.4. De resultaten voor *E. coli* worden hier niet weergegeven, omdat deze een vergelijkbaar beeld geven. Uit deze figuur blijkt dat granulair GAK een weinig tot geringe verwijdering tussen 0,5 en 1,5 log-eenheden geeft. De twee BODAC-installaties en de Aurea (BO_3) laten een iets hoger verwijderingsrendement zien dan de O_3-STEP-GAK, de GAK-O_2 en de BioGAK.

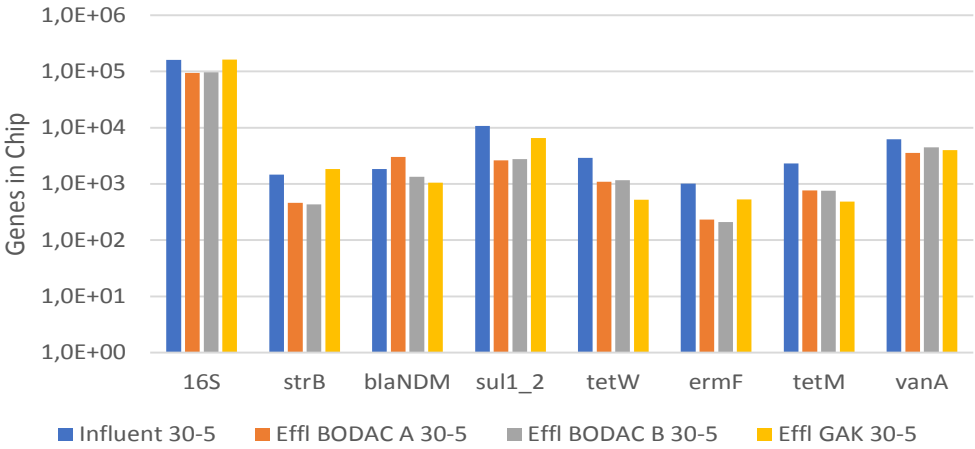
Figuur 5.4 **Log-verwijdering bij de pilots met GAK**



Voor elk van de monsters is het aantal aanwezige genen vastgesteld, evenals de relatieve concentratie van de individuele genen ten opzicht van het 16S rRNA gen in dat monster. Er is bij al deze technieken nauwelijks verschuiving waargenomen in het aantal aanwezige genen en de relatieve concentratie van deze genen. In figuur 5.5. zijn ter illustratie de resultaten van de installaties in Emmen opgenomen.

Hieruit blijkt dat er geen duidelijke verwijdering van resistentiegenen wordt waargenomen in deze installaties.

Figuur 5.5 **Genconcentraties bij de pilot met GAK in Emmen op 30 mei 2023**



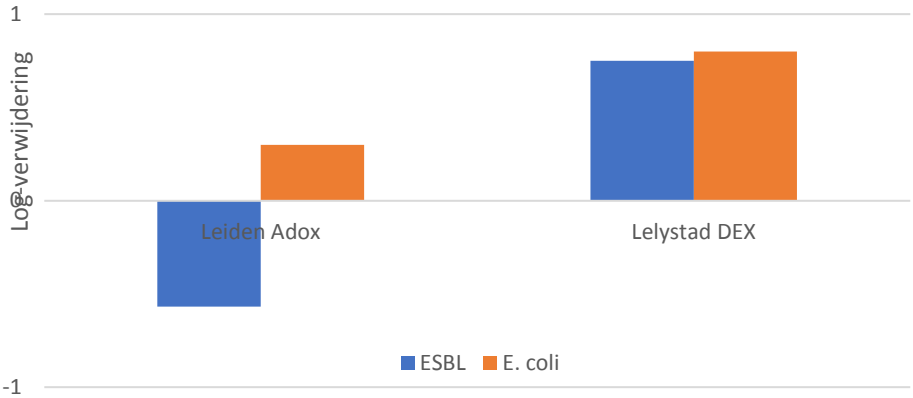
Geconcludeerd wordt dat GAK weinig verwijdering veroorzaakt van antibioticaresistente bacteriën en er geen effect is gevonden op resistentie genen.

5.3 ADSORPTIE AAN OVERIGE NIET-FOSSIELE MATERIALEN

Er zijn twee pilots onderzocht waarbij niet-fossiele adsorptiematerialen zijn toegepast: het DEX-filter bij rwzi Lelystad en het AdOx filter bij rwzi Leiden Noord. Bij de AdOx pilot wordt het reguliere effluent eerst gefiltreerd alvorens het door het AdOx filter gaat. De pilot is drie keer onderzocht, de tweede en derde meetronde is ook de verwijdering van deze voorfilter-stap onderzocht.

De resultaten voor de verwijdering van ESBL is weergegeven in figuur 5.6

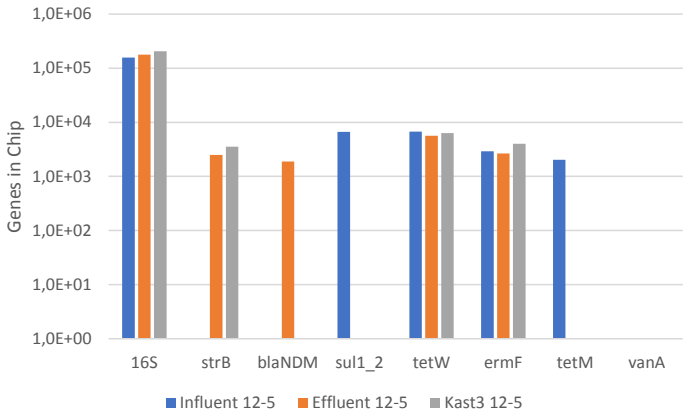
Figuur 5.6 **Log-verwijdering bij de pilots met adsorptie aan niet-fossiele materialen**

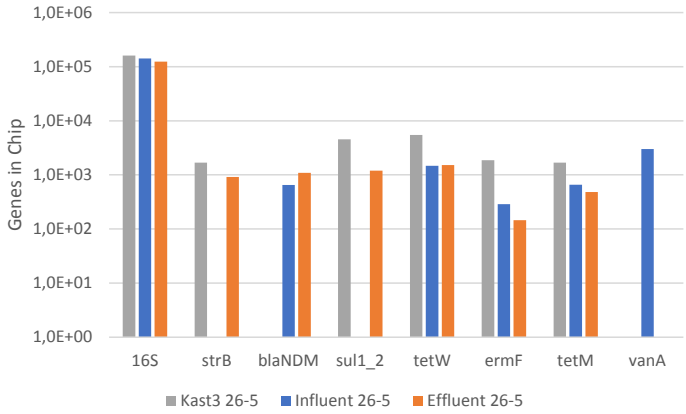


Deze resultaten zijn vergelijkbaar met de resultaten van PAK, namelijk dat de behandeling nauwelijks effect heeft op de verwijdering van ESBL en *E. coli*.

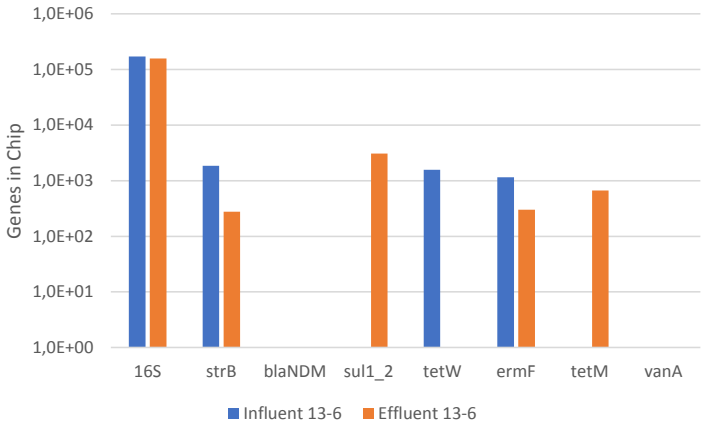
De resultaten van de genconcentraties worden in figuur 5.7 en 5.8 weergegeven.

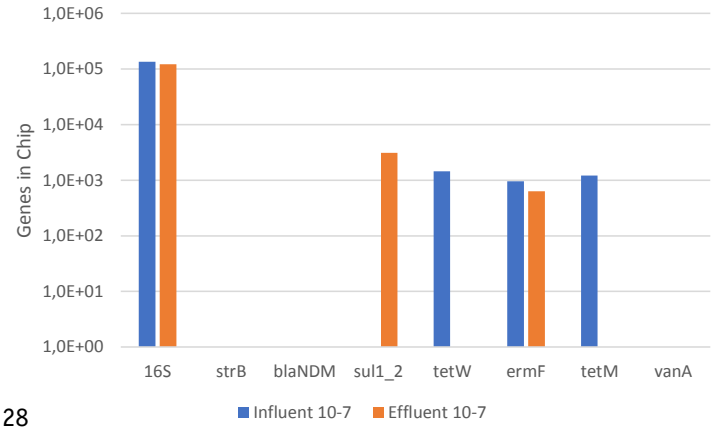
Figuur 5.7 **Genconcentraties bij de pilot ADOX in Leiden Noord op twee dagen (12-5 en 26-3)**





Figuur 5.8 **Genconcentraties bij de pilot met DEX in Lelystad op twee dagen (13-6-23 en 10-7-23)**





De behandeling met DEX of ADOX lijkt weinig effect te hebben op de genconcentraties,

Geconcludeerd wordt dat het DEX-filter en de AdOx behandeling geen antibioticaresistente bacteriën en genen verwijderen. Beide pilots hebben tijdens de bemonstering ten behoeve van antibioticaresistentie niet optimaal gedraaid. De verwachting is dat dit geen effect heeft gehad op de analyseresultaten, omdat er ook niet verwacht werd dat deze technieken effectief zouden zijn voor de verwijdering van antibioticaresistentie.

5.4 OXIDATIEVE TECHNIEKEN

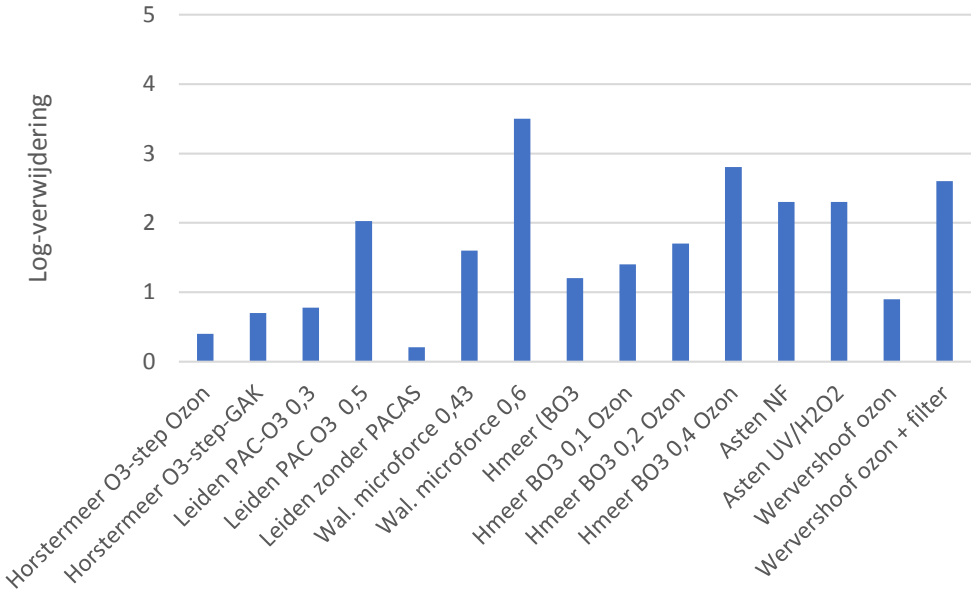
Er zijn zes pilots waarin oxidatieve technieken zijn onderzocht, allen in combinatie met filtratietechniek of biologische afbraak:

- O_3-STEP bij rwzi Horstermeer. Het reguliere effluent is behandeld met ozon (0,4 gO_3/gDOC) en vervolgens door een 1-STEP filter is geleid. De focus in deze paragraaf ligt voor rwzi Horstermeer op de ozonbehandeling.
- PAK+O_3 bij rwzi Leiden Noord. Na de PACAS behandeling is het effluent verder behandeld met ozon. Daarbij zijn twee ozondoseringen onderzocht: 0,3 gO_3/gDOC en 0,5 gO_3/gDOC. De focus in deze paragraaf ligt voor rwzi Leiden Noord op de ozonbehandeling.
- Microforce bij rwzi Walcheren. Deze zuiveringstechniek kent normaliter twee nageschakelde stappen met in elke stap een ozondosering gevolgd door een bioreactor. In het pilotonderzoek is maar een van deze stappen onderzocht omdat de tweede stap ten tijde van de monstername niet goed functioneerde. Er zijn debietsproportionele monsters van het influent en effluent van de pilot genomen en steekmonsters op enkele tussenliggende plekken. Het steekmonster van influent O_3 is min of meer vergelijkbaar met het influent van de pilot, het steekmonster van effluent O_3+bio is min of meer vergelijkbaar met het effluent van de pilot. De ozondosering bedroeg 0,43 gO_3/gDOC.
- BO_3 bij rwzi Horstermeer. Na een biologische actief kool filtratie volgt ozonbehandeling. Er zijn drie verschillende ozonbehandelingen getest: 0,1 gO_3/gDOC, 0,2 gO_3/gDOC en 0,4 gO_3/gDOC
- Nanofiltratie in combinatie met UV/H2O2 bij rwzi Asten. Er zijn verschillende membranen en UV-doseringen getest.
- Ozon plus keramische microfiltratie bij rwzi Wervershoof. Na ozonbehandeling wordt het water gefiltreerd over een keramische filter met een poriegrootte van 0,1 µm. Er zijn twee verschillende ozonbehandelingen getest: 0,6 gO_3/gDOC en 1,0-1,1 gO_3/gDOC.

De gehanteerde ozondoseringen bij de meeste pilots zijn met 0,1 tot 0,43 gO_3/gDOC relatief laag in vergelijking met de referentiedosering van 0,7 O_3/g DOC voor ozon als bewezen techniek voor medicijnverwijdering. Door de combinatie met andere technologieën kan minder ozon worden gedoseerd. Bij rwzi Wervershoof zijn hogere ozondoseringen toegepast (0,6 tot 1,1 gO_3/gDOC).

De resultaten van de log-verwijdering voor ESBL van de oxidatieve technieken is weergegeven in figuur 5.9. Uit deze figuur wordt duidelijk dat ozon een effect kan hebben op de verwijdering van ESBL, maar dat het sterk afhangt van de dosering.

Figuur 5.9 **Log-verwijdering bij de pilots met oxidatieve technieken. De pijltjes geven aan dat de verwijdering groter is dan de log-verwijdering die is aangegeven, omdat na de techniek de waarde onder de detectielimiet lag**



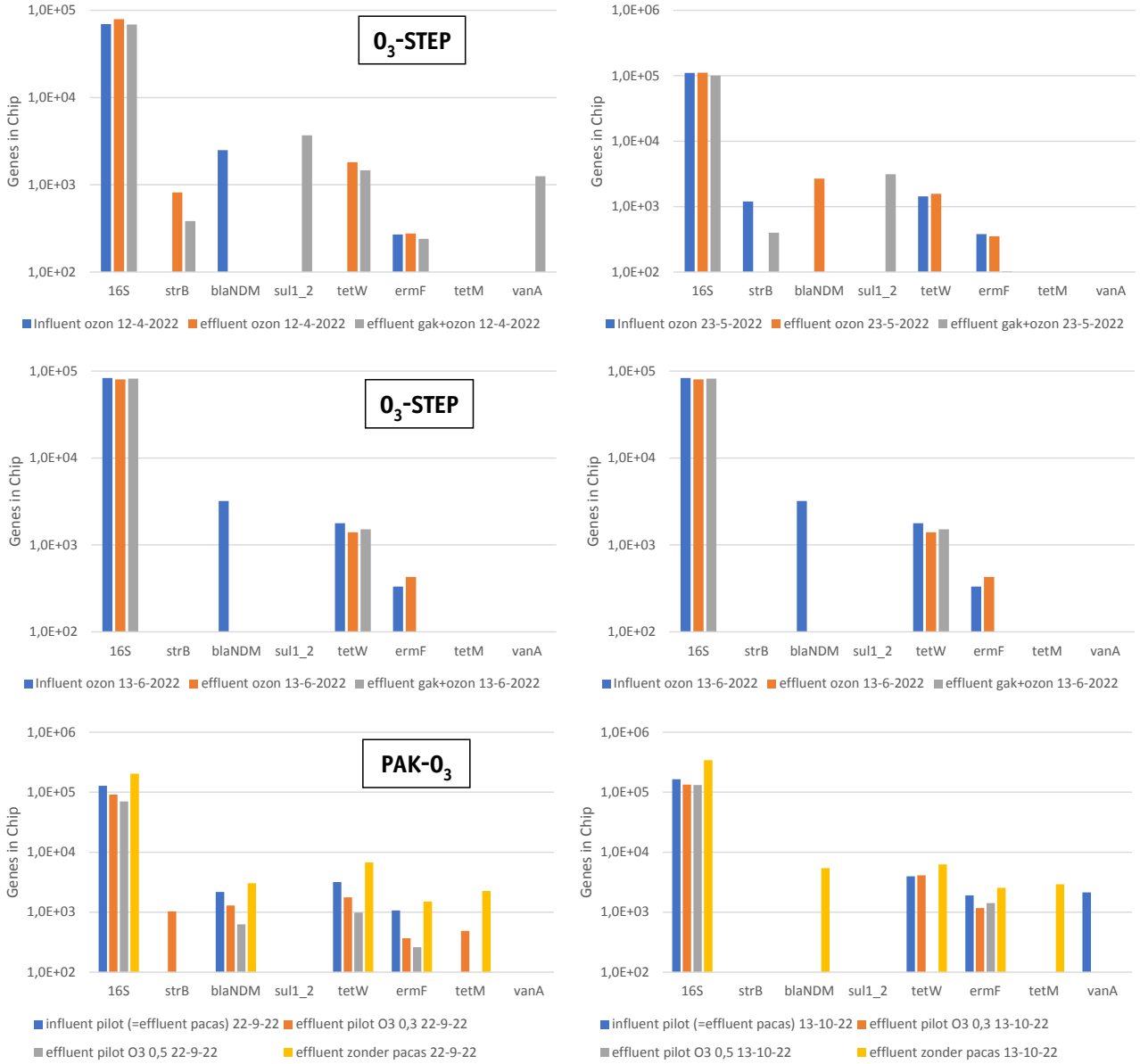
Eerst worden de resultaten van de oxidatieve technieken met ozon besproken. Aan het einde van de paragraaf wordt het resultaat met UV/H_2O_2 besproken.

De O_3-STEP installatie verwijdert nagenoeg geen ESBL met een ozondosering van 0,4 gO_3/gDOC. In de PAC O_3 is duidelijk het effect van een hogere dosis zichtbaar: een verhoging van de dosis van 0,3 naar 0,5 g O_3/g DOC verdubbelt de log-verwijdering van ESBL. Datzelfde is zichtbaar bij de Microforce pilot: een verhoging van 0,43 gO_3/gDOC. naar 0,6 g O_3/gDOC geeft ook hier een verdubbeling van het verwijderingsrendement. Hetzelfde beeld geeft de BO_3 (Aurea) pilot waar ook de log-verwijdering oploopt met de verhoging van de dosering.

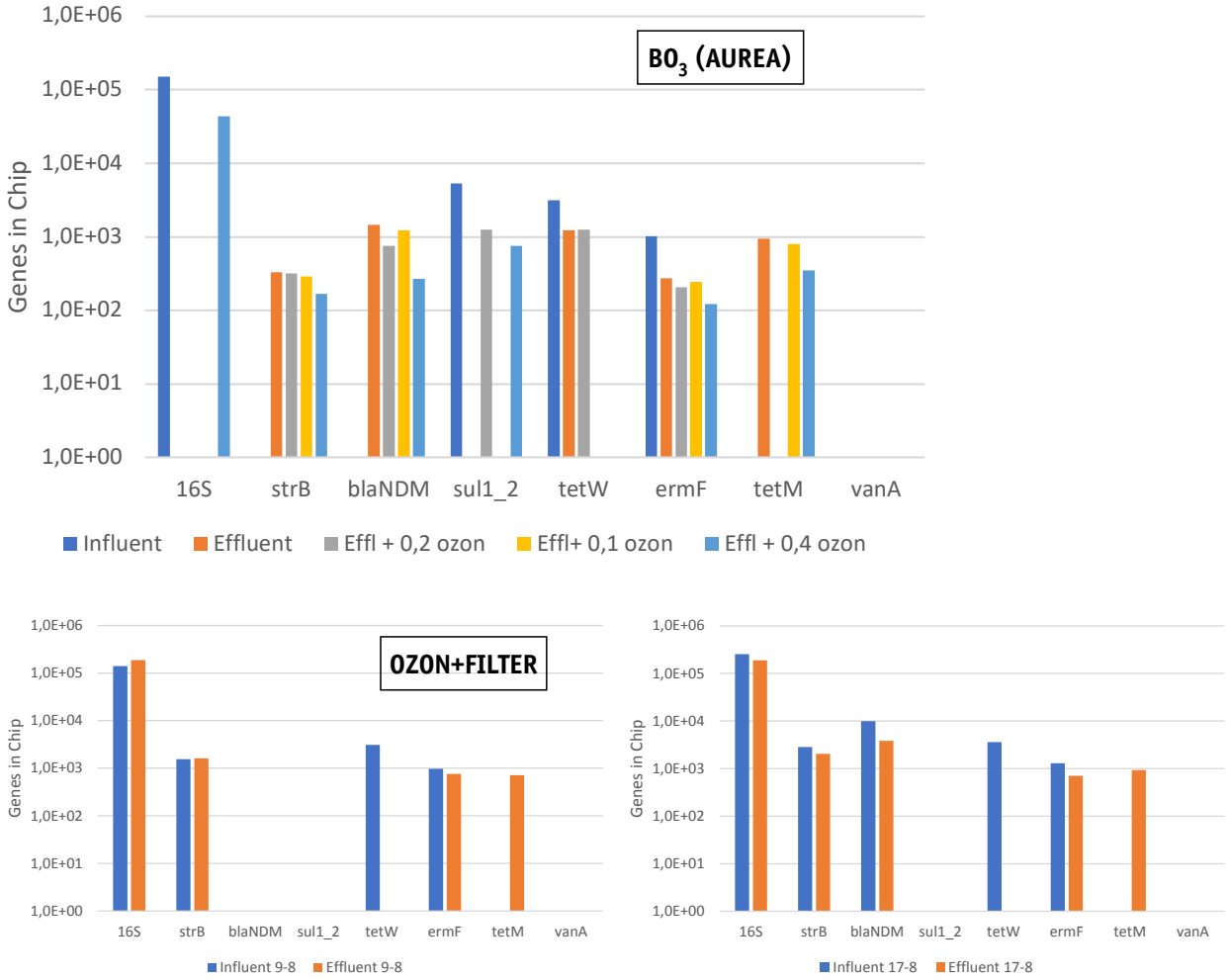
Over het algemeen lijkt een dosis boven de 0,45-0,5 gO_3/ gDOC een effect te hebben op de log-verwijdering van ESBL.

De genconcentraties van enkele resistentiegenen bij lage ozondoseringen laten weinig verschuivingen zien (zie figuur 5.10 voor O_3-STEP en PAK-O_3 en 5.11 voor BO_3 (Aurea) en ozon met filter.

Figuur 5.10 Genconcentraties bij O3-STEP en PAK-O_3



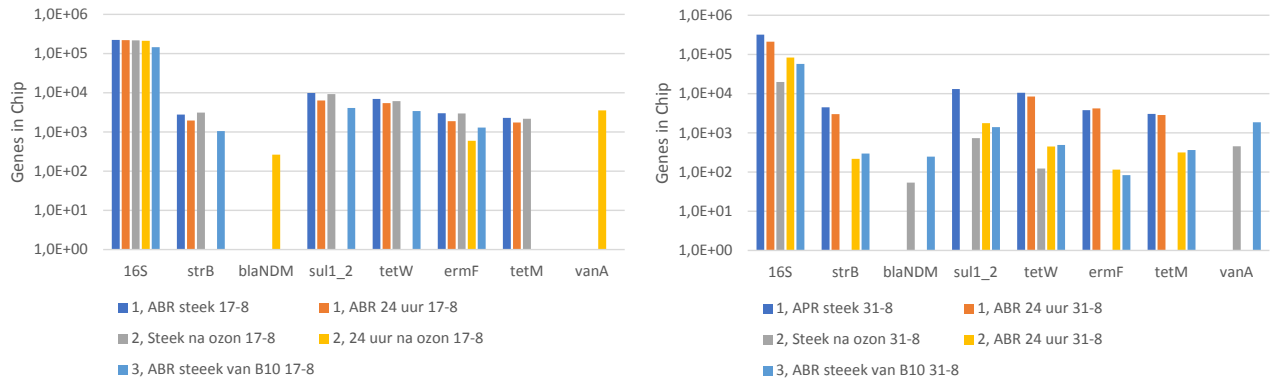
Figuur 5.11 Genconcentraties bij de BO3 (Aurea) installatie te Horstermeer en Ozon en filter in Wervershoof



Figuur 5.10 geeft geen of kleine verschuivingen in de genconcentratie weer en ook figuur 5.11 geeft aan dat de genen maximaal 0,5 log-eenheid worden verwijderd bij een dosis van 0,4 g O_3/g DOC. De lagere doseringen geven een lager verwijderingsrendement weer.

In figuur 5.12 wordt de genconcentratie van Microforce weergegeven. Bij Microforce is het effect van een hogere ozondosering zichtbaar in de afname van de genconcentratie tijdens en na de behandeling.

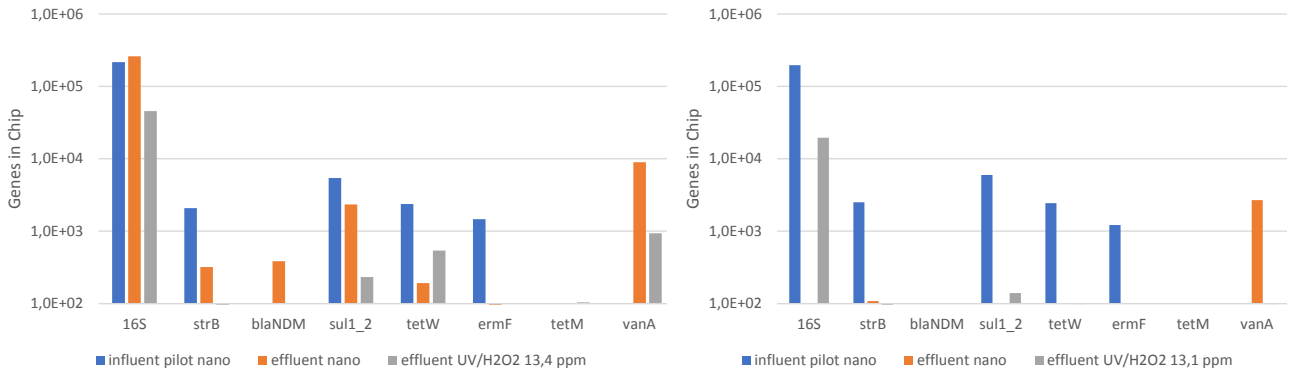
Figuur 5.12 Genconcentraties bij de pilot met Microforce in Walcheren op twee dagen



Er is een duidelijke verschuiving in de genconcentratie zichtbaar voor en na ozon. Op 17 augustus 2023 was de dosis 5 g O_3/m^3 en deze geven een duidelijke lagere verwijdering van resistentiegenen dan op 31 augustus 2023 waar de dosis 7 g O_3/m^3 was. Nog steeds is de verwijdering max 1,5 log.

De resultaten van oxidatie met UV/H_2O_2 op de verwijdering van ESBL en *E.coli* zijn onbekend (zie figuur 5.9). De filtratiestap voor deze oxidatiestap heeft alle ESBL en *E.coli* al verwijderd waardoor een eventueel effect niet aan te tonen is. In figuur 5.13 wordt de genconcentratie van alle monsters genomen in Asten weergegeven. Hier blijkt dat in sommige monsters de genconcentratie na Uv/H_2O_2 iets veranderd. Dit geeft aan dat er mogelijk een aanvullend effect van UV/H_2O_2 is op de verwijdering van antibioticaresistente genen.

Figuur 5.13 Genconcentraties bij de pilot met NF met UV/H_2O_2 te Asten



Geconcludeerd wordt dat oxidatieve technieken een effect hebben op de verwijdering van antibioticaresistente bacteriën en genen. Ozondoseringen boven de 0,4-0,5 g O_3/g DOC lijken een duidelijk effect te hebben, terwijl lagere doseringen weinig verwijdering geven.

Het effect van UV/H_2O_2 op de verwijdering van ESBL kon niet aangetoond worden in deze pilot, omdat de filtratietechniek alle ESBL al had verwijderd. De genconcentraties van enkele resistentiegenen lijken in enkele monsters nog af te nemen na UV/H_2O_2, wat zou kunnen duiden op een extra effect op de nog aanwezige resistentigenen.

5.5 FILTRATIETECHNIEKEN IN COMBINATIE MET OXIDATIE

Er zijn twee pilots waarin filtratietechnieken in combinatie met oxidatie zijn onderzocht:

- Nanofiltratie in combinatie met UV/H_2O_2 bij rwzi Asten. Er zijn verschillende poriegroottes en UV-doseringen getest.
- Ozon plus keramische microfiltratie bij rwzi Wervershoof.

Figuur 5.14 geeft de log-verwijdering aan van E.coli en ESBL van deze technieken.

Figuur 5.14 **Log-verwijdering van *E. coli* en ESBL bij de pilots filtratietechnieken. De log-verwijdering bij beide Asten (NF en UV.H_2O_2) en Wervershoof ozon+filter is hoger is dan de log-verwijdering die is aangegeven, omdat na de techniek de waarde onder de detectielimiet lag**

Beide filtratietechnieken verwijderen ESBL en *E. coli* tot de detectielimiet, waardoor het echte verwijderingsrendement niet goed is vast te stellen. De log-verwijdering is meer dan 4 log-eenheden voor *E. coli* en meer dan 2 log-eenheden voor ESBL. De nanofiltratie (alle geteste poriegroottes) en het filterdoek zijn effectieve methodes om ESBL te verwijderen.

In figuur 5.13 is de genconcentratie van enkele antbioticaresistentiegenen van de NF in Asten al weergegeven. Hieruit blijkt dat er een duidelijke afname van enkele resistente genen na nanofiltratie is. Ook is duidelijk dat de afname in genconcentraties toeneemt bij een kleinere poriegrootte.

In figuur 5.11 is de genconcentratie voor Wervershoof al weergegeven.

Er is een afname te zien in het aantal genen na filter, deze is zichtbaar in een beperkt aantal specifieke genen.

Geconcludeerd wordt dat filtratie technieken (nano- en/of microfiltratie) uitstekend in staat zijn om antibioticaresistente bacteriën en genen te verwijderen.

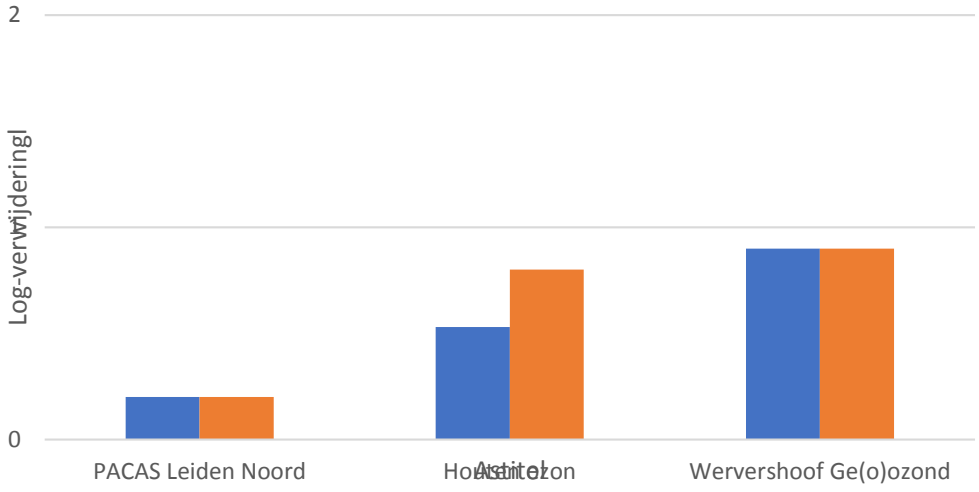
5.6 DEMO-INSTALLATIES

Er zijn drie demo installaties onderzocht:

- De PACAS installatie in Leiden Noord
- De Ozoninstallatie in Houten met een ozondosering van 0,4 gO_3/ gDOC
- Ge(o)zond in Wervershoof met een ozondosering van 1,0 — 1,1 gO_3/gDOC.

Figuur 5.15 geeft de log-verwijderingen van de demo-installaties. Hieruit blijkt dat geen van deze installaties veel ESBL verwijderen.

Figuur 5.15 **Log-verwijdering van *E. coli* en ESBL bij de demo-installaties PACAS Leiden Noord, Ozon in Houten, en Ge(o)zond te Wervershoof**



Al deze resultaten komen nagenoeg overeen met de resultaten van de pilot-installaties:

- Poeder Actief Kool geeft geen verwijdering van antibioticaresistente bacteriën (ESBL) en genen.
- Ozon heeft bij de doseringen die gebruikt worden in deze demo-installaties een gering effect.
  - De dosering in Houten van 0,4 gO_3/ gDOC geeft een log-verwijdering van 0,5 voor ESBL en 0,8 voor *E. coli*. Dat is vergelijkbaar met de pilot O_3-STEP, waar de log-verwijdering bij deze dosering 0,4 was voor ESBL;
  - De dosering van 1 gO_3/gDOC bij Ge(o)zond geeft hier log-verwijdering van 0,9 voor *E. coli* en ESBL.

De resultaten van de genen worden hier niet grafisch weergegeven, omdat er geen verschillen zijn waargenomen tussen de verschillende monsters. Ook dit komt overeen met de resultaten van de pilots.

Geconcludeerd wordt dat PACAS ook in de demo-installatie geen antibiotica resistente bacteriën en genen verwijderd. De twee demo-installaties met ozon hebben een relatief lage dosering, waardoor nauwelijks antibioticaresistente bacteriën en genen worden verwijderd.

6

CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN

In dit hoofdstuk worden conclusies getrokken en de resultaten nader bediscussieerd. Er wordt ingegaan op de representativiteit van de metingen, de verwijdering van antibioticaresistente bacteriën en resistentiegenen door vergaande zuiveringen. Er wordt geëindigd met enkele slotopmerkingen over de betekenis van het onderzoek voor de keuze voor een vergaande zuiveringstechniek en aanbevelingen gedaan.

6.1 REPRESENTATIVITEIT VAN DE RESULTATEN

Deze meetcampagne heeft zich gericht op de rwzi's waar de pilotonderzoeken uit de IPMV hebben plaatsgevonden. Er is niet actief geprobeerd een representatief beeld van de Nederlandse rwzi's te krijgen, en al helemaal niet ten aanzien van de mate van belasting met antibioticaresistentie. De gevonden concentraties in het reguliere effluent vallen binnen normale ranges die bij andere Nederlandse rwzi's zijn gevonden.

In het huidige onderzoek zijn er maar een beperkt aantal locaties bemonsterd en het aantal herhalingen per techniek en/of instelling is beperkt: de rwzi's zijn 1 tot 10 keer bemonsterd, elke instelling maximaal 2 keer. De waargenomen prestaties van de vergaande zuiveringstechnieken moeten dan ook als indicatief beschouwd worden en kunnen slechts met de nodige voorzichtigheid naar andere locaties door vertaald worden. Om een goed onderbouwde uitspraak te kunnen doen over de prestaties van vergaande zuiveringstechnieken ten aanzien van de verwijdering van antibioticaresistente bacteriën en resistentiegenen is frequenter bemonsteren gewenst, om zodoende ook de variatie in concentraties en genensamenstelling mee te kunnen nemen.

In alle rwzi-effluenten in deze studie komen zowel ESBL bacteriën als resistentiegenen voor. De gevonden waarden van de ESBL liggen tussen de 2,5 en 4,5 log-eenheden en is vergelijkbaar met de resultaten gevonden in de studies van Blaak et. al, 2015.

6.2 VERWIJDERING VAN ANTIBIOTICARESISTENTIE DOOR VERGAANDE ZUIVERINGSTECHNIEKEN

Er is relatief weinig bekend van de efficiëntie van zuiveringstechnieken op antibioticaresistentie. De verwachte verwijdering beschreven in paragraaf 3.6 wordt vergeleken met de resultaten in deze studie.

- **Adsorptie (poeder of granulair kool en niet-fossiele materialen)**
  De technieken gebaseerd op adsorptie (PAK, GAK en overige materialen) verwijderen, zoals verwacht, nagenoeg geen ESBL en resistentiegenen. De gevonden verwijderingrendementen waren voornamelijk rond de 0 tot 0,5 log-eenheid en in lijn met de waarden gevonden in de literatuur.

- **Oxidatieve technieken**
  De effectiviteit van oxidatieve technieken op pathogenen (en dus ook antibioticaresistente bacteriën) hangt (naast de vuilgraad van de te behandelen stroom) sterk af van de dosering en de contacttijd (met de overgebleven restconcentratie).

De resultaten uit deze studie bevestigen dat beeld. De pilots met ozon hadden voornamelijk een relatief lage dosis (<0,45 g O_3/g DOC) en werden er nagenoeg geen antibioticaresistente bacteriën verwijderd (< 1 log-eenheid), bij de pilots met een hogere dosis is de verwijdering hoger voor de antibioticaresistente bacteriën (1 maal 2 log en eenmaal 4 log), maar was het effect op de resistentiegenen lager tot maximaal 1,5 log.

Het effect van UV/H_2O_2 op de verwijdering van ESBL kon niet aangetoond worden in deze pilot, omdat de stap ervoor (nanofiltratie) alle ESBL al had verwijderd.

- **Filtratietechnieken (nano- en microfiltratie)**
  Beide onderzochte filtratietechnieken in deze studie (nanofiltratie en keramische microfiltratie) verwijderen ESBL en *E. coli* tot de detectielimiet (is deze beschreven, misschien hier ook nog even noemen), waardoor het echte verwijderingsrendement niet goed is vast te stellen. De log-verwijdering is meer dan 4 log-eenheden voor *E. coli* en meer dan 2 log-eenheden voor ESBL. Verwacht werd dat nanofiltratie een hoger verwijderingrendement (>5 log) zou geven dan microfiltratie (2-4 log) voor resistente bacteriën. In deze studie kon, vanwege de aantallen ESBL in het influent van de pilots, dit verschil niet worden aangetoond.

  Er is in de literatuur nog weinig bekend over de verwijdering van resistentiegenen in zuiveringen. In deze studie is bij beide technieken afname in de concentratie van resistentiegenen zichtbaar na NF of MF: deze afname is bij de nanofiltratie met de kleinste poriën hoger dan bij de hogere poriegroottes of MF. Voor de verwijdering van resistentiegenen lijkt NF effectiever dan MF, afhankelijk van de poriegrootte.

  De nanofiltratie (alle geteste poriegroottes) en het filterdoek zijn goede methodes om *E. coli* en ESBL te verwijderen.

6.3 RELATIE E.COLI EN ANTIBIOTICARESISTENTE BACTERIËN IN RWZI-AFVALWATER

De analyse van *E. coli* is eenvoudiger en goedkoper dan antibiotica resistente bacteriën. Uit eerdere onderzoeken lijkt het dat voor rioolwater een verband is tussen de aanwezigheid van *E. coli* en ESBL. In dit onderzoek is gekeken of dit verband er ook is als rwzi-effluent vergaand gezuiverd wordt.

Uit de resultaten blijkt er inderdaad een verband: de logaritmische waarden van *E. coli* zijn ongeveer 2 maal de waarden van ESBL in nagenoeg alle onderzochte pilots, onafhankelijk van de soort techniek. Deze verhouding blijft gelijk na de zuiveringsstap.

Deze resultaten geven aan dat de verwijdering van *E.coli* een goede indicator is voor de verwijdering van ESBL bij vergaande zuiveringen.

6.4 SLOTOPMERKINGEN

Het uitgevoerde onderzoek geeft meer inzicht in de bijvangst in de vorm van verwijdering van antibioticaresistentie bij de toepassing van vergaande zuiveringstechnieken. Ten aanzien van de antibioticaresistentie verwijdering lijken filtratietechnieken (NF of MF) het meest veelbelovend.

Daar waar relevant (hergebruik of lokale lozingssituatie) wordt aanbevolen om bij de keuze voor een vergaande zuiveringstechniek naast alle andere factoren ook de effectiviteit van de verwijdering van antibioticaresistentie (zowel bacteriën als genen) mee te wegen. Daarnaast is het van belang dat het gehele rwzi-effluent wordt behandeld met deze techniek: bij een deelbehandeling zal een verwijdering van enkele log-eenheden te niet worden gedaan door de hoge aantallen ESBL in de onbehandelde stroom. (belangrijke opmerking met grote consequenties)

Om de bevindingen uit dit onderzoek te verifiëren is uitgebreidere monitoring van de verschillende technieken wenselijk.

In deze studie is alleen antibioticaresistentie meegenomen. Echter, afvalwater en rwzi-effluent bevat vele pathogenen (zoals ook zichtbaar in deze studie omdat alle rwzi-effluenten nog hoge concentraties ESBL en *E. coli* hadden). De verwijdering van bacteriële pathogenen in vergaande zuiveringen zal vergelijkbaar zijn met de resultaten van de ESBL, de verwijdering van virale pathogenen met de verwijdering van genen.

Indien er ambities zijn om rwzi-effluent te her/gebruiken als zwemwater, in de landbouw of anderszins zijn pathogenen (inclusief antibioticaresistentie) en de verwijdering hiervan cruciaal vanwege de potentiële gezondheidsrisico's. Afhankelijk van welke toepassing het betreft is het noodzakelijk om voor zwemwater (of de strengste klasse voor hergebruik voor de landbouw) 5 tot 6 log-eenheden te verwijderen (99,999%), maar voor andere toepassingen zoals gebruik voor gewassen die nog verder behandeld worden is een verwijdering van 2 tot 3 log voldoende.

6.5 AANBEVELINGEN

Aanbevolen wordt om bij her/gebruik van rwzi-effluent aandacht te hebben voor de gezondheidsrisico's bij het direct gebruik hiervan, omdat er nog pathogenen en antibioticaresistentie in rwzi-effluent aanwezig zijn. Een aanvullende zuivering is dan, afhankelijk van de toepassing (zie hierboven), noodzakelijk. Let hierbij ook op de bypass bij hogere aanvoer.

Om de conclusies uit dit onderzoek ten aanzien van effecten van zuiveringstechnieken op de verwijdering van antibioticaresistentie te verifiëren is uitgebreidere monitoring van verschillende technieken wenselijk. Start met het meten van *E. coli* (op TBX) in influent en effluent van technieken als maat voor ABR-verwijdering.

Daar waar relevant wordt aanbevolen om bij de keuze voor een vergaande zuiveringstechniek voor de verwijdering van organische microverontreinigingen naast alle andere factoren ook de aanwezigheid van pathogenen, antibioticaresistente bacteriën en resistentiegenen mee te wegen.

7

LITERATUUR

Blaak, H., de Kruijf, P., Hamidjaja, R.A., van Hoek, A.H.A.M., de Roda Husman, A.M. and Schets, F.M. (2014) Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. Vet Microbiol 171(3-4), 448-459.

Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M. and de Roda Husman, A.M. (2015) Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Dutch Surface Water and Wastewater. PLoS One 10(6), e0127752.

Blaak H, Schilperoort R, Schmitt H. (2018) Rol van afvalwater bij verspreiding van antibioticaresistentie. STOWA-Rioned 2018-11

Blaak H, Kemper M, Pijnacker R, Mughini Gras L, De Roda Husman AM, Schets C, Schmitt H. Resistente darmbacteriën bij open water zwemmers RIVM Briefrapport 2019-0113 H.

H. Blaak (auteur), RIVM M.A. Kemper (auteur), RIVM R. Pijnacker (auteur), RIVM L. Mughini Gras (auteur), IRAS A. M. de Roda Husman (auteur), RIVM C. Schets (auteur), RIVM H. Schmitt (auteur), RIVM

Clevering-Loeffen, P., N. Moradi, J. van den Bulk en M. Hoek (2024). Evaluatie Innovatieprogramma microverontreinigingen uit rwzi-afvalwater (IPMV). Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Amersfoort. STOWA rapportnummer 2024-28.

Leenen EJTM (2015). Stand van zaken pathogenen, antibiotica en antibioticaresistentie. STOWA 2015-41

Lüddeke F, Hess S, Gallert C, Winter J, Gude H, Loffler H. (2015) Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. Water research. 2015 Feb 01;69:243-51. PubMed PMID: 25497174.

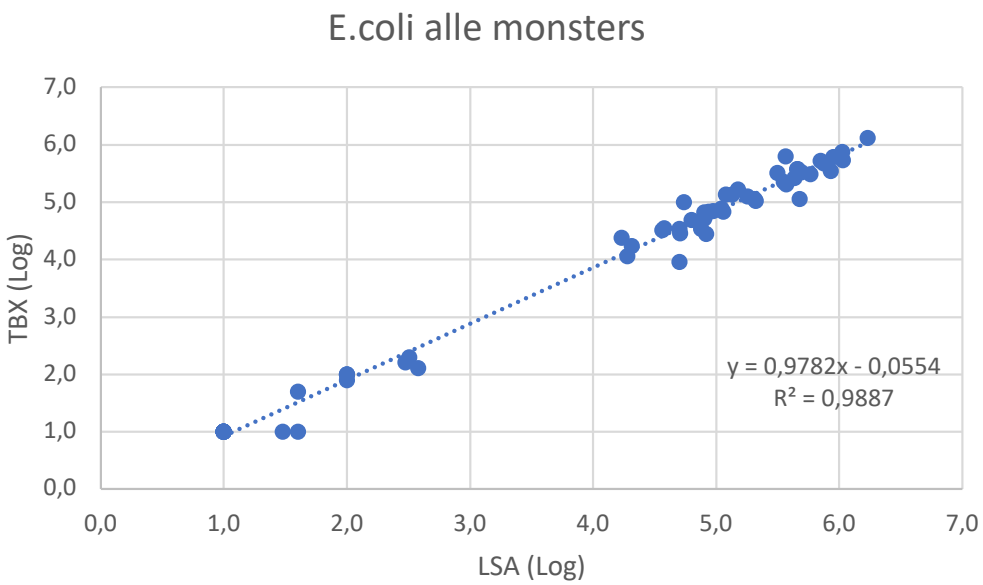
Pei M, Zhang B, He Y, Su J, Gin K, Lev O, et al. (2019) State of the art of tertiary treatment technologies for controlling antibiotic resistance in wastewater treatment plants. Environment international. 31:105026. PubMed PMID: 31351383.

Schmitt H, Blaak H, Kemper M, van Passel M, Hierink F, Van Leuken J, et al. (2017) Bronnen van antibioticaresistentie in het milieu en mogelijke maatregelen.

Van der Zaan, BTO rapport 2024.049, KWR

BIJLAGE I

RELATIE TWEE ANALYSEMETHODEN *E. COLI*

In deze studie is *E. coli* op twee manieren bepaald. De standaardmethode voor het bepalen van *E. coli* in (drink)water (LSA) is vergeleken met de methode voor het bepalen van *E. coli* in meer vervuilde matrices (TBX), omdat onbekend was welke methode het beste is voor rwzi-afvalwater.

De waarden van beiden methoden zijn met elkaar vergeleken de resultaten worden hieronder weergegeven. Beide methoden geven vergelijkbare waarden