

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

Bedrijfstakonderzoek  
BTO 2020.028 | December 2020

**Biologische afbraak van  
organische  
microverontreinigingen  
in snelfilters van de  
drinkwaterzuivering**

Bedrijfstakonderzoek

**KWR**

Bridging Science to Practice



# Rapport

## Biologische afbraak van organische microverontreinigingen in snelfilters van de drinkwaterzuivering

BTO 2020.028 | December 2020

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

### Opdrachtnummer

402045-039 en 402045-032

### Projectmanager

Michiel Hootsmans en Erwin Beerendonk

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

BTO - Thematisch onderzoek - Zuivering

### Auteurs

Dr. ir. Nikki van Bel, dr. ir. Cheryl Bertelkamp, dr. Peer Timmers

### Kwaliteitsborgers

dr. Paul van der Wielen (gedelegeerd aan dr. Anthony Verschoor en ing. Leo Heijnen), prof. dr. Emile Cornelissen

### Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

### Keywords

Biodegradatie, biologische afbraak, organische microverontreinigingen, BTO, snelfilter, pyrazool, metformine

Jaar van publicatie  
2020

Meer informatie  
dr. ir. Nikki van Bel  
T 030-6069516  
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E info@kwrwater.nl  
I www.kwrwater.nl

**KWR**

December 2020 ©

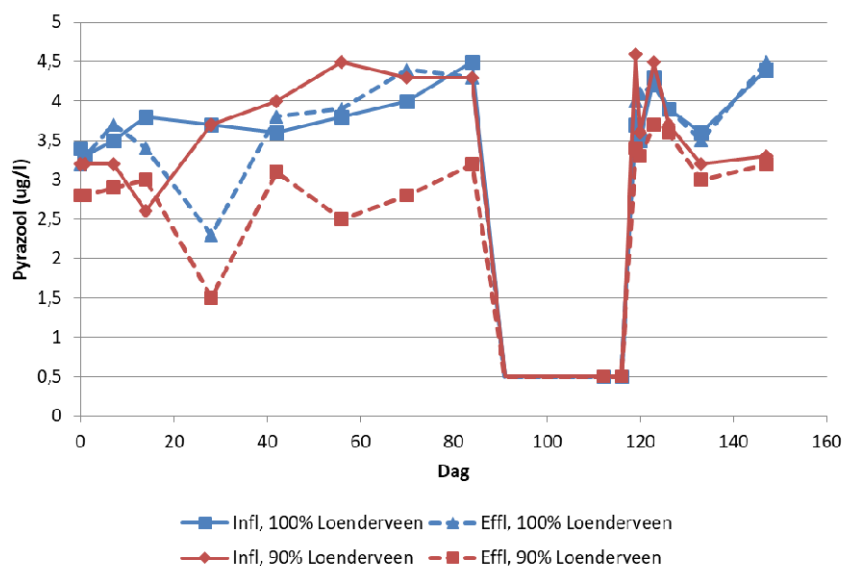
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier.

# Managementsamenvatting

## Verbetering afbraak OMV's mogelijk door identificatie van betrokken micro-organismen

**Auteurs** Dr. ir. Nikki van Bel, dr. ir. Cheryl Bertelkamp, dr. Peer Timmers.

Met behulp van experimenten zijn micro-organismen geïdentificeerd die in de drinkwaterproductie betrokken kunnen zijn bij de afbraak van pyrazool en metformine. Deze kennis kan gebruikt worden om bestaande snelfilters te enten met deze specifieke bacteriën om zo de verwijdering van specifieke OMV's (bijv. pyrazool) te verbeteren. Mogelijk is de in dit onderzoek ontwikkelde methodiek voor het identificeren van bacteriën ook toepasbaar op andere biologische processen zoals actief-kool en langzame zandfilters. Het enten van de opgekweekte en geïdentificeerde bacteriën (10% entmateriaal) in een laboratorium-schaal kolom gevuld met filtermateriaal dat geen pyrazool kon afbreken, demonstreerde dat het na 4 weken mogelijk was pyrazool te verwijderen. De afbraakcapaciteit bedraagt dan 20-40%. Na een doseerstop van 4 weken, blijkt bij herdosering de kolom binnen eenzelfde periode niet meer in staat om in dezelfde mate pyrazool af te breken. Voordat het concept van enten in de praktijk toepasbaar is, zal eerst onderzocht moeten worden wat de limiterende condities zijn die een verregaande afbraak (>95%) van pyrazool hinderen evenals de teruglopende verwijdering na een doseerstop. Daarnaast moet ook gekeken worden of het concept toepasbaar is op andere OMV's (zowel enkele stoffen als mengsels) en of de verbeterde verwijdering ook op de lange termijn stand houdt.



Verwijdering van pyrazool in het inoculatie-experiment

### Belang: Verwijdering van pyrazool in het inoculatie-experiment

Verwijdering van OMV's in biologische processen tijdens drinkwaterproductie kan mogelijk worden verbeterd. Hiervoor is echter meer kennis en inzicht nodig over biologische afbraakprocessen in snelfilters, en waarschijnlijk ook in andere

biologische zuiveringsprocessen. Daarnaast helpt het wanneer bekend is welke bacteriesoorten verantwoordelijk zijn voor de biologische afbraak van specifieke OMV's. Ook moet worden onderzocht of en hoe de biologische afbraak in snelfilters verbeterd kan worden door bijvoorbeeld te enten met deze

micro-organismen of de bedrijfstechnische parameters hiervoor te optimaliseren.

### **Aanpak: OMV verwijdering in snelfilters en identificatie verantwoordelijke micro-organismen**

In deze studie is de verwijdering van OMV's in de snelfilters van acht full-scale drinkwaterproductielocaties gemeten. De verschillen tussen de populaties micro-organismen zijn in kaart gebracht. Daarnaast is in het laboratorium met batch- en kolom-experimenten onderzocht of biologische afbraak van metformine en pyrazool plaatsvindt met materiaal van snelfilters. Met behulp van deze ophopingsexperimenten zijn micro-organismen geïdentificeerd die hiervoor mogelijk verantwoordelijk zijn. Tevens is op laboratoriumschaal onderzocht of snelfilters, waarin pyrazool niet biologisch wordt afgebroken, geënt kunnen worden met pyrazool-afbrekend filtermateriaal om zo dit proces op te starten.

### **Resultaten: Biologische afbraak OMV's in snelfilters, betrokken micro-organismen geïdentificeerd**

Full-scale snelfilters zijn in staat om meerdere OMV's (gedeeltelijk) te verwijderen. Welke OMV's worden verwijderd en de mate waarin dit gebeurt, verschilt tussen de productielocaties.

In laboratoriumexperimenten waarin snelfilters werden gesimuleerd, vond afbraak plaats van metformine en pyrazool. Een aantal kandidaat micro-organismen (genera) die mogelijk betrokken zijn bij de afbraak van pyrazool en metformine zijn: *Pirellula*, *Ottowia*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, *Hyphomicrobium*, *Gemmata* en micro-organismen behorende bij de klasse subgroup 17.

Bij enting van pyrazool-afbrekende micro-organismen op filtermateriaal dat deze

verontreiniging niet zelf kan afbreken, moest een relatief hoog volume entmateriaal worden toegepast (10%). Het duurde ongeveer 4 weken voordat de afbraak startte en de verwijdering bleef beperkt (20-40%). Na een tijdelijke doseerstop werd bij herstart van doseren in de eerste 4 weken minder pyrazool verwijderd. Hieruit blijkt dat het concept gevoelig is voor variaties in de influent-concentratie (aan-/afwezigheid van OMV's). Deze aspecten moeten verder worden onderzocht.

### **Toepassing: verbeteren verwijdering OMV's in snelfilters**

Hoewel met kennis over de biologische afbraak van OMV's in snelfilters een grote stap voorwaarts is gemaakt, is verder onderzoek nodig voordat dit toepasbaar is in de praktijk.

### **Het Rapport**

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Biologische afbraak van organische microverontreinigingen in snelfilters van de drinkwaterzuivering* (BTO-2020.028).

Delen van dit onderzoek zijn gepubliceerd in de volgende peer-reviewed artikelen:

- Organic micropollutant removal in full-scale rapid sand filters used for drinking water treatment in The Netherlands and Belgium (Di Marcantonio *et al.*, 2020), *Chemosphere* 260, pp. 127630.
- Bioaugmentation/biostimulation of rapid sand filters for rapid OMP degradation in drinking water treatment plants: a review of state of the art knowledge and knowledge gaps (Bertelkamp *et al.*, 2020), in voorbereiding.

Jaar van publicatie  
2020

Meer informatie  
dr. ir. Nikki van Bel  
T 030-6069516  
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E info@kwrwater.nl  
I www.kwrwater.nl

**KWR**

Juni 2020 ©

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier



## Bedrijfsparagraaf

Drinkwaterbedrijven treffen steeds vaker nieuwe (on)bekende stoffen aan in het ruwe water voor drinkwaterproductie. Er zijn verschillende zuiveringsstrategieën mogelijk om deze stoffen uit het water te verwijderen, elk met voor- en nadelen. Sommige processen (b.v. geavanceerde oxidatie en membraanfiltratie) kunnen deze stoffen uit het water verwijderen, maar hebben als nadeel dat ze vaak energie-intensief zijn en gebruik maken van chemicaliën. Biologische processen, zoals snelfilters, oeverfiltratie, biologisch actieve-koolfiltratie, duinpassage en langzame zandfiltratie kunnen mogelijk ook ingezet worden voor OMV verwijdering. Van sommige zuiveringen is bekend dat zij bepaald OMV's biologisch kunnen afbreken, maar het onderliggende proces is onbekend en er kan niet actief op gestuurd worden. Biologische afbraak van OMV's heeft niet de bovengenoemde nadelen en kunnen een alternatief zijn voor OMV verwijdering met fysisch/chemische processen. Biologische afbraak van OMV's kan ook een oplossing zijn voor het behandelen van de sterk geconcentreerde afvalwaterstroom die ontstaat na membraanfiltratie of reverse osmosis.

Biologische afbraak is een duurzame oplossing die in theorie zowel op ruw water als op een geconcentreerde afvalwaterstroom kan worden toegepast. Daarnaast worden snelfilters en andere biologische processen al gebruikt voor drinkwaterproductie en hoeft de zuivering daarvoor niet aangepast te worden. Dit is een groot voordeel, al zijn de drinkwaterbedrijven uiteraard bereid om een extra zuiveringsstap te plaatsen als dit nodig blijkt te zijn. Dit heeft echter meestal niet de voorkeur.

Afbraak van organische microverontreinigingen (OMV's) door micro-organismen in bestaande biologische zuiveringsprocessen wordt door de meeste drinkwaterbedrijven als een potentieel interessant alternatief gezien om OMV's uit het water te verwijderen en/of om te zetten. Al verschilt de prioriteit tussen de drinkwaterbedrijven: een aantal bedrijven zet (eerst) in op verwijdering (membraanfiltratie) van OMV's en als dit niet mogelijk is, op het omzetten van de stoffen met chemische of biologische processen. Andere bedrijven richten zich meteen op biologisch omzetten, mits dit uiteraard mogelijk en effectief genoeg is.

De drinkwaterbedrijven zijn het erover eens dat er meer kennis en inzicht nodig is voordat deze techniek toegepast kan worden in de praktijk, en hier ook op gestuurd kan worden. Vragen die hierbij leven zijn o.a.: hoe werkt biologische afbraak? Wat is mogelijk en wat is niet mogelijk? Kan het toegepast worden in de huidige drinkwaterzuiveringen en kan het proces gestuurd worden? Ontstaan er ongewenste bijproducten? Is biologische afbraak ook voor andere stoffen, zoals methaan, mogelijk?

Het doel van deze studie was om inzicht te krijgen in de biologische afbraakprocessen van OMV's in snelfilters tijdens drinkwaterproductie. Een belangrijk onderdeel hierin is het identificeren van micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van OMV's in de snelfilters. Met deze kennis is het theoretisch mogelijk om snelfilters die bepaalde OMV's niet af kunnen breken te enten met de juiste micro-organismen om zo toch afbraak van OMV's te bewerkstelligen. In dit onderzoek worden dus de eerste vragen van de drinkwaterbedrijven behandeld, maar de techniek om OMV-afbrekende micro-organismen te enten is nog niet ver genoeg om bewust toe te passen in de praktijk.

# Voorwoord

Dit rapport is het resultaat van een samenwerking tussen de themagroepen Zuivering en Biologische Veiligheid.

Halverwege het project is in samenwerking met een Italiaanse gastpromovendus en de themagroep Chemische Veiligheid gekeken naar transformatieproducten (van een selectie organische microverontreinigingen) die gevormd worden tijdens de biologische afbraak in snelfilters van oppervlaktewaterzuiveringen. Het resulterende artikel is opgenomen als bijlage bij dit rapport (Bijlage I).

Wij willen alle leden van de begeleidingsgroep bedanken voor hun betrokkenheid bij en feedback gedurende het hele project.



## Samenvatting

Het doel van deze studie was om inzicht te krijgen in de biologische afbraakprocessen van organische microverontreinigingen (OMV's) in snelfilters tijdens drinkwaterproductie. Een belangrijk onderdeel hierin is het identificeren van micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van OMV's in de snelfilters. Met deze kennis is het theoretisch mogelijk om snelfilters die bepaalde OMV's niet af kunnen breken te enten met de juiste micro-organismen om zo toch afbraak van OMV's te bewerkstelligen. Hoewel snelfilters van oudsher niet ontworpen zijn om OMV's te verwijderen heeft eerder onderzoek laten zien dat ze hier wel toe in staat zijn en deze functie kan mogelijk nog verder geoptimaliseerd worden. Belangrijk bij deze optimalisatie is dat de primaire taak van de drinkwaterzuivering, het produceren van microbiologisch veilig drinkwater, gewaarborgd blijft.

In een meetcampagne zijn acht full-scale snelfilters (van de Nederlandse drinkwaterbedrijven en De Watergroep) bemonsterd om vast te kunnen stellen welke OMV's deze filters konden verwijderen en ook in welke mate. Op basis van deze resultaten zijn twee OMV's gekozen om afbraakexperimenten in het laboratorium (ophopingsexperimenten) mee uit te voeren, namelijk metformine en pyrazool. Het doel van de meetcampagne was om één of meerdere stoffen te vinden die goed afbreekbaar waren in de snelfilters. Dit zou de kans op succesvolle ophopingsexperimenten aanzienlijk vergroten, omdat de verantwoordelijke bacteriën door het doseren van de stof moeten gaan groeien. Metformine is aangetroffen in het influent van de meeste snelfilters en bleek goed afbreekbaar in de snelfilters van de WRK in Nieuwegein. Daarbij is er veel informatie beschikbaar over biologische afbraak van metformine in RWZI's, maar over afbraak tijdens drinkwaterproductie is slechts beperkt wetenschappelijke literatuur beschikbaar. Pyrazool is gekozen vanwege de ervaringen met de lozing van hoge concentraties pyrazool in de Maas in de zomer van 2015 en het feit dat de snelfilters van verschillende locaties zeer verschillende pyrazoolverwijdering lieten zien. Over biologische afbraak van pyrazool in drinkwater- of afvalwaterzuiveringen is geen wetenschappelijke literatuur beschikbaar, uitgezonderd eerder onderzoek van KWR.

Het doel was om met behulp van deze experimenten de micro-organismen te identificeren die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van metformine en/of pyrazool in snelfilters. Indien bekend is welke micro-organismen betrokken zijn bij biologische afbraak van één of meerdere OMV's, kunnen deze in principe opgekweekt worden om te doseren aan snelfilters. Een andere mogelijkheid is om filtermateriaal van verschillende snelfilters uit te wisselen (enting van een filter) om zo afbraak van deze stoffen in bestaande snelfilters te verbeteren en te optimaliseren. Voordat dit principe in de praktijk kan worden toegepast, is aanvullend onderzoek nodig.

Er zijn twee soorten experimenten opgezet: ophopingsexperimenten in flessen en in kolommen. In flessen is filtermateriaal van de snelfilters van de WRK gemengd met het eigen influentwater waaraan pyrazool of metformine is gedoseerd. In de kolommen is ook filtermateriaal van de WRK geplaatst en deze kolommen zijn continu doorstroomt met influent water van de snelfilters van de WRK waaraan metformine of pyrazool is gedoseerd. In de tijd is de concentratie metformine of pyrazool gemeten in het water (flessen) of in het effluent (kolommen) om de (biologische) afbraak van deze stoffen te bepalen. De hypothese is dat de micro-organismen die deze stoffen afbreken toenemen in aantal en waardoor mogelijk ook de mate van afbraak stijgt. Om deze micro-organismen te identificeren is op verschillende momenten de microbiële samenstelling van het water en filtermateriaal bepaald. Deze experimenten worden afbraak- of ophopingsexperimenten genoemd.

In een laboratoriumschaal kolomexperiment is onderzocht of enten van een snelfilter, dat geen pyrazool kan afbreken, met filtermateriaal dat wel pyrazool kan afbreken effectief is om pyrazoolverwijdering op te starten. Hieruit bleek dat een ent van 10% filtermateriaal na ongeveer 4 weken resulteerde in 20 – 40% biologische afbraak

van pyrazool. Een verdere toename in verwijdering leek niet mogelijk in de huidige experimentele opzet. Een controle kolom die niet geënt was vertoonde geen afbraak van pyrazool na 4 weken.

Voordat dit ent-concept kan worden toegepast in de praktijk dient onderzocht te worden wat de limiterende factoren zijn die een verregaande verwijdering van pyrazool hinderen en er voor zorgen dat pyrazool niet meer wordt afgebroken na een doseerstop. Daarnaast zal er ook gekeken moeten worden of het ent-concept effectief is voor andere OMV's (bijv. toxicologisch relevante OMV's die moeilijk te verwijderen zijn in de drinkwaterzuivering). Tevens dient onderzocht te worden wat het effect is van het doseren van OMV mengsels (in plaats van het doseren van één enkele stof zoals pyrazool) op de samenstelling van de microbiële populatie en de potentie van deze populatie om deze OMV's om te zetten. Tenslotte dient er onderzoek gedaan te worden naar metabole/co-metabole afbraak van OMV's om te kijken of er bepaalde categorieën OMV's onderscheiden kunnen worden (metabool afgebroken OMV's, co-metabool afgebroken OMV's, of een combinatie van beide). Hierbij moet onderzocht worden welke nutriënten de co-metabolische afbraak stimuleren (bijv. ammonium en verschillende koolstofbronnen) en hoe de bacteriepopulatie zich ontwikkelt en welke enzymen geproduceerd worden (proteomics of qPCR op RNA of DNA van specifieke enzymen) om zo onderscheid te kunnen maken tussen actief betrokken micro-organismen en niet betrokken micro-organismen. Deze informatie zal ook inzicht bieden in voor welke OMV's een tijdelijke afwezigheid in het influent problematisch kan zijn (metabool afgebroken OMV's) en voor welke OMV's een tijdelijke afwezigheid in het influent geen effect zal hebben (co-metabool afgebroken OMV's).

# Inhoud

<b>Rapport</b>	<b>2</b>
<b><i>Managementsamenvatting</i></b>	<b>3</b>
<b>Bedrijfsparagraaf</b>	<b>6</b>
<b>Voorwoord</b>	<b>7</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>8</b>
<b>Inhoud</b>	<b>10</b>
<b>1    <b>Introductie</b></b>	<b>13</b>
1.1    Aanleiding en doel van het onderzoek	13
1.2    Doel	14
1.3    Projectonderdelen	14
<b>2    <b>Literatuurstudie: Nederlandse samenvatting</b></b>	<b>15</b>
2.1    Inleiding	15
2.2    Bacteriële afbraak van OMV's	16
2.3    Factoren voor biologische afbraak van OMV's	18
2.4    Identificatie van OMV-afbrekende bacteriën	19
2.5    Toepassing van bioaugmentatie en biostimulatie in snelfilters	24
2.6    Kennishiaten en toekomstig onderzoek	24
<b>3    <b>Materiaal en methoden</b></b>	<b>26</b>
3.1    Screening van oppervlaktewaterzuiveringen op verwijdering van OMV	26
3.1.1    OMV-screening mei en september 2018	26
3.1.2    Suspect screening	27
3.2    Opzet biologisch afbraakexperimenten in batch en kolom	30
3.2.1    Herkomst water en filtermateriaal	30
3.2.2    Batchexperimenten	31
3.2.3    Kolomexperimenten	33
3.2.4    Test filtermateriaal locatie Heel en Loenderveen in batchexperiment	34
3.2.5    Inoculatie-afbraakexperiment	35
3.3    Chemische analyses	37
3.3.1    Flessen voor OMV-analyses	37
3.3.2    Pyrazool	37
3.3.3    Metformine, guanylureum	38

3.4	Waterkwaliteitsparameters	38
3.4.1	Zuurstof, pH, EGV, temperatuur	38
3.4.2	UV-adsorptie (UV <sub>254</sub> )	38
3.4.3	Nitraat (NO <sub>3</sub> )	38
3.4.4	Microbiologische analyses	38
3.4.5	Opwerking filtermateriaal	38
3.4.6	ATP-bepaling	39
3.5	Next Generation Sequencing (NGS)	39
<b>4</b>	<b>Screening van oppervlaktewaterzuiveringen op verwijdering van OMV</b>	<b>40</b>
4.1	Inleiding	40
4.2	ATP resultaten	40
4.3	Verwijdering organische microverontreinigingen in snelfilters	41
4.4	Identificatie van gevormde transformatieproducten in snelle zandfilters	44
4.5	Keuze van stoffen voor afbraakexperimenten	45
<b>5</b>	<b>Biologische afbraak van OMV in laboratoriumexperimenten</b>	<b>46</b>
5.1	Afbraak van metformine en pyrazool in batch- en kolomexperimenten	46
5.1.1	Batchexperimenten	46
5.1.2	Kolomexperimenten	51
5.2	Inoculatie-experiment met variërende pyrazoolconcentratie in influent	54
5.2.1	Testexperiment Heel en Loenderveen	54
5.2.2	Resultaten inoculatie experiment	55
5.3	Verwijderingssnelheid pyrazool, metformine en guanyleureum in laboratoriumexperimenten	58
<b>6</b>	<b>Microbiële populatie tijdens biologische afbraak</b>	<b>59</b>
6.1	Batchexperimenten	59
6.1.1	Microbiële diversiteit	59
6.1.2	Microbiële populaties	60
6.2	Kolomexperimenten	62
6.2.1	WRK kolommen met metformine of pyrazool	63
6.3	Inoculatie experimenten	64
6.4	Differentiële abundantie van verschillende micro- organismen	66
6.5	Metformine tanks	73
6.6	IAZI en Noordbargeres	73
<b>7</b>	<b>Discussie</b>	<b>77</b>
7.1	Variatie in verwijdering tussen full-scale snelfilters	77
7.2	Metabool vs co-metabool	77
7.3	Inoculatie en variërende concentraties	78

7.4	Microbiële populaties	80
7.4.1	Batchexperimenten	80
7.4.2	Kolomexperimenten	81
7.4.3	Opkweken en identificeren van micro-organismen betrokken bij OMV afbraak	81
<b>8</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>83</b>
8.1	Conclusies	83
8.2	Aanbevelingen	84
<b>9</b>	<b>Referenties</b>	<b>86</b>
I	Organic micropollutant removal in full-scale rapid sand filters used for drinking water treatment in The Netherlands and Belgium	89
II	Foto's van filtermateriaal van bemonsterde snelfilters	90
III	Monsternamen en procesomstandigheden snelfilters tijdens meetcampagne	91
IV	Resultaten meetcampagne	95
V	Zuiveringsstappen van bemonsterde drinkwaterproductielocaties	98
VI	Aanvullende resultaten afbraakexperimenten	102
VII	Logboek kolomexperimenten	111

# 1 Introductie

## 1.1 Aanleiding en doel van het onderzoek

In drinkwaterbronnen, zoals oppervlaktewater en grondwater, kunnen lage concentraties (ng/L - µg/L) organische microverontreinigingen (OMV's) aanwezig zijn. Door maatschappelijke- en klimaatontwikkelingen (vergrijzing, verdroging, etc) kunnen de concentraties van deze stoffen toenemen in deze bronnen. Daarnaast hebben industriële lozingen een paar jaar geleden geleid tot hogere gehalten pyrazool en GenX in het oppervlaktewater wat resulteerde in tijdelijke innamestops bij enkele drinkwaterbedrijven. De verwachting is dat het aantal innamestops vanwege deze oorzaak zal toenemen. De kans is groot dat er in de komende jaren weer "nieuwe" stoffen zullen opduiken. Dit betekent dat de drinkwatersector, naast het beschermen van de bronnen, deze stoffen ook goed moet kunnen verwijderen.

Veel gebruikte zuiveringsprocessen voor het verwijderen van OMV's zijn membraanfiltratie, actief-kool, en (geavanceerde) oxidatie processen. Deze zuiveringsprocessen zijn alle in staat om een groot deel van de OMV's te verwijderen, maar hebben ook het nadeel dat ze vaak energie-intensief zijn en gebruik maken van chemicaliën. Biologische processen, zoals (zand en/of multimedia) snelfilters (SF), oeverfiltratie, biologisch actieve-koolfiltratie, duinpassage en langzame zandfiltratie zijn aanwezig in de zuivering om microbiologisch veilig water te produceren, maar kunnen mogelijk ook ingezet worden voor OMV verwijdering waardoor ze bovengenoemde nadelen niet of minder hebben en een alternatief kunnen zijn voor OMV verwijdering.

Diverse wetenschappelijke studies hebben aangetoond dat deze biologische processen een verscheidenheid aan OMV's kunnen verwijderen (1-6). Biologische processen zijn in veel Nederlandse drinkwaterzuiveringen al aanwezig. Er is dus (vaak) geen grote extra investering nodig om een nieuw proces te implementeren. Hierdoor kunnen ze een duurzame en milieuvriendelijke oplossing zijn voor de verwijdering van OMV's.

De microbiële populatie in biologische filters kan OMV's afbreken tot metabolieten, maar welke typen micro-organismen hiervoor verantwoordelijk zijn en onder welke omstandigheden dit mogelijk is, is nog grotendeels onbekend. Hierdoor wordt de verwijdering van OMV's in deze processen momenteel als bijvangst gezien. Indien er meer kennis wordt verkregen van de micro-organismen en de onderliggende mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van OMV's, wordt het wellicht mogelijk deze processen verder te optimaliseren voor OMV verwijdering. Moderne moleculaire technieken zoals Next Generation Sequencing (NGS) kunnen hierbij helpen door de samenstelling van de microbiële populatie in kaart te brengen. Ook kunnen mogelijk de micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor biologische afbraak van één of meerdere OMV's worden aangewezen. De verwachting is dat met de verkregen kennis drinkwater van hogere kwaliteit kosteneffectiever kan worden geproduceerd.

Momenteel is het nog grotendeels onbekend welke typen en in welke mate OMV's afgebroken kunnen worden in biologische zuiveringsprocessen van drinkwaterzuiveringen in Nederland en België (De Watergroep). Daarnaast is er nog geen kennis over de micro-organismen die hierbij betrokken zijn. Hoewel elke drinkwaterzuivering over het algemeen gekenmerkt wordt door één of meerdere biologische zuiveringsprocessen, is er voor gekozen in dit onderzoek alleen te kijken naar snelfilters. Snelfilters zijn onderdeel van bijna alle zuiveringen en de verwachting is dat de aanpak die hierbij wordt gebruikt in eventueel vervolgonderzoek gemakkelijk vertaald kan worden naar andere biologische processen zoals biologisch granulaire actieve koolfiltratie en langzame zandfilters.

## 1.2 Doel

Voorliggend rapport zal de volgende onderzoeksvragen trachten te beantwoorden:

- Welke types micro-organismen zijn (mogelijk) betrokken bij de afbraak van OMV's in snelfilters van oppervlaktewaterdrinkwaterzuiveringen in Nederland en België (De Watergroep)?
- Kan de afbraak van OMV's in biologische filtratieprocessen verbeterd/geoptimaliseerd worden door filters te enten met specifiek opgekweekte microbiële populaties?

## 1.3 Projectonderdelen

Een uitgebreide literatuurstudie is uitgevoerd naar de afbraak van OMV's in biologische filtratieprocessen van de drinkwaterzuivering (**Hoofdstuk 2**).

In **Hoofdstuk 3** staat de werkwijze en bemonsteringen van alle experimenten beschreven.

De resultaten van de meetcampagne waarmee de OMV verwijdering in acht full-scale snelfilters in Nederland en België (De Watergroep) is bepaald, worden beschreven in **Hoofdstuk 4** en Bijlage I. Een deel van de resultaten van de meetcampagne is, samen met aanvullende resultaten uit een gerelateerd project van themagroep Chemische Veiligheid (*Monitoring transformation product formation in drinking water treatment*) gepubliceerd in Chemosphere (**Hoofdstuk 4.4** en Bijlage I).

Op basis van de resultaten van de meetcampagne is het filter gekozen dat de meeste OMV's verwijdert. Filtermateriaal uit dit snelfilter is gebruikt voor biologische afbraakexperimenten met metformine en pyrazool (**Hoofdstuk 5.1**). Hierin werden de bacteriën die in staat zijn om metformine en pyrazool af te breken opgekweekt. Vervolgens is op laboratoriumschaal filtermateriaal (Loenderveen) ge-ent met deze opgekweekte bacteriën om de verwijdering van pyrazool in het snelfilter van Loenderveen op te starten. De resultaten van dit ent-experiment zijn beschreven in **Hoofdstuk 5.2**.

Van alle hierboven genoemde experimenten zijn monsters genomen om de samenstelling van de microbiële populatie te bepalen. Door systematisch relaties te onderzoeken tussen de experimentele condities (b.v. aan- of afwezigheid van OMV) en veranderingen in de microbiële populatie is getracht te achterhalen welke micro-organismen een rol zouden kunnen spelen in de afbraak van OMV's (**Hoofdstuk 6**).

Op verzoek van de themagroepen en begeleidingsgroepen zijn ook monsters genomen bij een industriële afvalwaterzuivering waar onder andere afbraak van pyrazool plaats vindt in de biologische zuivering. Daarnaast zijn ook monsters genomen van de snelfilters van Noordbargeres, een grondwaterproductielocatie van WMD, waar ook meerdere OMV's worden afgebroken. De microbiële populatie hiervan is vergeleken met die in de afbraakexperimenten en de meetcampagne (**Hoofdstuk 6.6**).

In **Hoofdstuk 7** en **Hoofdstuk 8** worden vervolgens de resultaten eerst bediscussieerd en daarna samengevat tot de conclusies. Dit wordt afgerond met de aanbevelingen (**Hoofdstuk 8.2**).

## 2 Literatuurstudie: Nederlandse samenvatting

Hieronder is een uitgebreide samenvatting van de review paper (Bioaugmentation/biostimulation of rapid sand filters for rapid OMV degradation in drinking water treatment plants: a review of state of the art knowledge and knowledge gaps) opgenomen.

Het review paper (literatuurstudie) is nog niet geheel afgerond. Na afronding wordt het paper afgerond en ingediend bij een wetenschappelijk tijdschrift. Het definitieve review paper wordt later rondgestuurd aan de betrokken themagroepen.

### Bioaugmentation/biostimulation of rapid sand filters for rapid OMV degradation in drinking water treatment plants: a review of state of the art knowledge and knowledge gaps

#### - Nederlandse samenvatting -

C. Bertelkamp<sup>1</sup>, N. van Bel<sup>1</sup>, P. Timmers<sup>1</sup>, C. DiMarcantonio<sup>2</sup>, A. Verschoor<sup>1,7</sup>, E.C. Cornelissen<sup>1,3,4</sup>, P. van der Wielen<sup>1,5</sup>, N. Singhal<sup>6</sup>

#### 2.1 Inleiding

De organische microverontreinigingen (OMV's) bestaan uit een breed scala aan chemische stoffen, waaronder medicijnen, producten voor persoonlijke verzorging, pesticiden en industriële afvalproducten. Op verschillende manieren kunnen deze stoffen in het oppervlakte- en grondwater terecht komen waar ze aanwezig zijn in ng/l tot µg/l concentraties. Omdat grond- en oppervlaktewater gebruikt worden als bron voor de drinkwaterproductie leveren deze stoffen mogelijk een gevaar op voor de volksgezondheid als ze niet voldoende uit het water verwijderd worden. Drinkwaterbedrijven staan dus voor de uitdaging om deze OMV's tijdens drinkwaterproductie te verwijderen en zo hun aanwezigheid in het drinkwater te voorkomen. Zuiveringsprocessen als reverse osmosis, geavanceerde oxidatie en actief kool kunnen een groot deel van de OMV's verwijderen, maar dit zijn dure, energie-intensieve processen waarvoor chemicaliën nodig zijn. Een duurzamere oplossing is de biologische afbraak van OMV's door micro-organismen, die vaak al in biologische processen van de drinkwaterzuivering aanwezig zijn (b.v. snelfilters, langzame zandfilters en biologisch actief kool filters).

Het is bekend dat biologische afbraak van OMV's optreedt in biologische zuiveringsprocessen en dat het een effectieve maatregel is in de verwijdering van OMV's. De verschillen in OMV-afbraak tussen de zuiveringsstappen, en tussen dezelfde zuiveringsstappen op verschillende productielocaties, zijn echter groot. Dit wordt veroorzaakt door de grote variatie in aanwezige micro-organismen, of deze micro-organismen OMV's kunnen afbreken en de heersende procescondities. De meeste wetenschappelijke literatuur richtte zich in het verleden op de verwijderingscapaciteit van specifieke zuiveringsstappen (b.v. snelfilters) voor specifieke OMV's. Maar de onderliggende mechanismen en de micro-organismen die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn over het algemeen niet bekend. Hier wordt pas sinds enkele jaren onderzoek naar gedaan waardoor steeds meer duidelijk wordt, maar er ook nog veel vragen en onduidelijkheden zijn. Kennis over de verantwoordelijke micro-organismen en enzymen,



de afbraakmechanismen en het effect van procescondities hierop is essentieel om deze techniek in de praktijk te kunnen gaan toepassen en hierop te kunnen gaan sturen.

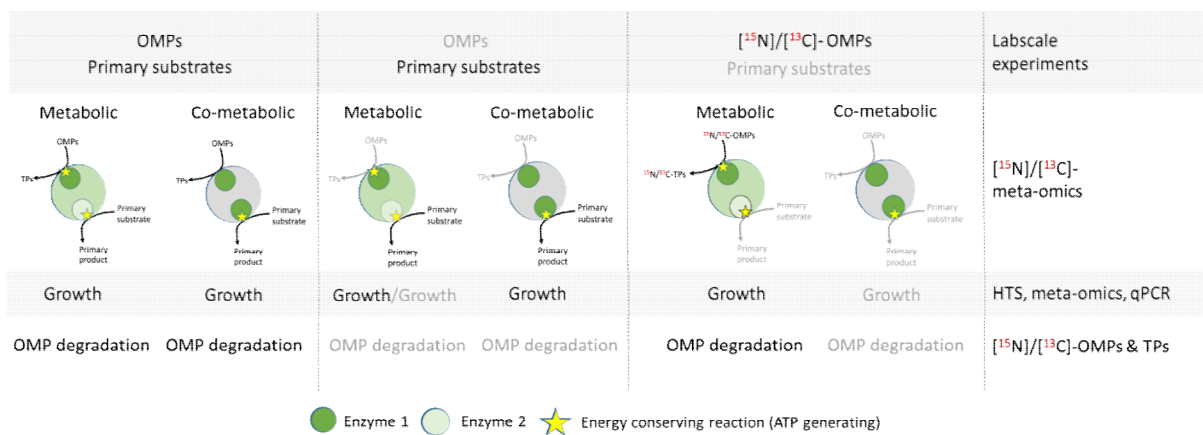
De afbraak van OMV's door micro-organismen in biologische zuiveringsprocessen, waar nog geen (of te weinig) biologische afbraak plaats vindt, kan in principe op twee manieren opgestart worden: bioaugmentatie en biostimulatie. Bioaugmentatie is het proces waarbij bepaalde bacteriële en/of schimmelstammen die de capaciteit hebben om OMV's af te breken, als inoculum worden toegevoegd aan het biologische filtermedium, waardoor de biologische afbraak van deze stoffen wordt versterkt of opgestart. Biostimulatie is het proces waarbij bepaalde voedingsstoffen (bijv. zuurstof, acetaat, nitraat, ammoniak, fosfor) aan het proces worden toegevoegd om de groei te bevorderen van de micro-organismen die OMV's kunnen afbreken en die van nature in deze biologische filters aanwezig zijn. Deze strategieën kunnen worden toegepast met een focus op alle OMV's, specifiek voor "problematische" OMV's in een zuiveringsinstallatie of om transformatieproducten te verwijderen die gevormd zijn tijdens een geavanceerd oxidatieproces voorafgaand aan de behandeling met het biologische filter. Zowel bioaugmentatie als biostimulatie worden al succesvol toegepast in bijvoorbeeld de bodemsanering en er lopen onderzoeken om dit principe toe te passen bij drinkwaterproductie. Veel is echter nog niet bekend of biostimulatie, bioaugmentatie en biologische afbraak van OMV's.

Deze literatuurstudie i) biedt een overzicht van de meest recente kennis over het concept van bioaugmentatie van biologische processen in drinkwaterbehandeling, ii) geeft inzicht in de mogelijkheden van bioaugmentatie/biostimulatie om de verwijdering van OMV in snelfilters te verbeteren en iii) geeft een inventarisatie van de kennishiaten en onderzoeksvragen die moeten worden aangepakt voordat dit concept daadwerkelijk kan worden geïmplementeerd. Deze punten worden in deze literatuurstudie behandeld, waarbij de focus vooral ligt op biologische afbraak van OMV's door bacteriën in snelfilters tijdens drinkwaterproductie.

We stellen twee benaderingen voor die kunnen worden gebruikt om bacteriën en/of enzymen te identificeren die OMV's kunnen afbreken: 1) een literatuuroverzicht van bijna 200 studies naar bacteriën die zijn geïdentificeerd als mogelijk OMV-afbrekende bacteriën, en 2) een experimentele opzet dat hoogstwaarschijnlijk kan worden gebruikt om bacteriën en/of enzymen die betrokken zijn bij OMV-afbraak te identificeren. Daarnaast worden de methoden beschreven die voor identificatie van deze bacteriën kunnen worden gebruikt en wordt een overzicht gegeven van factoren die de OMV-verwijdering in snelfilters.

## 2.2 Bacteriële afbraak van OMV's

Over de bacteriële afbraak van OMV's is nog veel onbekend: de verantwoordelijke bacteriën en enzymen zijn nog niet of nauwelijks geïdentificeerd en vaak zijn de afbraakmechanismen niet eenduidig te verklaren. Een OMV kan biologisch worden afgebroken als 1) er een micro-organisme aanwezig is dat de vereiste enzymen voor OMV-afbraak kan synthetiseren en 2) de juiste milieuomstandigheden aanwezig zijn om de OMV snel genoeg te kunnen afbreken.



*Figuur 1. Schematische illustratie van de verschillen tussen metabole en co-metabole afbraak van OMV's wanneer zowel OMV's als de primaire substraten aanwezig zijn (zwarte tekst) en wanneer ofwel geen OMV's ofwel andere primaire substraten aanwezig zijn (grijze tekst). Rechts staan technieken die in laboratoriumexperimenten kunnen worden gebruikt om het verschil tussen beide afbraakprocessen aan te tonen. Cirkels stellen bacteriecellen voor met verschillende enzymen (enzym 1 en 2, verschillende kleuren) die in staat zijn OMV's en/of het primaire substraat af te breken. Gele sterren stellen reacties voor waarbij energie (ATP) wordt gevormd en zo groei mede mogelijk maken.*

OMV's kunnen metabolisch, co-metabolisch of door een combinatie van beide worden afgebroken. Voor zowel metabolische als cometabolische afbraak moet het betrokken micro-organisme de vereiste enzymen produceren die de afbraak uitvoeren (Figuur 1). Bij metabole afbraak wordt de OMV afgebroken door OMV-specifieke enzymen waarbij energie vrij komt en zo groei mogelijk maakt. Voor cometabole afbraak zijn niet-specifieke enzymen nodig en lift de afbraak van de OMV als het ware mee op een ander proces. De OMV wordt dan niet als energiebron gebruikt, hier zijn andere stoffen voor nodig. In de praktijk is het echter lastig om onderscheid te maken tussen beide processen. Zo worden sommige OMV's metabool afgebroken in het ene proces, maar cometabool in het andere proces. Ook kan de afbraakroute van een OMV uit meerdere, achtereenvolgende, metabole en cometabole stappen bestaan. In de praktijk gebeuren beide processen dan ook vaak nagenoeg tegelijkertijd.

Van de ammonium oxiderende bacteriën (AOB) en methaan oxiderende bacteriën (MOB) is bekend dat die veel OMV's cometabool kunnen afbreken. Het enzym dat verantwoordelijk is voor ammonium oxidatie kan ook verschillende OMV's afbreken, dit gebeurt tegelijkertijd met de ammonium oxidatie. Deze bacteriën, met name de AOB, zijn al aanwezig in snelfilters voor drinkwaterproductie en in actief slib van afvalwaterzuiveringen.

Biologische verwijdering van OMV's in snelfilters wordt beïnvloed door verschillende parameters. Zo zijn er grote verschillen in de samenstelling van het influent water afkomstig van grond- en oppervlaktewater (b.v. ammoniumgehalte, organisch stofgehalte en aantallen en concentratie OMV's). De OMV-concentratie in het grond- en oppervlaktewater (ng – µg/L) is te laag voor bacteriën om als enige energiebron (mg/l) te gebruiken. Metabole afbraak van OMV's kan daarom alleen plaats vinden als er ook een andere energiebron aanwezig is.

Het kan soms dagen tot maanden duren voordat OMV's door snelfilters worden verwijderd, de zogenaamde 'lag phase'. Er zijn drie manieren waarop een microbiële populatie zich aan kan passen aan nieuwe omstandigheden, zoals de aanwezigheid van een nieuwe OMV: (1) genetische aanpassingen, (2) enzym productie en (3) de microbiologische populatie aanpassen. Door genetische veranderingen, b.v. door genoverdracht of mutaties, kunnen bacteriën ontstaan die bepaalde OMV's kunnen afbreken. Ten tweede kan de aanwezigheid van specifieke OMV's de productie van enzymen initiëren die geschikt zijn om deze OMV's af te breken. Ten derde kan het aantal bacteriesoorten dat een bepaalde OMV kan afbreken in het begin minimaal zijn, maar kan toenemen als de OMV vaker, of in hogere concentraties, aanwezig is.

### 2.3 Factoren voor biologische afbraak van OMV's

Biologische afbraak van OMV's wordt uitgevoerd door micro-organismen die in het snelfilter aanwezig zijn. De samenstelling van die microbiële gemeenschap wordt beïnvloed door vele parameters, waaronder de waterkwaliteit, de procesparameters en de eigenschappen van het filtermateriaal. Daarnaast lijkt de microbiële gemeenschap zich (onder bepaalde voorwaarden) aan te kunnen passen aan de afbraak van specifieke OMV's.

De samenstelling van het substraat (organisch koolstof in het influent water), de substraatconcentratie en de OMV-concentratie beïnvloeden de OMV afbraak. In drinkwatermilieus is de concentratie OMV's laag, wat moeilijker kan zijn voor bacteriën om deze af te breken. Een hogere concentratie OMV in het influent water leidt namelijk tot een hogere afbraaksnelheid en een kortere lag phase. Bij vergelijkbare redox- en substraatcondities kan de OMV-verwijdering aanzienlijk verschillen, dit wordt mogelijk veroorzaakt door verschillen in samenstelling, kwaliteit en kwantiteit van het organisch koolstof, resulterend in variaties in de microbiële populatie. Toekomstig onderzoek moet de rol van variatie in de substraatconcentratie en -samenstelling op de microbiële gemeenschap in het algemeen, maar specifiek met betrekking tot geïnculeerde bacteriestammen en hun OMV-verwijderingscapaciteit, duidelijk maken.

De temperatuur beïnvloedt meerdere processen: oplosbaarheid en dus beschikbaarheid van OMV's, enzymactiviteit en bacteriële groei. Over het algemeen groeien bacteriën sneller bij hogere temperaturen, en is ook de enzymactiviteit hoger. Hier zit echter een grens aan en elke bacterie en enzym heeft zijn eigen optimale en maximale temperatuur. De oplosbaarheid van een OMV neemt toe met een stijgende temperatuur en de afbraak van sommige OMV's wordt beïnvloedt door temperatuur, maar die van andere OMV's niet.

De pH beïnvloedt op verschillende manier de biologische afbraak van de OMV's: de pH bepaalt de lading van de OMV's waardoor het de sorptie van de OMV's aan het filtermateriaal kan beïnvloeden en het beïnvloedt ook transport van OMV's over het celmembraan, waarna deze door aanwezige enzymen kunnen worden afgebroken.

Het zuurstofgehalte in het water en de snelfilters (redox potentiaal) speelt een grote rol in de afbraak van OMV's. Sommige OMV's worden afgebroken onder oxidische (zuurstofrijke) omstandigheden, terwijl sommige stoffen juist alleen onder anoxische condities kunnen worden afgebroken. Daarnaast kan ook de zuurstofconcentratie onder oxidische condities de OMV-afbraak positief of negatief beïnvloeden. De redoxpotentiaal kan een belangrijke rol spelen bij het type micro-organismen dat kan groeien en dus OMV's kan afbreken. Bovendien zou het manipuleren van de redoxpotentiaal in snelfilters de bestaande microbiële populatie stimuleren om meer enzymen te produceren wat vervolgens tot een grotere OMV-afbraak leidt.

Bedrijfsvoering van snelfilters beïnvloedt de OMV-afbraak vooral via de contacttijd en het terugspoelregime. Een langere contacttijd zal meestal leiden tot meer OMV-afbraak, maar in de praktijk kan dit lastig toepasbaar zijn zonder de standaard functies van een snelfilter te veel te veranderen. Met terugspoelen wordt een deel van de biomassa verwijderd, waardoor ook de OMV-afbrekende bacteriën uitgespoeld kunnen worden. Dit lijkt vooral een probleem te zijn bij dosering van specifieke bacteriestammen aan het filterbed, omdat zij zich nog niet zo goed aan het filtermateriaal hechten als de al aanwezige micro-organismen. De samenstelling (materiaal, korrelgrootte, organisch stofgehalte, etc) van het filterzand speelt beïnvloedt ook de OMV-afbraak.

Toekomstig onderzoek moet de rol van de verschillende factoren (bv. waterkwaliteit, procesparameters en kenmerken van het filtermedium) nader onderzoeken om te begrijpen of en hoe deze kunnen worden aangepast om bioaugmentatie en biostimulatie van snelfilters succesvoller te maken en zo de OMV-afbraak te verhogen.

## 2.4 Identificatie van OMV-afbrekende bacteriën

Het identificeren van de micro-organismen en/of enzymen in een snelfilter, of ander biologisch proces, die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van OMV's kan lastig zijn. De kennis is echter nodig om de biologische afbraak van OMV's te verbeteren. Er zijn verschillende methoden beschikbaar om de verantwoordelijke bacteriën, eiwitten, enzymen en/of enzymatische activiteit te identificeren, maar ze hebben allemaal hun voor- en nadelen. Hieronder wordt beschreven welke beschikbare methoden er zijn en hoe ze tot nu toe in de literatuur zijn toegepast om microbiële gemeenschappen te karakteriseren en te identificeren. Ook wordt een overzicht gegeven van bacteriën die in de literatuur worden geïdentificeerd om bepaalde OMV's af te breken en geanalyseerd.

In een aantal studies is gekeken naar de microbiële populatie van full-scale snelfilters, maar dit is meestal op phylum niveau (b.v. *Proteobacteria*). Dit is een grote groep bacteriën waardoor deze informatie weinig inzichten oplevert. Een gedetailleerdere analyse tot op genus (b.v. *Escherichia*) of species (b.v. *E. coli*) niveau is nodig om te proberen verschillen tussen snelfilters te koppelen aan OMV-afbraak. Over het algemeen is er veel verschil in microbiële populatie tussen snelfilters van verschillende locaties en de mate waarin OMV's worden afgebroken. Kennis over de bacteriën die verantwoordelijk zijn voor OMV-afbraak is noodzakelijk om bioaugmentatie en biostimulatie toe te kunnen gaan passen, maar is nu nog maar mondjesmaat bekend. Inzicht in de belangrijkste bacteriesoorten die OMV's afbreken geeft de mogelijkheid om de milieu- en/of procescondities in snelfilters gericht te manipuleren en zo de kans op succesvolle bioaugmentatie en/of stimulatie te vergroten.

Resultaten van 200 wetenschappelijke papers over OMV-afbraak en de verantwoordelijke bacteriesoort(en), zijn gegeven in Tabel 1. De meeste bacteriën behoren tot de *Proteobacteria* (62,1%) en Actinobacteria (29,2%). De meest voorkomende genera zijn *Pseudomonas* (23,5%) en *Rhodococcus* (16,1%). *Pseudomonas*- en *Rhodococcus*-soorten de meeste verschillende OMV's afbreken: *Pseudomonas* (56 OMV's) and *Rhodococcus* (38 OMV's). Maar ook bacteriën van de genera *Enterobacter* (17 OMV's), *Ochrobactrum* (12 OMV's), *Microbacterium* (11 OMV's), *Variovorax* (11 OMV's), *Sphingomonas* (11 OMV's), *Acinetobacter* (10 OMV's), *Bacillus* (10 OMV's), *Arthrobacter* (9 OMV's), *Stenotrophomonas* (9 OMV's) en *Comamonas* (8 OMV's) kunnen meerdere OMV's afbreken (Tabel 1).

*Pseudomonas* en *Rhodococcus* zijn veel bestudeerd en worden veel in de bodemsanering gebruikt om koolwaterstoffen (b.v. PAH's) af te breken. De mechanismen die hiervoor door de bacteriën worden gebruikt lijken ook andere stoffen, zoals pesticiden, af te kunnen breken. Voor de meeste OMV's is echter niet bekend of ze biologisch afbreekbaar zijn en welke micro-organismen hiervoor verantwoordelijk zijn. Voor de meeste OMV's zijn slechts één (79 OMV's) of twee (41 OMV's) genera bekend die de stof kunnen afbreken. Sommige OMV's kunnen juist door meerdere bacteriesoorten worden afgebroken, zo wordt ETBE door 32 soorten afgebroken.

Verschuillende factoren beïnvloeden de verwijderingscapaciteit tussen verschuillende processen (b.v. snelfilters versus biologische actieve koolfilters) of zelfs binnen één proces (b.v. snelfilters van verschuillende locaties). Zo kunnen verschuillende bacteriesoorten dezelfde OMV via verschuillende metabolische routes afbreken en vertonen bacteriën verschuillende OMV-afbraaksnelheden. Sommige bacteriesoorten waarvan bekend is dat ze OMV's afbreken, zijn ook aangetroffen in full-scale snelfilters. Dit betekent echter direct dat deze bacteriën ook daadwerkelijk OMV's afbreken in het snelfilter. Dit wordt door veel verschuillende parameters beïnvloedt.

Naast een literatuurstudie kunnen OMV-afbrekende bacteriën ook experimenteel geïdentificeerd worden. Hiervoor kan filtermateriaal uit snelfilters, waarvan bekend is dat ze een specifieke OMV afbreken, verrijkt worden voor deze bacteriën door de specifieke OMV te doseren. In deze verrijkingsexperimenten kan ook onderscheid gemaakt worden tussen metabole en cometabole afbraak. Door de methoden uit Figuur 1 toe te passen, kan inzicht worden gekregen in het type afbraak (metabole en co-metabole) en de verantwoordelijke bacteriesoort(en) en enzymen. Uiteindelijk zal de bewuste bacteriesoort als reïncultuur opgekweekt moeten worden om zo definitief te bevestigen dat deze bacterie de OMV afbreekt.











## 2.5 Toepassing van bioaugmentatie en biostimulatie in snelfilters

Het toepassen van bioaugmentatie in snelfilters van drinkwaterproductie is een nieuw onderzoeksveld dat in een beperkt aantal studies is onderzocht. Deze studies zijn tot nu toe allemaal uitgevoerd op grondwaterzuiveringen. Hieruit blijkt dat direct na het toevoegen van de juiste OMV-afbrekende bacteriesoorten, de OMV wordt afgebroken terwijl de normale processen van snelfiltratie (b.v. ontijzering) niet aangetast worden. De gedoseerde bacteriën spoelen echter binnen enkele dagen/weken uit, waardoor er geen OMV-afbraak meer plaats vindt.

Opgekweekte OMV-afbrekende bacteriën kunnen als suspensie, of gehecht aan een dragermateriaal, aan het filterbed worden toegevoegd. Daarnaast kan het opkweken plaatsvinden onder statische of dynamische condities en kan een reïncultuur van bacteriën worden toegevoegd of juist een consortium van meerdere bacteriesoorten. In de meeste studies leidde het opkweken van bacteriën onder dynamische condities op een dragermateriaal tot minder uitspoeling na dosering aan de snelfilters. Ook lijkt het doseren van een consortium succesvoller dan wanneer een reïncultuur werd gedoseerd.

Zodra de juiste bacterie aan het snelfilter is toegevoegd, moet de aanwezigheid van de bacterie en de OMV-afbraak capaciteit in de tijd worden gemonitord. Daarnaast moet ook het effect van de gedoseerde bacteriestammen op de autochtone microbiële populatie in kaart worden gebracht. Hiervoor kunnen verschillende methoden worden gebruikt. De hechting van het totale aantal bacteriën aan het filtermateriaal geeft echter weinig informatie over de hechting van OMV-afbrekende bacteriën. Het is namelijk mogelijk dat, alhoewel de hechting van de totale bacteriepopulatie lager is, de OMV-afbrekende bacteriën wel goed hechten. Veel factoren zijn echter nog onduidelijk en moeten onderzocht worden om bioaugmentatie succesvoller te maken.

Er zijn verschillende factoren die succesvolle bioaugmentatie kunnen voorkomen: (1) het uitspoelen van gedoseerde bacteriën door normaal gebruik van snelfilters of door regulier terugspoelen, (2) beperkte hoeveelheid substraat (AOC) in het voedingswater, (3) graasactiviteit door protozoa of infectie van de gedoseerde bacteriën met bacteriofagen, (4) competitie met de autochtone micro-organismen, en (5) beschikbaarheid en soort nutriënten. De vertaling naar snelfilters in oppervlaktewaterzuiveringen voegt een extra moeilijkheid toe vanwege de grotere variatie van de samenstelling van het influent water, waaronder de OMV-concentratie. Door afwezigheid van de OMV in het influent water kunnen de OMV-afbrekende bacteriën verdwijnen en ook variatie in andere parameters kunnen de hechting van bacteriën aan het filtermateriaal beïnvloeden.

## 2.6 Kennishiaten en toekomstig onderzoek

Uit het literatuuronderzoek concluderen wij dat bioaugmentatie en/of biostimulatie een competitief alternatief zou kunnen zijn voor geavanceerde oxidatieprocessen en/of membraanfiltratieprocessen voor de verwijdering van OMV's. Bioaugmentatie/biostimulatie is een "groenere" technologie waarvoor geen chemicaliën nodig zijn en waarvoor relatief weinig energie nodig is, daarnaast wordt er geen concentraatstroom geproduceerd. Voordat bioaugmentatie/biostimulatie echter kan worden toegepast in snelfilters, moeten een aantal onderzoeksvragen worden beantwoord:

- 1 Welke bacteriën/enzymen zijn verantwoordelijk voor de OMV-verwijdering in snelfilters?
- 2 Is bioaugmentatie/biostimulatie ook haalbaar voor snelfilters die oppervlaktewater behandelen?
- 3 Wat is het effect van variaties in de waterkwaliteit op OMV-verwijdering (bijv. substraatsamenstelling, anorganische voedingsstoffen, OMV-concentratie, type OMV, etc)?
- 4 Hoe robuust is het proces van OMV-verwijdering in snelfilters?
- 5 Als één of meer OMV's tijdelijk afwezig zijn, kunnen de bacteriën daarna dan nog steeds OMV's (co-)metabolisch afbreken?

- 6 Wat zijn de limiterende factoren voor succesvolle bioaugmentatie/ biostimulatie en hoe kunnen deze verholpen worden?
- 7 Wat is de meest optimale inoculatiestrategie?
- 8 Met welke analyses kan de efficiëntie van bioaugmentatie/biostimulatie in snelfilters worden gemonitord?
- 9 Wat is het effect van bioaugmentatie/biostimulatie op de processen waarvoor snelfilters zijn ontworpen (bv. ijzerverwijdering, verwijdering van vlokken na coagulatie/sedimentatie)?
- 10 Hoe beïnvloeden de procesparameters (terugspoelen, filtratiesnelheid, contacttijd, filtratiemedium) de OMV-verwijdering?
- 11 Welke procescondities kunnen worden gevarieerd om de OMV-verwijdering verder te optimaliseren?
- 12 Hoe kunnen de verkregen kennis en inzichten voor snelfilters worden vertaald naar andere biologische processen in de drinkwaterzuivering, zoals biologisch actief kool of langzame zandfiltratie?

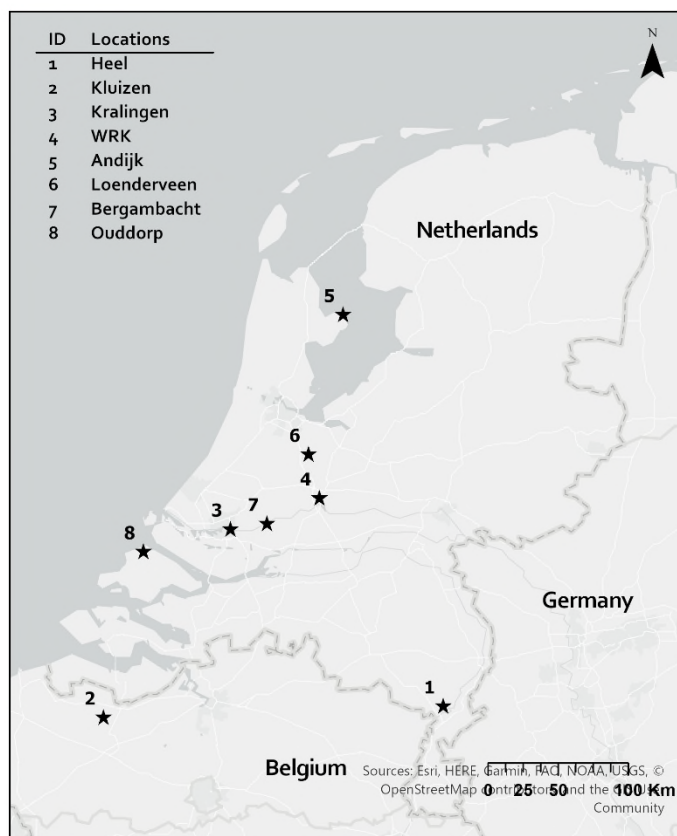
## 3 Materiaal en methoden

### 3.1 Screening van oppervlaktewaterzuiveringen op verwijdering van OMV

#### 3.1.1 OMV-screening mei en september 2018

##### 3.1.1.1 Oppervlaktewaterlocaties

In mei en september 2018 (Tabel 12 in Bijlage IV) zijn van acht drinkwaterproductielocaties, met oppervlaktewater als ruw water, het influent, effluent en filtermateriaal van de snelfilters bemonsterd zoals verderop beschreven. Voor een overzicht van de locaties, zie Figuur 2. De zuiveringsstappen van de productielocaties staan weergegeven in Bijlage VI, en de heersende procesomstandigheden ten tijde van monsternamen in Tabel 13 van Bijlage III. Van elke locatie is het zandfilter bemonsterd dat het laatst was teruggespoeld en dus op dat moment het langst in gebruik was. Tijdens terugspoelen wordt een deel van de microbiële populatie uit het zandfilter verwijderd, wat mogelijk de microbiologische analyses moeilijker maakt omdat er dan minder biomassa aanwezig is. Door het filter te kiezen met de op dat moment langste looptijd is de microbiële populatie waarschijnlijk groter en daarom vermoedelijk makkelijker te meten met de verschillende methodes.



Figuur 2. Locaties van bemonsterde snelle zandfilters.

Van elke locatie is het volgende bemonsterd, in onderstaande volgorde:

- 2 liter effluent (microbiologisch), 1 liter effluent (OMV-screening)
- 2 liter influent (microbiologisch), 1 liter influent (OMV-screening)
- 1 kg filtermateriaal: bovenste laag filtermateriaal, inclusief Schmutzdecke

Voor de bemonstering van het filtermateriaal zijn de filters tijdelijk uit gebruik genomen om het waterpeil te verlagen tot de hoogte van het filterbed. Het filtermateriaal is van bovenaf bemonsterd door met een roestvrijstalen beker het zand van de bovenste laag van verschillende plekken van het filter te scheppen. Het filtermateriaal is daarna overgebracht naar een steriele fles. De beker is voor elke monsternamen gespoeld met drinkwater, gedesinfecteerd met chloor en nagespoeld met drinkwater. Het influent en effluent water is bemonsterd in speciaal gespoelde flessen vrij van OMV's (OMV-screening) en in steriele plastic flessen (microbiologisch). Alle monsters zijn bewaard bij 4°C tot analyse (microbiologisch binnen 24 uur, OMV-screening binnen 7 dagen).

Foto's van het filtermateriaal zijn weergegeven in Figuur 31 van Bijlage II.

In Tabel 2 is aangegeven welke analyses op het bemonsterde materiaal zijn uitgevoerd. In hoofdstuk 3.3 en 3.5 is beschreven hoe de analyses zijn uitgevoerd.

Tabel 2. Microbiologische en chemische analyses uitgevoerd op influent, effluent en filtermateriaal bemonsterd tijdens de screening in mei en september 2018.

Analyses	Influent	Effluent	Filtermateriaal
ATP	X	X	X
NGS	X	X	X
Suspect screening	X	X	

### 3.1.2 Suspect screening

Met behulp van een "suspect screening" is de OMV verwijdering bepaald in de acht snelfilters van de Nederlandse drinkwaterbedrijven en De Watergroep. Voor de suspect screening is gebruik gemaakt van een semi-kwantitatieve analyse waarmee in één meting een groot aantal organische microverontreinigingen uit diverse categorieën kan worden gemeten (127 OMV's, zie Tabel 3). Dit betekent dat er bij de kwantificatie gebruik is gemaakt van slechts één kalibratiepunt. Dit geeft een minder nauwkeurige waarde dan een doelstofanalyse, maar kan goed gebruikt worden om aan te tonen of een stof wel of niet wordt verwijderd. Gebaseerd op de ervaring van het laboratorium met deze analyses is op basis van de volgende twee richtlijnen bepaald of de afname in OMV-concentratie significant was:

- Indien de concentratie in het influent < 0,1 µg/L is, moet er minimaal een afname van 50% te worden waargenomen om te kunnen spreken van een "aanzienlijke" afname.
- Indien de concentratie in het influent > 0,1 µg/L is, dient er minimaal een afname van 20-30% te worden waargenomen om te kunnen spreken van een "aanzienlijke" afname.

De suspect screening is uitgevoerd met behulp van een vloeistofchromatograaf gekoppeld aan een hoge resolutie massaspectrometer (LC-HRMS). Hierbij is gebruikt gemaakt van een directe waterinjectie, waarbij de monsters na het toevoegen van interne standaarden (Atrazine-d5 en Bentazon-d6) en na filtratie (0,20 µm) direct geanalyseerd zijn. De monsters zijn geanalyseerd op de Orbitrap Fusion massaspectrometer en gemeten in de positieve en negatieve ionisatie modus. Hierbij is een massarange toegepast van 80 – 8000 m/z en een massanauwkeurigheid van 5 ppm. De stoffen zijn gekwantificeerd door middel van een éénpuntskalibratie met behulp van het dataverwerkingsprogramma Xcalibur (ThermoFisher Scientific). Met deze analyse was het niet mogelijk om pyrazool te analyseren.

Tabel 3. Organische microverontreinigingen opgenomen in de suspect screening

Geneesmiddelen en pesticiden	CAS nr.	Geneesmiddelen en pesticiden	CAS nr.
1-(3,4-Dichlorofenyl)-3-methylureum	3567-62-2	Salbutamol	18559-94-9
1-(3,4-Dichloorfenyl)-ureum	2327-02-8	Simazin	122-34-9
2-Aminoacetofenon	551-93-9	Sotalol	3930-20-9
2-Methyl-4,6-dinitrofenol (DNOC)	534-52-1	Sulfachloorpyridazine	80-32-0
2,4-Dichloroaniline	554-00-7	Sulfadimidine	2921-88-2
2,4-Dichloorfenol	120-83-2	Sulfadiazine	68-35-9
2,4-Dichloorfenoxiazijnzuur (2,4-D)	94-75-7	Sulfamethoxazool	723-46-6
2,4-Dinitrofenol	51-28-5	Sulfaquinoxaline	59-40-5
2,4,6-Trichloorfenol	88-06-2	Terbutaline	23031-32-5
2,6-Dichloorbenzamide (BAM)	2008-58-4	Terbutylazin	5915-41-3
(4-Chloor-2-methylfenoxy)azijnzuur (MCPA)	94-74-6	Tetraglyme	70992-84-6
Acetaminofen	103-90-2	Tramadol	27203-92-5
Amidotrizoïnezuur	117-96-4	Triethylfosfaat	78-40-0
Atenolol	29122-68-7	Trifenylfosfineoxide	791-28-6
Atrazine	1912-24-9	Trimethoprim	738-70-5
Azinfos-methyl	86-50-0	Tri-n-butyl-fosfaat	126-73-8
Bentazon	25057-89-0	Tris-(2-chloorethyl)fosfaat(TCEP)	115-96-8
Bezafibraat	41859-67-0	Tris-(2-chloorisopropyl)fosfaat	13674-84-5
Bromacil	314-40-9	Venlafaxine	93413-69-5
Caffeine	58-08-2		
Carbamazepine	298-46-4	<b>Emerging contaminants</b>	<b>CAS nr.</b>
Carbendazim	10605-21-7	10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine	35079-97-1
Chloorpyrifos-ethyl	2921-88-2	Carbamazepine-10,11-epoxide	36507-30-9
Chloortoluron	15545-48-9	Candesartan	139481-59-7
Chloridazon	1698-60-8	Desfenylchloridazon	6339-19-1
Clenbuterol	37148-27-9	Gabapentine	60142-96-3
Clindamycine	18323-44-9	Gabapentine-lactam	64744-50-9
Cortison	53-06-5	Hydrochloorthiazide	58-93-5
Cyclofosfamide	50-18-0	Irbesartan	138402-11-6
DEET	134-62-3	Lamotrigine	84057-84-1
Desethylatrazin	6190-65-4	Metazachloor ESA	172960-62-2
Dichloorprop (2,4-DP)	120-36-5	Metazachloor OA	1231244-60-2
Diclofenac	15307-86-5	Metolachloor ESA	171118-09-5
Dimethenamid-P	87674-68-8	Metolachloor OA	152019-73-3
Dimethoaat	60-51-5	N-acetyl-4-aminoantipyrine	83-15-8
Dimethomorf (isomeer 1 + 2)	110488-70-5	N-acetylsulfamethoxazool	21312-10-7
Diuron	330-54-1	N-formyl-4-aminoantipyrine	1672-58-8

Erythromcyine A	59319-72-1	Oxipurinol	2465-59-0
Ethofumesaat	26225-79-6	Sitagliptine	486460-32-6
Fluoxetine	59333-67-4	Valsartan	137862-53-4
Furosemide	54-31-9	Valsartan-zuur	164265-78-5
Gemfibrozil	25812-30-0		
Guanylureum	141-83-3	<b>Benzotriazolen/benzothiazolen</b>	
Hydrocortison	50-23-7	1-H-benzotriazool	95-14-7
Ifosfamide	3778-73-2	4-Methyl-1H-benzotriazool	29878-31-7
Isoproturon	34123-59-6	5-Methyl-1H-benzotriazool	136-85-6
Ketoprofen	22071-15-4	5,6-Dimethyl-1H-benzotriazool	4184-79-6
Lincomycine	859-18-7	5-Chloor-1H-benzotriazool	94-97-3
Linuron	330-55-2	2-Aminobenzothiazool	136-95-8
Mecoprop (MCP)	7085-19-0	2-Hydroxybenzothiazool	934-34-9
Metazachloor	67129-08-2	Benzothiazool	95-16-9
Metformine	657-24-9	2-(Methylthio)benzothiazool	615-22-5
Metobromuron	3060-89-7		
Metolachloor	51218-45-2	<b>Zoetstoffen</b>	
Metoprolol	37350-58-6	Acesulfaam-K	55589-62-3
Metoxuron	19937-59-8	Cyclamaat	139-05-9
Metribuzin	21087-64-9	Saccharine	81-07-2
Metronidazool	443-48-1	Sucralose	56038-13-2
Monuron	150-68-5		
Naproxen	22204-53-1		
Nicosulfuron	111991-09-4		
Nicotine zuur	59-67-6		
Paroxetine	61869-08-7		
Pentoxifylline	6493-05-6		
Phenazon	60-80-0		
Pindolol	13523-86-9		
Pirimicarb	23103-98-2		
Prednisolon	50-24-8		
Propranolol	525-66-6		
Propyfenazon	479-92-5		
P,p-Sulfonyldifenol	80-09-1		

De verwijdering van de OMV's door de snelfilters wordt bepaald met behulp van Vergelijking 1.

$$OMV \text{ verwijdering (\%)} = \frac{c_{in} - c_{eff}}{c_{in}} \cdot 100\% \quad \text{Vgl. 1}$$

Waarin:

$c_{in}$	=	OMV concentratie in influent	[ $\mu\text{g/L}$ ]
$c_{eff}$	=	OMV concentratie in effluent	[ $\mu\text{g/L}$ ]

### 3.2 Opzet biologisch afbraakexperimenten in batch en kolom

Er is gekozen voor twee soorten afbraakproeven: in flessen (batchexperiment) en in kolommen. Deze verschillende omstandigheden zijn gekozen omdat niet bekend is of biologische afbraak in snelfilters voornamelijk plaatsvindt door micro-organismen met een hoge of lage affiniteit en omdat niet bekend is hoe snel de afbraak plaatsvindt. Voor beide experimenten is hetzelfde filtermateriaal en influentwater gebruikt, maar er zijn grote verschillen in de overige omstandigheden. In de kolomexperimenten werden de kolommen continu doorstroomd met influent van het full-scale snelfilter, wat zorgt voor een constante aanvoer van vers water met onder andere organisch materiaal (DOC), nutriënten, zuurstof en de gedoseerde OMV. Het organisch materiaal (de nutriënten) en de OMV kunnen door de micro-organismen op het filtermateriaal en in het aangevoerde water worden afgebroken. De stroming zorgt voor een relatief korte contacttijd in de kolom (8-10 minuten) en micro-organismen die niet aan het filtermateriaal kunnen hechten spoelen uit. Door de korte contacttijd zijn micro-organismen die deze OMV snel kunnen afbreken in het voordeel. In de batchexperimenten wordt daarentegen slechts eenmaal influentwater met organisch materiaal, nutriënten en OMV toegevoegd. Omdat er geen continue doorstroming is, is de contacttijd lang (enkele weken) en worden metabolieten en dode micro-organismen niet afgevoerd maar kunnen juist dienen als voeding voor de resterende populatie of ze remmen de microbiële groei omdat de metabolieten mogelijk toxisch zijn. Daarnaast zorgt de langere contacttijd ervoor dat langzame biologische afbraak van OMV beter detecteerbaar is. In beide typen experimenten vindt de biologische afbraak van OMV dus plaats onder verschillende omstandigheden. In de batch experimenten wordt de tijd uitgedrukt in dagen. Voor de kolommen is de tijd genormaliseerd naar bed volumina (BV). Dit maakt het makkelijker om de resultaten van de kolommen onderling te vergelijken, maar ook met andere studies.

Er zijn twee OMV's getest in twee concentraties, een hoge concentratie (50  $\mu\text{g/l}$ ) en een lage concentratie (0,5  $\mu\text{g/l}$  metformine of 5  $\mu\text{g/l}$  pyrazool). De lage concentratie is alleen gebruikt in de batchexperimenten en is gebaseerd op typische (lage) gehalten pyrazool en metformine in oppervlaktewater (ng/l tot lage  $\mu\text{g/l}$  concentraties). Voor pyrazool is 5  $\mu\text{g/l}$  gekozen en voor metformine 0,5  $\mu\text{g/l}$ , mede gebaseerd op de hogere detectielimiet voor pyrazool in vergelijking met metformine (0,5  $\mu\text{g/l}$  respectievelijk 0,05  $\mu\text{g/l}$ ). Door deze startconcentraties te gebruiken kan 90% verwijdering worden aangetoond. De hoge concentratie OMV (50  $\mu\text{g/l}$ ) komt minder vaak voor in oppervlaktewater; deze waarde is gekozen om beter te kunnen selecteren op de micro-organismen die de desbetreffende stof zouden kunnen afbreken.

Doel van het onderzoek was om te proberen een bacteriecultuur in de batch- en kolomexperimenten te kweken die metformine of pyrazool kan afbreken. Omdat aan het begin van het project onbekend was of dit zou lukken, zijn er geen uitgebreide aanvullende metingen uitgevoerd om de afbraaksnelheid nauwkeurig in kaart te brengen. Dat valt buiten de scope van dit onderzoek.

#### 3.2.1 Herkomst water en filtermateriaal

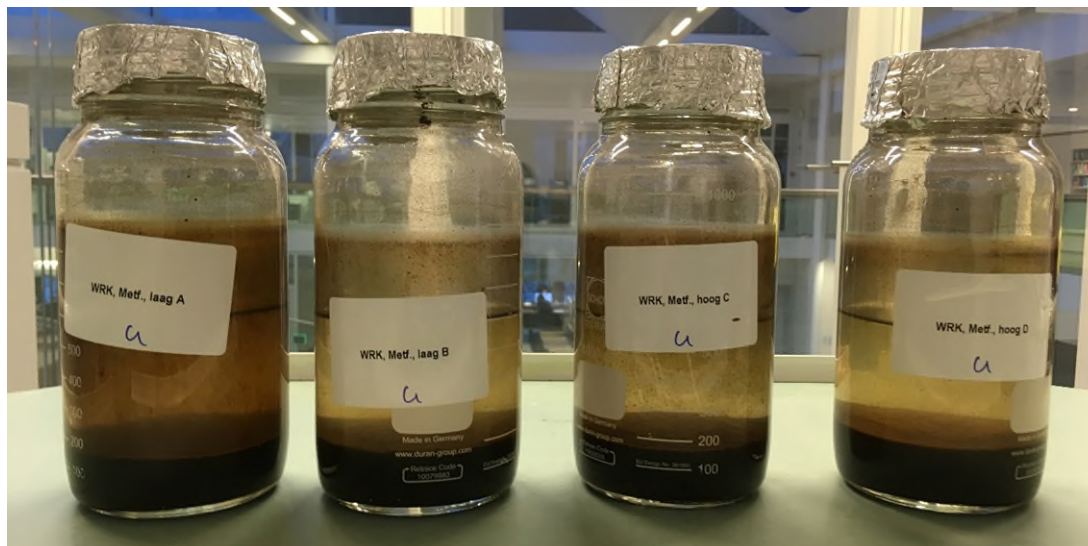
Er zijn twee soorten afbraakexperimenten uitgevoerd, in flessen (batchexperimenten) en in kolommen (kolomexperimenten). Beide typen experimenten zijn op dezelfde dag gestart. Het filtermateriaal is afkomstig van de snelfilters van de WRK (Nieuwegein) en het influent water is het voedingswater van de snelfilters WRK. Op 12 en

16 oktober 2018 zijn influentwater en filtermateriaal bemonsterd. Het influentwater is tijdens bemonsteren gefiltreerd over een 10 µm filter om grotere deeltjes te verwijderen en zo verstopping van de kolommen te reduceren.

De twee zandmonsters zijn op het laboratorium gemengd en 15 - 30 minuten gespoeld met influentwater van de snelfilters van de WRK tot het spoelwater schoon was. Hiermee werden alle fijne deeltjes verwijderd, wat gedaan is om het verstopping van de kolommen, en daardoor te moeten terugspoelen, te reduceren. Hoewel het wassen van het filtermateriaal niet noodzakelijk was voor de batchexperimenten, is dezelfde procedure toegepast zodat het filtermateriaal bij de start vergelijkbaar zou zijn tussen de batch- en kolomexperimenten.

### 3.2.2 Batchexperimenten

De afbraak- of ophopingsexperimenten zijn gebaseerd op de OECD308 richtlijnen (7). Filtermateriaal (250 gram) en influentwater (750 ml) werden gemengd in glazen 1L-potten (Figuur 3). Hieraan werd 5 of 50 µg/l pyrazool of 0,5 of 50 µg/l metformine gedoseerd volgens Tabel 4. Om mogelijke fosfaat- of stikstoflimitatie te voorkomen werden tevens 0,83 µg KNO<sub>3</sub>-N/l en 0,36 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-P/l gedoseerd. Alle hierboven genoemde doseringen aan de potten werden gefiltreerd over een 0,45 µm filter waarmee nagenoeg alle micro-organismen werden verwijderd. Elke behandeling werd in tweevoud (duplo) uitgevoerd. De blanco bestond uit influentwater gemengd met filtermateriaal, nutriënten (KNO<sub>3</sub> en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) waaraan geen metformine of pyrazool is gedoseerd.



Figuur 3. Experimentele opzet van batchexperimenten: 1 liter flessen met 250 gram filtermateriaal en 750 ml influent WRK water. De flessen zijn t/m week 3 afgesloten met een gesloten draaidop, deze werd in week 3 vervangen door geperforeerd aluminiumfolie.



Tabel 4. Geteste behandelingen in het batchexperiment.

Omschrijving	Startconcentratie OMV	
	Pyrazool	Metformine
WRK, metformine, laag	0 µg/l	0,5 µg/l
WRK, metformine, hoog	0 µg/l	50 µg/l
WRK, metformine, hoog, bestraald	0 µg/l	50 µg/l
WRK, metformine, test	0 µg/l	0 µg/l
WRK, pyrazool, laag	5 µg/l	0 µg/l
WRK, pyrazool, hoog	50 µg/l	0 µg/l
WRK, pyrazool, hoog, bestraald	50 µg/l	0 µg/l
WRK, pyrazool, test	0 µg/l	0 µg/l
WRK, blanco (blank)	0 µg/l	0 µg/l

Voor de microbiologische en chemische analyses was een grote hoeveelheid water en filtermateriaal nodig, daarom zijn per behandeling 2x4 flessen aangelegd: fles 1-8. Zo zijn bijvoorbeeld fles 1 en 5 bij de start bemonsterd en opgeofferd. En in weken 1, 2, 3 en 4 zijn kleine hoeveelheden water en zand bemonsterd uit fles 2 en 6 waarna in week 5 het restant is bemonsterd en de fles is opgeofferd.

De mate van sorptie van pyrazool en metformine aan het filtermateriaal is onderzocht in een aparte set van flessen. Hiervoor zijn een aantal potten (nadat deze zijn gevuld met influent water, filtermateriaal,  $\text{KNO}_3$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) steriel gemaakt door gamma bestraling (uitgevoerd door Synergy Health [Ede]; ‘bestraald’ in Tabel 4). De potten zijn na bestraling ingevroren en na enkele dagen ontdooid waarna op steriele wijze pyrazool of metformine werd gedoseerd. Deze potten werden op steriele wijze in een flowkast bemonsterd, desondanks zijn gedurende het experiment enkele flessen toch besmet geraakt met micro-organismen. Dit wordt beschreven in hoofdstuk 5.1.1. Door de verwijdering van pyrazool of metformine in deze abiotische flessen (door gammabestraling geïnactiveerde biomassa) te vergelijken met de verwijdering van deze stoffen in de biotische flessen (actieve biomassa) wordt inzicht verkregen in het dominante verwijderingsmechanisme (sorptie en/of biodegradatie).

De niet-steriele flessen (waarin biologische afbraak wordt gemeten) werden gedurende 14 weken in het donker geïncubeerd bij 20°C. De steriele flessen werden slechts 1 week geïncubeerd. De richtlijnen beschreven in OECD test 106 geven aan dat de tijd om een evenwicht in OMV sorptie te krijgen in bodemmateriaal zeer variabel is. Desalniettemin leek een periode van 24 uur voldoende om de abiotische OMV verwijdering (sorptie) te meten. Veiligheidshalve is ook nog de abiotische OMV verwijdering na 1 week gemeten (8). Drie keer per week werden alle flessen geschud totdat het filtermateriaal los kwam van elkaar. De doppen van de flessen werden gedurende het experiment aangepast om meer zuurstof in de flessen te kunnen laten. In week 0 werd gestart met dichtgedraaide doppen op de flessen; in week 2 werden de doppen losgedraaid. Omdat het zuurstofgehalte erg laag bleef, werden de doppen in week 3 vervangen door aluminiumfolie met daarin gaatjes. Hierna nam het zuurstofgehalte weer toe. Hierdoor waren de flessen echter niet langer afgesloten van de omgeving waardoor mogelijk micro-organismen van buitenaf in de flessen terecht konden komen. Bij de steriele flessen bleef de dop dichtgedraaid op de flessen en werd niet vervangen door aluminiumfolie.

Tussen week 0 en 8 werd ATP (vrij, totaal en cellulair) wekelijks gemeten in het water. In week 0, 5, 8 werden verdere analyses uitgevoerd op het water en het filtermateriaal: gehalten pyrazool/metformine/guanylureum, nitraatgehalte ( $\text{NO}_3$ ), UV-adsorptie bij 254 nm ( $\text{UV}_{254}$ ) en de microbiële samenstelling door metabarcoding van het 16S rRNA-gen via Next Generation Sequencing (NGS) (Tabel 5). In week 15 werden nog een keer monsters

genomen voor bepaling van de concentratie pyrazool/metformine/guanylureum en microbiële samenstelling (NGS). Het filtermateriaal werd bemonsterd met steriele schepjes die tussendoor werden gespoeld in steriel water en verhit.

Daarnaast werden extra flessen ingezet om de concentratie zuurstof, de pH, de elektrische geleidbaarheid (EGV) en de temperatuur in de flessen te monitoren ('test' in Tabel 4). Hierin zijn iedere week de genoemde parameters gemeten. Deze flessen zijn niet gebruikt voor andere analyses.

*Tabel 5. Overzicht van de analyses uitgevoerd op water (W) en filtermateriaal (F) van de batchexperimenten. OMV: pyrazool, metformine en/of guanylureum, afhankelijk van welke stof is gedoseerd. Naast weeknummers zijn ook de flesnummers aangegeven waaruit het water en filtermateriaal is bemonsterd voor de analyses. \* Op de steriele flessen zijn deze analyses niet uitgevoerd. # Analyses in week 14 zijn alleen uitgevoerd op de metformine flessen.*

	Fles	ATP		NGS*		OMV		NO <sub>3</sub> *		UV <sub>254</sub> *		Opgelost O <sub>2</sub> *		pH*		EGV*		°C*	
		W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F
Wk 0	1	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	
Wk 1	2	X	X									X		X		X		X	
Wk 2	2	X	X									X		X		X		X	
Wk 3	2	X	X									X		X		X		X	
Wk 4	2	X	X									X		X		X		X	
Wk 5	2	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	
Wk 6	3	X	X									X		X		X		X	
Wk 7	3	X	X									X		X		X		X	
Wk 8	3	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	
Wk 14 <sup>#</sup>	4	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	
Wk 15	4	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	

### 3.2.3 Kolomexperimenten

Twee glazen kolommen (diameter: 35 mm; bedhoogte: 0,89 m) werden gevuld met gespoeld filtermateriaal van de WRK. Om deze kolommen te doorstromen werd (10 µm) gefiltreerd influentwater van het full-scale snelfilter op locatie WRK, Nieuwegein gebruikt. Wekelijks werd vers influent water gehaald, waaraan 50 µg/l pyrazool of metformine werd gedoseerd. De filtratiesnelheid (3,84 m/h, debiet = 3,7 L/h en contacttijd = 7 minuten) in deze kolommen lag iets hoger dan die in de full-scale snelfilters van de WRK (filtratiesnelheid = 3,2 m/h). De kolommen werden 1-2x per week teruggespoeld om luchtbelletjes in het filterbed te verwijderen en zo kortsluitstromingen te voorkomen (zie Bijlage VIII).

Voor de start van de kolomexperimenten werden de integriteit en contacttijd van de kolommen getest door deze met een zoutoplossing (5 gram/liter NaCl) door te spoelen (Figuur 32, Bijlage VI). Hieruit bleek dat er geen kortsluitstroming in de kolommen was en dat de contacttijd 8 tot 10 minuten was, vergelijkbaar met het full-scale filter (Bijlage III).

Op het water en filtermateriaal van de kolomexperimenten werden dezelfde analyses uitgevoerd als in de batchexperimenten (Tabel 6).

Tabel 6. Analyses uitgevoerd op influent (I), effluent (E) en filtermateriaal (F) van de kolomexperimenten. OMV: pyrazool, metformine en/of guanylureum, afhankelijk van welke stof is gedoseerd.

	ATP		NGS		OMV		NO <sub>3</sub>		UV <sub>254</sub>		Opgelost O <sub>2</sub>		pH		EGV		°C	
	I, E	F	I, E	F	I, E	F	I, E	F	I, E	F	I, E	F	I, E	F	I, E	F	I, E	F
Wk 0	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	
Wk 1	X	X									X		X		X		X	
Wk 2	X	X									X		X		X		X	
Wk 3	X	X									X		X		X		X	
Wk 4	X	X									X		X		X		X	
Wk 5	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	
Wk 6	X	X									X		X		X		X	
Wk 7	X	X									X		X		X		X	
Wk 8	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X		X	
Wk 15			X	X	X						X		X		X		X	

In Bijlage VII is meer informatie over de kolomexperimenten weergegeven, waaronder op welke dagen de tank is vervangen, water is bemonsterd voor analyses en op welke dagen de kolommen zijn teruggespoeld.

Op 3 mei werden beide kolommen stilgezet en werd het filtermateriaal van de pyrazoolkolom gebruikt als entmateriaal in het vervollexperiment (paragraaf 3.2.4 en 3.2.5). Hierbij is onderzocht of het mogelijk was om een kolom die geen pyrazool kon verwijderen te enten met materiaal waarin pyrazool-degraderende micro-organismen waren opgehoopt, om zo pyrazoolverwijdering in deze kolom op te starten. Dit experiment is uitgevoerd om te onderzoeken of het mogelijk zou zijn full-scale filters die niet in staat zijn bepaalde OMV's te verwijderen te enten met materiaal uit snelfilters die hiertoe wel in staat zijn. Zo zouden drinkwaterbedrijven elkaar kunnen helpen bij het verbeteren van OMV verwijdering met snelfilters door filtermateriaal onderling uit te wisselen.

### 3.2.4 Test filtermateriaal locatie Heel en Loenderveen in batchexperiment

Om de mogelijkheid van enten te onderzoeken, is eerst filtermateriaal gezocht dat niet in staat is om pyrazool af te breken. Hiervoor is materiaal getest van twee locaties, namelijk Loenderveen (Waternet) en Heel (WML).

Met behulp van een batchexperiment is getest of het filtermateriaal van de snelfilters uit Loenderveen en Heel binnen 9 dagen in staat was om pyrazool en/of guanylureum (gedeeltelijk) biologisch af te breken. Hiervoor is op 28 februari 2019 filtermateriaal (5 kg) en influentwater (20 liter) bemonsterd bij Heel en bij Loenderveen. De bemonstering bij Heel is uitgevoerd door WML, de bemonstering bij Loenderveen door KWR. Het materiaal werd tot aan de start (binnen 7 dagen) bewaard bij 4°C in het donker.

Het experiment werd uitgevoerd volgens de hierboven beschreven opzet van het batchexperiment (paragraaf 3.2.2). Bij de start op 6 maart 2019 werd aan elke fles 50 µg/l pyrazool of 50 µg/l guanylureum gedoseerd (Tabel 7) en op dag 0, 1, 6 en 9 is de concentratie guanylureum en pyrazool in het water bepaald. Daarnaast zijn ATP en UV<sub>254</sub> bepalingen uitgevoerd ter controle dat zich in de flessen een levende, stabiele microbiële populatie bevond. De experimenten zijn in tweevoud uitgevoerd bij 20°C.

Tabel 7. Behandelingen in het test batchexperiment met filtermateriaal van Heel en Loenderveen

Herkomst filtermateriaal	Startconcentratie OMV	
	Pyrazool	Guany lureum
Heel	0 µg/l	50 µg/l
Heel	50 µg/l	0 µg/l
Loenderveen	0 µg/l	50 µg/l
Loenderveen	50 µg/l	0 µg/l

### 3.2.5 Inoculatie-afbraakexperiment

Het inoculatie-experiment waarbij werd getest of het mogelijk is om snelfilters die geen pyrazool verwijderen te enten met filtermateriaal dat dat wel kan, is uitgevoerd met filtermateriaal van de snelfilters van Loenderveen en met het filtermateriaal uit de pyrazoalkolom (paragraaf 3.2.3). De opzet van dit experiment is vergelijkbaar met het eerdere kolomexperiment, uitgezonderd dat influentwater van Loenderveen werd gebruikt en dat hieraan 5 µg/l pyrazool werd gedoseerd.

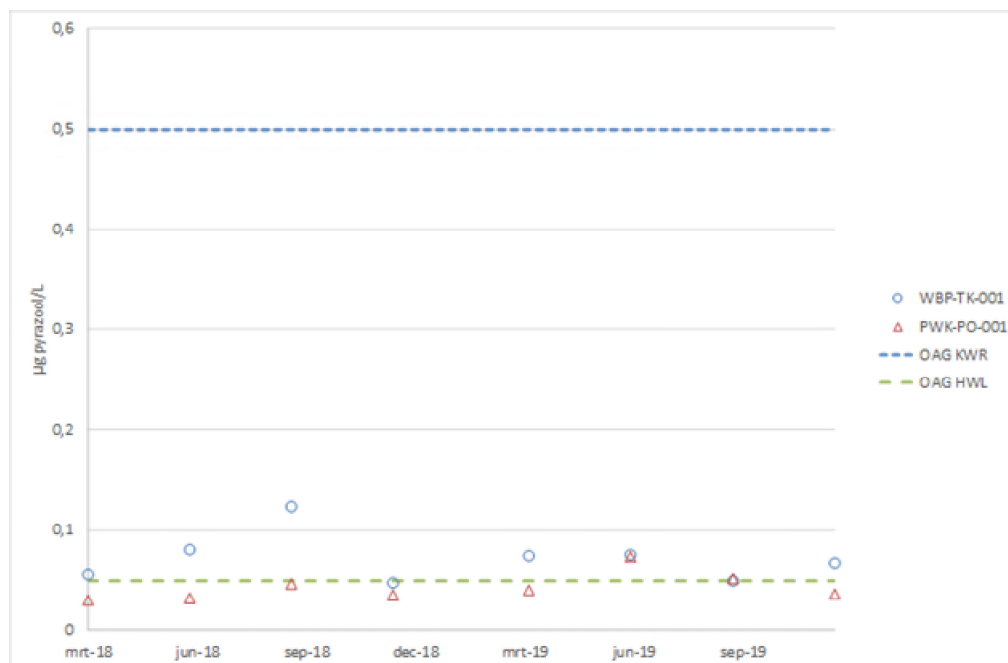
De controle kolom bevatte 100% filtermateriaal van Loenderveen, de andere kolom bevatte 90% Loenderveen-filtermateriaal en 10% filtermateriaal van de pyrazoalkolom uit paragraaf 3.2.3. In Bijlage VIII staat het logboek van dit experiment (start: 6 mei 2019) en in Tabel 8 staan de pyrazooldosering en uitgevoerde analyses aangegeven. Gedurende 12 weken werd 5 µg /l pyrazool aan het influent gedoseerd en is in het effluent gemeten of dit verwijderd werd tijdens passage door de kolommen. Vervolgens werd gedurende 4 weken geen pyrazool gedoseerd (0 µg/l), gevolgd door opnieuw 4 weken dosering van 5 µg/l pyrazool. Met dit regime is onderzocht of de pyrazool-afbrekende microbiële populatie na deze 4 weken nog aanwezig was en in staat was om pyrazool af te breken wanneer pyrazool weer aanwezig was in het influent.

Tabel 8. Uitgevoerde analyses op influent, effluent en terugspoelwater en filtermateriaal van beide inoculatiekolommen. \* Niet uitgevoerd in terugspoelwater. Pyr: pyrazool

	Pyrazool dosering	Influenten, effluenten en terugspoelwaters						Filtergrind					
	(µg/l)	ATP	UV <sub>254</sub>	NO <sub>3</sub>	pH, °C, EGV, O <sub>2</sub>	Pyr.	NGS	ATP	UV <sub>254</sub>	NO <sub>3</sub>	pH, °C, EGV, O <sub>2</sub>	Pyr.	NGS
Wk 0	5	X	X	X	X	X (na 1 uur)	X	X	X				X
Wk 0, dag 1		X*				X							
Wk 1	5	X				X*	X*						
Wk 2	5	X	X	X	X	X*	X						
Wk 3	5												
Wk 4	5	X	X	X	X	X*	X	X	X				X
Wk 5	5												
Wk 6	5	X	X	X	X	X*	X						
Wk 7	5												
Wk 8	5	X	X	X	X	X*	X	X	X				X
Wk 9	5												
Wk 10	5	X	X	X	X	X*	X						
Wk 11	5												
Wk 12	5	X	X	X	X	X*	X	X	X				X
Wk 13	0	X*	X*	X*	X*		X*						
Wk 14	0	X*	X*	X*	X*		X*						
Wk 15	0	X*	X*	X*	X*		X*						
Wk 16	0	X*	X*	X*	X*		X*						
Wk 17	5	X	X	X	X	X* (na 1 uur)	X	X	X				X
Wk 17, dag 1		X*	X*	X*	X*	X*	X*						
Wk 18	5	X*	X*	X*	X*	X*	X*						
Wk 19	5	X	X	X	X	X*	X						
Wk 20	5												

Bij de start van het experiment werd ervan uitgegaan dat de snelfilters voor 100% gevoed werden met water uit de Bethunepolder. Enkele weken na de start van het inoculatie-experiment werd echter bekend dat vanuit het Amsterdam-Rijnkanaal periodiek water werd ingelaten in de Bethunepolder. Deze inlaat is gestart op 3 mei 2019, waarbij gemiddeld 20-30% van het water in de Bethunepolder afkomstig is van het Amsterdam-Rijnkanaal. De verblijftijd in de Waterleidingplas is ongeveer 3 maanden wat inhoudt dat vanaf begin augustus 2019 mengwater van het Amsterdam-Rijnkanaal en de Bethunepolder werd ingenomen bij de inlaat van de snelfilters van Loenderveen. Dit komt gedeeltelijk overeen met de periode waarin geen pyrazool aan het influent wordt gedoseerd (week 13 – 16 in Tabel 8 en 2 augustus t/m 2 september 2019 in Bijlage VII).

Uit metingen van Waternet en HWL bleek dat er soms lage concentraties pyrazool in het water van de Bethunepolder aanwezig waren (WBP-TKI-001 in Figuur 4). De concentraties lagen rond de detectiegrens van HWL (0,05 µg/l). Gedurende de periode dat voor het inoculatie-experiment water uit de Bethunepolder is bemonsterd (na passage door de Waterleidingplas bij innamepunt Loenderveen) was de pyrazoolconcentratie, voor zover bekend, laag (maximaal 0,07 µg/l). Er zijn geen metingen uitgevoerd op het water bij het innamepunt van Loenderveen (waterleidingplas). Het is dus mogelijk dat er in augustus 2019, de periode waarin geen pyrazool aan het experiment is gedoseerd, toch af en toe zeer lage concentraties pyrazool aanwezig waren in het influent van de kolommen. Ter controle hiervan zijn twee metingen uitgevoerd, maar aangezien de detectielimiet van de pyrazoolanalyse van KWR hoger was dan die van HWL konden deze lage concentraties niet gedetecteerd worden.



Figuur 4. Pyrazoolconcentraties in het reinwater van Weesperkarspel (PWK-PO-001) en in het ruwe water van de Bethunepolder (WBP-TKI-001) in de periode maart 2018 – december 2019. De detectielimiet van de analyse van HWL (0,05 µg/l) en KWR (0,5 µg/l) is gegeven. Gegevens afkomstig van Petra Scholte (Waternet). OAG: onderste analyse grens (detectielimiet).

### 3.3 Chemische analyses

#### 3.3.1 Flessen voor OMV-analyses

De 1-liter monsters voor de OMV-screening werden bemonsterd in zogenaamde XAD-gespoelde flessen. Dit is een uitgebreide spoeling waarmee alle stoffen uit de fles werden verwijderd om zo storing van de OMV-screening te voorkomen. Na deze uitgebreide spoeling is het mogelijk om bijvoorbeeld spoorelementen in de watermonsters te detecteren. Bij drie monsternames zijn echter flessen gebruikt die niet XAD-gespoeld waren (Bijlage III). Om de mogelijke verontreinigde stoffen in deze flessen in kaart te brengen werd eenzelfde fles (één fles), gevuld met milliQ-water, meegenomen in de analyses. De resultaten van de productielocaties zijn gecorrigeerd voor deze controle.

#### 3.3.2 Pyrazool

De pyrazoolconcentratie in de watermonsters is bepaald met directe injectie en ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) in combinatie met een quadrupole time-of-flight (Q-ToF) hoge resolutie massaspectrometer. Aan het watermonster werd eerst een interne standaard toegevoegd, waarna het gefiltreerd

werd over een 0,20 µm filter. Hierna werd het watermonster op een analytische kolom gebracht. Na de chromatografische scheiding werden de stoffen gedetecteerd met een Q-ToF massaspectrometer. De massaspectrometer neemt een hoge resolutie (kwantificering) en twee MS2 (bevestiging) datasporen op. Het protocol is beschreven in huisvoorschrift LOA-562. De LOD is 0,5 µg/l.

### 3.3.3 Metformine, guanylureum

Guanylureum is een bekend afbraakproduct van metformine en wordt in de wetenschappelijke literatuur ook veel genoemd en onderzocht op het gebied van afvalwater. Daarom is de concentratie in de afbraakexperimenten bepaald. De metformine- en guanylureumconcentraties in de watermonsters werden bepaald met UHPLC-MS/MS (directe injectie en HILIC [Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography] in combinatie met een triple quadrupole massaspectrometer [MS]). Aan de watermonsters werd eerst een interne standaard toegevoegd, waarna het gefiltreerd werd over een 0,20 µm filter. Hierna wordt het watermonster op een HILIC analytische kolom gebracht. Na de chromatografische scheiding werden de stoffen gedetecteerd met een triple quadrupole massaspectrometer. De massaspectrometer meet volgens het selected reaction monitoring (SRM) principe. Het protocol is beschreven in huisvoorschrift LOA-301. De LOD is 0,05 µg/l.

## 3.4 Waterkwaliteitsparameters

### 3.4.1 Zuurstof, pH, EGV, temperatuur

Zuurstof is gemeten met een WTW meter (type oxi 340i). pH, EGV en temperatuur zijn gemeten met een Hach Lange sensION™+ Portable Meter. Deze parameters werden bepaald in het influent en effluent van de kolomexperimenten en in het bovenstaande water van de batchexperimenten.

### 3.4.2 UV-adsorptie (UV<sub>254</sub>)

De UV-adsorptie in water werd bepaald met spectrofotometrie (254 nm) en wordt uitgedrukt in E/m. Organische stoffen in het water hebben absorptiebanden in het bereik van ultraviolet licht. Deze eigenschap wordt als een maat voor de aanwezigheid van deze stoffen gebruikt, vooral als er zich geen sterke wisselingen in de kwalitatieve samenstelling voordoen. Het protocol is beschreven in huisvoorschrift LAM-033.

### 3.4.3 Nitraat (NO<sub>3</sub>)

De nitraatconcentratie in het water is bepaald volgens huisvoorschrift LAM-079 met spectrofotometrie. Het watermonster werd gemengd met een zwavel- en fosforzuuroplossing waarbij nitraationen reageren met 2,6-dimethylfenol tot 4-nitro-2,6-dimethylfenol. De kleuromslag is met de spectrofotometer geanalyseerd bij 345 nm.

### 3.4.4 Microbiologische analyses

Van het influent, effluent en filtermateriaal van de screening is het ATP-gehalte bepaald en is een deel behandeld en bewaard voor verdere DNA isolatie en NGS analyses.

### 3.4.5 Opwerking filtermateriaal

Het filtermateriaal is opgewerkt met LES (Lage Energie Sonificatie) om de biofilm met daarin de micro-organismen van het materiaal (zand) los te maken volgens protocol LMB-010. Hiervoor werd voor de screening 10 en 25 gram filtermateriaal gemengd met respectievelijk 62,5 en 156,25 ml steriel leidingwater. Voor de afbraakexperimenten werd 10 gram filtermateriaal gebruikt. Deze oplossingen zijn 2 minuten getrild in een ultrasoon waterbad (Branson) bij een frequentie van 40 kHz om de microbiële cellen los te maken van het filtermateriaal. Na bezinking van het filtermateriaal werd de bovenstaande vloeistof in behandeling genomen voor verdere ATP-analyse en DNA isolatie voor NGS.

### 3.4.6 ATP-bepaling

ATP is een energierijke verbinding die in alle levende cellen voorkomt en wordt gebruikt als maat voor de aanwezige hoeveelheid actieve biomassa. In deze studie zijn drie fracties van het ATP-gehalte bepaald: cellulair ATP (bevindt zich in de microbiële cellen), vrij ATP (bevindt zich niet in cellen), totaal ATP (de som van cellulair en vrij ATP). De bepaling is gebaseerd op een enzymreactie van luciferine met luciferase die alleen plaats vindt in de aanwezigheid van ATP. Het hierbij geproduceerde licht (in Relatieve Licht Eenheden) wordt omgerekend naar de concentratie ng/l ATP in het watermonster. ATP is bepaald volgens LMB-002 en conform NEN-EN 16421:2014.

## 3.5 Next Generation Sequencing (NGS)

Van het influent en effluent is 250 tot 1000 ml water gefiltreerd over 0,2 µm filter en deze zijn bewaard bij -20°C tot verdere opwerking. Van het filtermateriaal is het bovenstaande water (na LES) gefiltreerd (10, 1 en 0,1 ml) over 0,2 µm filters en deze zijn bewaard voor verdere opwerking en DNA isolatie. DNA werd uit de filters geïsoleerd met de DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen), conform KWR-huisvoorschrift LMB-069.

Gebarcodeerde fragmenten van het 16S rRNA gen (~300bp), gericht op de V4 hypervariabele regio, werden geamplificeerd met PCR uit de DNA extracties, gebruik makend van de primers 515F en 806R. Negatieve controles (blanco van DNase/RNase-vrij water tijdens filtratie en tijdens PCR) zijn meegenomen. De DNA-sequenties van de gezuiverde PCR producten zijn bepaald met de Illumina MiSeq sequencer bij KWR. Deze DNA-sequenties zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van het specialistische computerprogramma Mothur (9) en later ook met Qiime2 (10). Sequentie data analyse is ook gedaan met de R software packages Qiime2R en bijbehorende plugins (11), Ampvis2 (12), en phyloseq (13). In hoofdstuk 6 worden de resultaten van NGS toegelicht en wordt de methode uitgelegd.



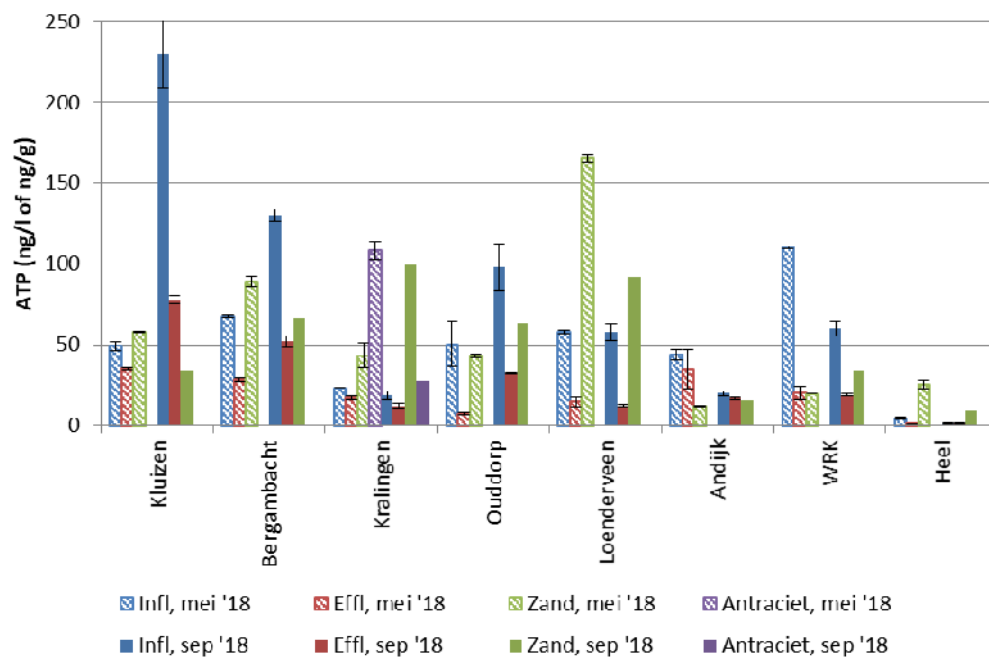
## 4 Screening van oppervlaktewaterzuiveringen op verwijdering van OMV

### 4.1 Inleiding

Bij de start van het project bleek weinig informatie beschikbaar over de verwijdering van OMV's in snelfilters. Drinkwaterbedrijven analyseren normaliter niet voor elk zuiveringsproces apart de verwijdering van OMV's. Daarom is als eerste stap een meetcampagne uitgevoerd. Hiervoor is op twee verschillende tijdstippen in het jaar (lente en herfst) het influent, effluent en filtermateriaal bemonsterd van acht snelfilters (allen oppervlaktewaterzuiveringen) in Nederland en België. Vervolgens is voor 127 verschillende OMV's semi-kwantitatief de concentratie bepaald in het influent en effluent. De NGS analyse en het ATP-gehalte zijn in alle monsters geanalyseerd. Met deze screening is in kaart gebracht of, welke en hoeveel OMV's er voorkomen in het influent water van deze productielocatie en of deze stoffen worden verwijderd.

### 4.2 ATP resultaten

De cellulaire ATP-concentraties, als maat voor de hoeveelheid actieve biomassa of micro-organismen, varieerden sterk tussen de verschillende zandfilters (Figuur 5). Bij alle filters was het cellulair ATP-gehalte in het influent van het filter hoger dan van het effluent, wat laat zien dat een deel van de micro-organismen werd verwijderd tijdens filtratie en dat de aantallen micro-organismen die loslieten van het zand en uitspoelden in verhouding lager zijn. De ATP-concentraties van het filtermateriaal varieerden ook sterk, dit heeft waarschijnlijk te maken met de samenstelling van het influentwater, het soort filtermateriaal en de heersende procescondities.



Figuur 5. Cellulair ATP-gehalte van influent, effluent en filtermateriaal (zand en antraciet) van de snelfilters van oppervlaktewater-productielocaties bemonsterd in mei en september 2018. Gegeven is het gemiddelde van 2 metingen met de standaarddeviatie. Alleen op locatie Kralingen is antraciet aanwezig. In Ouddorp is in mei 2018 het snelfilter na duinpassage bemonsterd, in september 2018 is het snelfilter voor duinpassage bemonsterd (Bijlage V, Tabel 12, Bijlage III).

### 4.3 Verwijdering organische microverontreinigingen in snelfilters

Een overzicht is gegeven van alle OMV-concentraties aangetroffen in het influent en effluent van de diverse filters (Bijlage I). In Figuur 6 is een overzicht gegeven van de OMV's die zijn aangetroffen in het influent van één van de filters en of deze OMV's verwijderd worden. Omdat de concentraties in het water bepaald zijn met een 1-punts calibratie, zijn de exact berekende verwijderingspercentages niet berekend, maar zijn deze onderverdeeld in drie categorieën volgens paragraaf 3.1.2:

In de meetcampagne worden drie categorieën OMV's en verwijdering onderscheiden:

- OMV's die aanwezig zijn in het influent en aanzienlijk worden verwijderd (criteria: paragraaf 3.1.2; groen in Figuur 6);
- OMV's die aanwezig zijn in het influent, maar niet worden verwijderd (rood in Figuur 6);
- OMV's die aanwezig zijn in het influent, maar waarvan de concentratie te laag is voor een betrouwbare uitspraak over verwijdering (rood met een \* in Figuur 6).

Over het algemeen varieerde de OMV-concentratie in het influent en de verwijdering van OMV's sterk tussen de verschillende snelle zandfilters. Dit wordt veroorzaakt door de verschillen in het ruwe water (oppervlaktewater voor de drinkwaterproductie) en door de zuiveringsstappen voorafgaand aan de snelfilters die mogelijk de OMV-concentratie beïnvloeden (Bijlage V). In totaal zijn 52 van de 127 OMV's waarop is gescreend aangetroffen in het influent van de snelfilters (Figuur 6) en de concentraties waren laag (0,01 – 2,03 µg/l; Bijlage I). Tien van deze 52 OMV's werden aanzienlijk verwijderd in één of meerdere snelfilters (categorie 1).

De meeste OMV's zijn aangetroffen in het influent van de snelfilters van Bergambacht (27 OMV's in mei, 33 OMV's in september) gevolgd door de WRK (27-29), Andijk (21-30), Ouddorp (20-28), Kralingen (24-25), Kluizen (16-25), Loenderveen (10-16) en Heel (8-9). Het aangetroffen aantal OMV's was het laagst in Loenderveen en Heel. Dit is te verklaren doordat de snelfilters van Loenderveen voornamelijk kwelwater uit de Bethunepolder ontvangen. De verwachting is dat dit water weinig OMV's bevat. Het water uit de Bethunepolder wordt soms aangevuld met wisselende hoeveelheden water vanuit het Amsterdam-Rijnkanaal, maar dit gebeurt slechts gedurende enkele beperkte periodes in het jaar. In Heel volgen de snelfilters op oeverfiltratie. Verschillende studies hebben aangetoond dat tijdens oeverfiltratie een aanzienlijk aantal OMV's verwijderd kan worden (14).

De snelfilters op locatie Bergambacht en de WRK lieten het vaakst goede verwijdering van OMV's zien. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat er in het influent van deze filters de meeste OMV's werden aangetroffen. De hogere verwijdering suggereert dat de microbiële populatie in deze snelfilters is geadapteerd aan de OMV's in het influent en de benodigde enzymen kan aanmaken die in staat zijn een aantal OMV's af te breken. Dit in tegenstelling tot snelfilters die minder OMV's ontvangen en daardoor ook minder goed in staat zijn tot afbraak. Hierbij moet opgemerkt worden dat de metingen in dit onderzoek niet het volledige OMV verwijderingspotentieel van de snelfilters weerspiegelt. De verwijdering van OMV's die niet of slechts in zeer lage concentraties in het influent zijn gedetecteerd kan niet goed worden beoordeeld. Tevens worden weliswaar veel, maar niet alle OMV's met de gebruikte analysemethode gemeten. Het werkelijke verwijderingspotentieel van elk snelfilter kan dus groter zijn. Acht stoffen (cafeïne, cyclamaat, gabapentine-lactam, metformine, saccharine, tri-n-butyl-fosfaat, valsartan en valsartan-zuur) werden goed verwijderd in het snelfilter van de WRK of Bergambacht in één of beide meetcampagnes (groen in Figuur 6).

De biologische verwijdering van deze stoffen wordt onderbouwd door andere studies. Zo hebben een aantal studies aangetoond dat cafeïne goed verwijderd kan worden in verschillende drinkwater filtratie processen op laboratoriumschaal (2, 15, 16). Tran et al. demonstreerden verwijdering van saccharine en cyclamaat tot onder het detectieniveau na biologische behandeling (gemodificeerd Ludzack-Ettinger (MLE)-proces) gevolgd door conventionele sedimentatie of MBR in een full-scale afvalwaterzuiveringsinstallatie (17). Hermes et al.

rapporteerde een hoge verwijdering (70-99%) van saccharine, gabapentine-lactam, valsartan en cafeïne in een sequentieel biofiltratie systeem (laboratoriumschaal) (18). Dit in tegenstelling tot Foolad et al. die beperkte verwijdering (12-15%) liet zien van saccharine en cyclamaat in laboratoriumschaal kolommen gevuld met bodemmateriaal. Deze variaties in verwijdering worden waarschijnlijk veroorzaakt door verschillen in experimentele opzet (bijvoorbeeld de waterkwaliteit, het filtermateriaal, temperatuur, pH, procescondities) (19).

De biologische verwijdering van metformine in afvalwaterzuiveringsinstallaties is algemeen bekend en gerapporteerd in verscheidene onderzoeken (20, 21), maar studies naar de verwijdering van metformine in drinkwaterzuiveringen zijn zeer beperkt. Scheurer et al. toonde met batchproeven (laboratoriumschaal) aan dat, in tegenstelling tot chloreren, flocculatie en actieve koolfiltratie (micro-organismen geïnactiveerd met natriumazide, dus alleen sorptie van metformine) niet effectief waren voor de verwijdering van metformine (22). Dit is in tegenspraak met een studie van Piai et al. die een effectieve verwijdering van metformine rapporteerden in batch-experimenten representatief voor GAC-filtratie in een Nederlandse drinkwaterzuivering (23). Aangezien Scheurer et al. specifiek hebben gekeken naar sorptie van metformine aan actief-kool, kan de verwijdering in de studie van Piai et al. hoogstwaarschijnlijk worden toegeschreven aan biodegradatie (22). Door het monitoren van full-scale drinkwaterzuiveringen toonde Scheurer et al. aan dat oeverfiltratie en kunstmatige infiltratie in staat waren metformine volledig te verwijderen (22).

Een aantal stoffen werd in vijf of meer snelfilters niet verwijderd: 1H-benzotriazole, 4-methyl-1H-benzotriazole, 5-methyl-1H-benzotriazole, acesulfaam-K, carbamazepine, gabapentine, lamotrigine, N-acetyl-4-aminoantipyrine, en N-formyl-4-aminoantipyrine. Dit suggereert dat sommige OMV's niet biologisch kunnen worden afgebroken. Het persistente gedrag van acesulfaam-K komt overeen met het gebruik als antropogene marker (24), maar er zijn ook onderzoeken die aantonen dat acesulfaam-K wel biologisch kan worden afgebroken (25, 26). Dit laat zien dat het aantonen van persistentie van OMV's in het algemeen niet mogelijk is, maar alleen aangetoond kon worden voor de toegepaste experimentele omstandigheden.

Sommige OMV's zoals metformine en tri-n-butyl-fosfaat, lieten een aanzienlijke verwijdering (53 – 78%) zien in één van de snelfilters, maar vertoonden persistent gedrag in (één of meer van de) andere snelfilters. Het is mogelijk dat alleen op deze locaties de microbiële populatie in de snelfilters in staat was de juiste enzymen uit te scheiden, maar verder onderzoek is nodig om deze hypothese te toetsen.

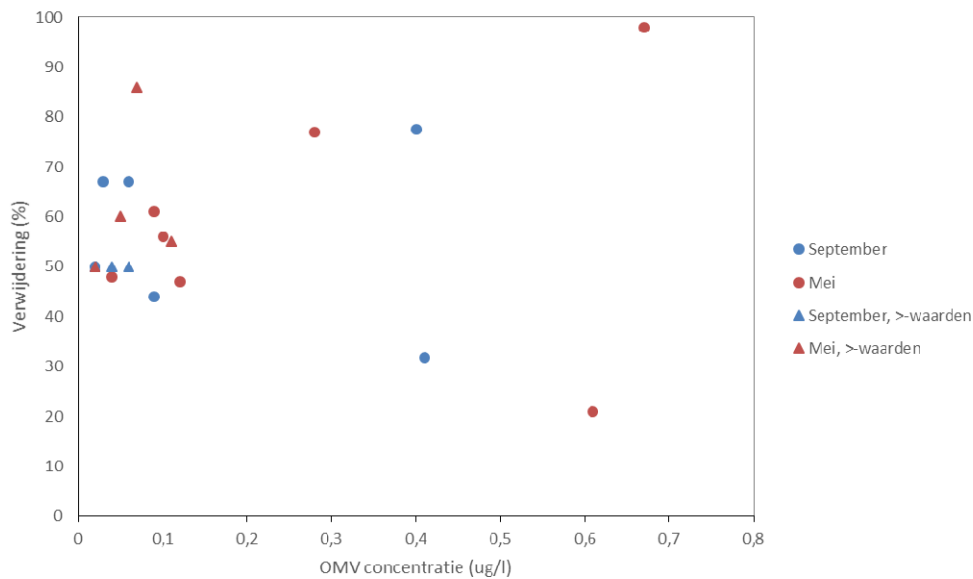
Nakamura et al. rapporteerden een beperkte verwijdering van tri-n-butyl-fosfaat in een conventionele afvalwaterzuiveringsinstallatie, maar een effectieve verwijdering met poederkool (27). Standaard drinkwaterzuiveringsprocessen zoals bezinking, coagulatie, flocculatie en snelfiltratie (zand) of duinfiltratie bleken niet in staat tri-n-butyl-fosfaat te verwijderen (28).

Voor zover bekend bij de auteurs van dit rapport, is dit de eerste studie die de verwijdering aantoont van metformine en tri-n-butyl-fosfaat in full-scale snelfilters (zand) in een drinkwaterzuivering.

	Cas-nummer	Heel		Kluizen		Kralingen		WRK		Andijk		Loenderveen		Bergambacht		Ouddorp	
		mei	sep	mei	sep	mei	sep	mei	sep	mei	sep	mei	sep	mei	sep	mei	sep
1-H-benzotriazool	95-14-7		*	*													
2,6-Dichloorbenzamide (BAM)	2008-58-4			*	*												
2-Aminoacetofenon	551-93-9									*		*					
4-Chloor-2-methylfenoxijazijnzuur (MCPA)	94-74-6				*						*						
4-Methyl-1H-benzotriazool	29878-31-7	*	*										*				
5-Methyl-1H-benzotriazool	136-85-6	*	*										*				
Acesulfaam-K	55589-62-3	*	*	*	*				*			*		*	*	*	*
Bentazon	25057-89-0	*	*	*	*				*			*		*	*	*	*
Caffeïne	58-08-2			*		*			*	*				*	*		
Candesartan	139481-59-7					*	*		*		*			*	*	*	*
Carbamazepine	298-46-4	*	*	*	*				*		*		*	*	*	*	*
Carbendazim	10605-21-7			*						*				*	*		
Chloortoluron	15545-48-9			*	*									*	*	*	*
Chloridazon	1698-60-8					*	*		*		*			*	*	*	*
Cyclamaat	139-05-9			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Desfenylchloridazon	6339-19-1	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Dimethenamid-P	87674-68-8			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Dimethomorfol (isomeer 1+2)	110488-70-5			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gabapentine	60142-96-3	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gabapentine-lactam	64744-50-9			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Guanyloreum	141-83-3			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
HMMM	3089-11-0			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Irbesartan	138402-11-6			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lamotrigine	84057-84-1		*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metazachloor	67129-08-2			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metazachloor ESA	172960-62-2			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metazachloor OA	1231244-60-2			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metformine	657-24-9			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metobromuron	3060-89-7			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metolachloor ESA	171118-09-5			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metolachloor OA	152019-73-3	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Metoprolol	37350-58-6			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
N-acetyl-4-aminoantipyrine	83-15-8			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
N-formyl-4-aminoantipyrine	1672-58-8			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nicotine zuur	59-67-6			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Phenazon	60-80-0			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Saccharine	81-07-2			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sitagliptine	486460-32-6			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sotalol	3930-20-9			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sucralose	56038-13-2			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sulfadiazine	68-35-9			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sulfadimidine	2921-88-2			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sulfamethoxazool	723-46-6			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Terbutylazijn	5915-41-3			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tetraglyme	70992-84-6			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tramadol	27203-92-5			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Triethylfosfaat	78-40-0			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Trifenyfosfineoxide	791-28-6			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tri-n-butyl-fosfaat	126-73-8			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Valsartan	137862-53-4			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Valsartan-zuur	164265-78-5			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Venlafaxine	93413-69-5			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*

Figuur 6. Verwijdering van organische microverontreinigingen in de snelfilters in mei en september 2018. Wit: OMV-concentratie in influent onder de detectiegrens; rood: geen verwijdering; groen: goede verwijdering. Classificering rood-groen zoals beschreven in paragraaf 3.1.2. \* concentratie in influent te laag om betrouwbaar verwijdering aan te tonen volgens classificatie in paragraaf 3.1.2. Gemeten concentraties staan vermeld in Bijlage V.

Op basis van de data verkregen in deze meetcampagne is er geen relatie gevonden tussen de OMV concentratie in het influent en de OMV verwijdering, al was ook niet verwacht dat er een relatie zou zijn omdat de verschillen in influentconcentratie beperkt zijn (Figuur 6). Ook is er geen relatie gevonden tussen de biologische activiteit in het snelfilter (ATP) en het aantal verwijderde OMV's. Zo werd de WRK gekenmerkt door gemiddeld een van de laagste ATP concentraties, maar was dit filter wel in staat de meeste OMV te verwijderen. Daarentegen werd het snelfilter uit Loenderveen gekenmerkt door de hoogste ATP concentratie, maar kon er slechts verwijdering van één OMV worden waargenomen in dit filter. Dit was tevens één van de snelfilters met relatief weinig OMV's in het influent. De laagste ATP concentratie werd waargenomen in het snelfilter van Andijk, maar hier werden weer relatief veel OMV's aangetroffen in het influent.



Figuur 7. Influent OMV concentratie versus verwijdering van de snelfilters.

De verschillen in OMV verwijdering tussen de diverse snelfilters kon niet worden verklaard aan de hand van OMV-structuur, hydrofobiciteit of voorspelde biologische afbreekbaarheid van de stof (DiMarcantonio, et al., Bijlage I).

Dit suggereert dat andere parameters die de samenstelling van de microbiële populatie beïnvloeden, hiervoor verantwoordelijk en filter specifiek zijn, zoals:

- influent waterkwaliteit (bijv. concentratie gemakkelijk biodegradeerbaar organisch materiaal of temperatuur) (29, 30);
- procesomstandigheden (bijv. redox, type en conditie (aangroei) filtermedium, verblijftijd, filterleeftijd) (30, 31);

De suspect screening die gebruikt is in dit onderzoek analyseert “slechts” 127 OMV’s op twee tijdstippen. Het doel van deze screening was om te onderzoeken welke OMV’s het beste gebruikt konden worden in de ophopingsexperimenten, met andere woorden: met welke OMV’s de meeste kans op een succesvol ophopingsexperiment bestond. Het verklaren van verschillen in verwijderingscapaciteit van OMV’s tussen de acht snelfilters viel buiten de scope van dit onderzoek.

Toekomstig onderzoek waarbij de snelfilters frequenter worden bemonsterd voor een langere periode, waarbij meer OMV’s alsook micro-organismen/enzymen worden geanalyseerd en ook het influent uitgebreid wordt gekarakteriseerd zou de hierboven genoemde hypothesen kunnen testen.

#### 4.4 Identificatie van gevormde transformatieproducten in snelle zandfilters

Het identificeren van transformatieproducten die gevormd worden in snelfilters in combinatie met de verwijdering van OMV’s en de analyse van de microbiële populatie (NGS) zijn vastgelegd in het rapport “Monitoring transformation product formation in drinking water treatment” (nog geen rapportnummer bekend) van Andrea Brunner et al., 2020 en het wetenschappelijke artikel “Organic micropollutant removal in full-scale rapid sand filters

used for drinking water treatment in The Netherlands and Belgium” van Camilla di Marcantonio, Cheryl Bertelkamp, Nikki van Bel, Tessa Pronk, Peer Timmers, Paul van der Wielen en Andrea Brunner dat is ingediend bij Chemosphere (Bijlage I). Hieronder wordt een beknopte samenvatting gegeven van het onderzoek.

Biologische processen in de drinkwaterzuivering hebben het potentieel om OMV's te verwijderen. De OMV verwijderingscapaciteit van processen zoals snelfilters is tot op heden niet uitgebreid onderzocht. In deze studie is de OMV verwijdering tezamen met de gevormde transformatieproducten onderzocht in zeven full-scale snelfilters (allen gevoed met oppervlaktewater) in Nederland en België. Dit is gedaan met behulp van hoge-resolutie massaspectrometrie op basis van kwantitatieve suspect en non-target screening (NTS). Daarnaast zijn de microbiële populaties in zowel het influent als effluent en het filtermedium in kaart gebracht door middel van 16S rRNA-gen-ampliconsequencing. Deze gegevens zijn geïntegreerd om de processen die van invloed zijn op de OMV verwijdering uitgebreid te kunnen beoordelen.

In het influent van de snelfilters werden er in totaal 30 van de 127 OMV's waarop gescreend werd, gedetecteerd. De verwijdering varieerde van 0 tot 93%. Er werd een data-driven workflow opgezet om transformatieproducten te monitoren, gebaseerd op de combinatie van NTS-functie-intensiteitsprofielen tussen influent- en effluentmonsters en de voorspelling van biotische transformatieproducten. Op basis van modellen identificeerde deze workflow tien transformatieproducten waarmee transformatieproducten voorspeld kunnen worden, vervolgens is gemeten of deze transformatieproducten aanwezig waren. De analyse van de microbiële populatie op het snelfiltermateriaal toonde een vergelijkbare samenstelling als het influent en effluent in de meeste snelfilters aan, maar verschilde wel per filtermedium. Dit impliceert dat specifieke micro-organismen groeien in het filtermateriaal van snelfilters. Sommige van deze micro-organismen zijn in staat om processen uit te voeren die kenmerkend zijn voor deze filters, zoals nitrificatie en ijzeroxidatie. Er was echter geen duidelijk verband tussen de efficiëntie van de OMV verwijdering en de samenstelling van de microbiële gemeenschap te waar te nemen. Dit betekent dat OMV's hoogstwaarschijnlijk via co-metabolisme worden afgebroken in deze filters, door micro-organismen die niet tot de dominante groepen van de gemeenschap behoren, of door (bio)sorptie.

#### 4.5 Keuze van stoffen voor afbraakexperimenten

Op basis van de screening en in overleg met de begeleidingsgroep van dit project is ervoor gekozen om de afbraakexperimenten uit te voeren met de stoffen pyrazool en metformine en filtermateriaal van de snelfilters van de WRK. Het filtermateriaal van de WRK verwijdert over het algemeen de meeste stoffen, waaronder metformine. Metformine is aangetroffen in het influent van de meeste zandfilters, met uitzondering van Heel en Ouddorp in mei 2018 en de locatie Heel in september 2018 (Bijlage I).

Daarnaast is metformine een veel onderzochte stof in de wetenschappelijke literatuur op het gebied van afvalwater. Het is algemeen bekend dat metformine in het actief-slib proces van een afvalwaterzuivering omgezet kan worden in guanylureum en dit aspect is ook in veel studies onderzocht (20, 21, 32, 33). Onderzoek naar het gedrag van metformine in de drinkwaterzuivering is daarentegen beperkt (22, 23).

Pyrazool is niet gemeten in de screening, maar uit eigen metingen van Waternet is bekend dat drie goedwerkende snelfilters van de WRK in oktober 2016 85-95% pyrazool verwijderden. Pyrazool is nog steeds aanwezig in het water van de Lek (en dus ook in het influent water van de snelfilters van de WRK), maar vertoont wel een dalende trend sinds augustus 2015.

Vanwege de ervaringen met de lozing van hoge concentraties pyrazool in de Maas in de zomer van 2015 en het feit dat de snelfilters van verschillende locaties grote verschillen in pyrazoolverwijdering lieten zien (34-36), is ervoor gekozen om ook deze stof te gebruiken voor de afbraakexperimenten. Behalve de hierboven genoemde studies van KWR is er in de wetenschappelijke literatuur geen informatie beschikbaar over biologische afbraak van pyrazool in drinkwater- of afvalwaterzuiveringen.

## 5 Biologische afbraak van OMV in laboratoriumexperimenten

### 5.1 Afbraak van metformine en pyrazool in batch- en kolomexperimenten

#### 5.1.1 Batchexperimenten

##### 5.1.1.1 Metformine en guanylureum

In de eerste twee weken daalde de zuurstofconcentratie sterk, waarna de doppen van de flessen zijn aangepast en de zuurstofconcentratie weer langzaam toenam. De positieve nitraat- en zuurstofconcentraties in het water laten zien dat er geen anoxische omstandigheden heersten in de flessen (Figuur 33, Bijlage VI). Indien er geen zuurstof meer beschikbaar is voor de micro-organismen als electronacceptor zal vervolgens nitraat gebruikt worden. Een dalende nitraatconcentratie is dus een teken van nitraatreducerende omstandigheden. Hoewel de flessen drie keer per week goed zijn geschud, waarbij het filtermateriaal geheel in oplossing kwam, kan echter niet worden uitgesloten dat in het filtermateriaal op individuele plekken een anoxisch milieu heerste (anoxische pockets).

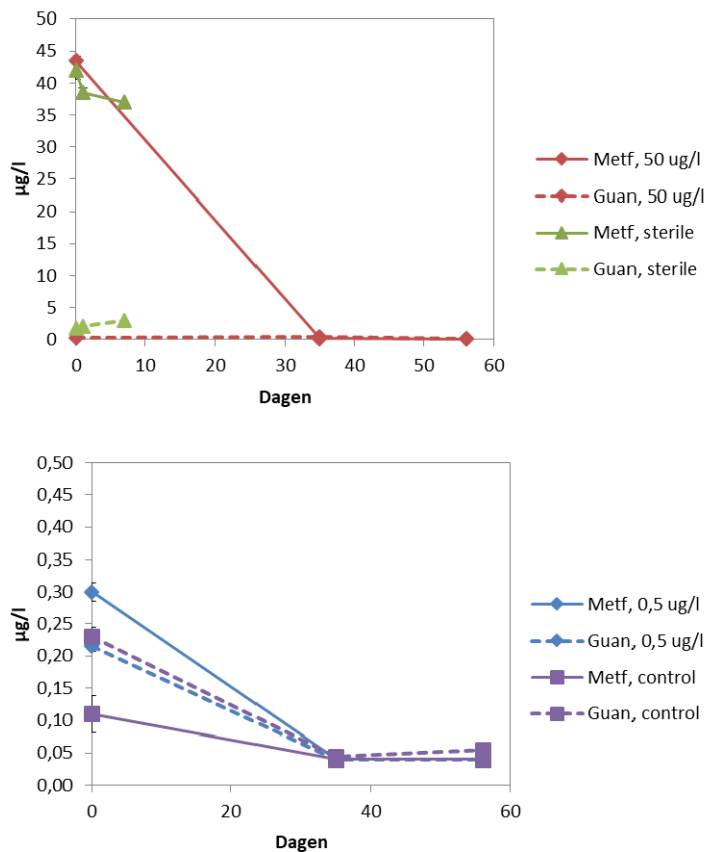
Gedurende de 56 dagen van het experiment namen de pH en elektrische geleidbaarheid in de flessen licht toe (Figuur 33, Bijlage VI). Deze parameters varieerden niet tussen de dosering van een 0,5 µg/l of 50 µg/l metformine. Gezien de hoge concentratie aanwezige opgeloste koolstof in het influentwater (mg/l range), is het ook erg onwaarschijnlijk dat de dosering van 0,5 of 50 µg/l metformine hierop een significant verschil maakt voor deze parameters.

ATP is een parameter voor actieve biomassa en geeft een indicatie van de hoeveelheid, en de dynamiek in de tijd, van de aanwezige biomassa (voornamelijk micro-organismen) in het water en op het filtermateriaal. Nagenoeg al het ATP in het filtermateriaal en water bestond uit cellulair ATP, slechts een klein deel was vrij voorkomend ATP (Figuur 34 in Bijlage VI). Vrij ATP is uitgescheiden door micro-organismen, maar niet langer met micro-organismen geassocieerd. In alle flessen daalde de concentratie cellulair ATP in het zand in de eerste 7 dagen, waarna het weer licht toenam en stabiel bleef gedurende de 56 dagen van het experiment. De daling in de eerste 7 dagen wordt vermoedelijk veroorzaakt doordat micro-organismen in die periode afsterven door de veranderde omstandigheden in de fles t.o.v. de full scale zandfilters. Na deze fase nam het ATP-gehalte weer enigszins toe, wat een indicatie is van een toename van microbiële activiteit. In het water nam de ATP concentratie iets meer toe, wat erop duidt dat de micro-organismen in het water groeien of dat micro-organismen van het filtermateriaal in het water terecht komen.

De 'steriele' flessen bleken ondanks de gammabestraling niet steriel te zijn. Er was nog steeds ATP aanwezig in deze flessen, al was de ATP-concentratie lager dan in de niet-gesteriliseerde flessen. Het is onbekend of de flessen bij de start gecontamineerd zijn geraakt met micro-organismen die vanuit de lucht of vanaf materialen in de fles zijn gevallen, of dat de flessen niet volledig zijn gesteriliseerd door de gammastraling. Het kan daarom niet worden uitgesloten dat micro-organismen metformine in deze flessen kon afbreken door microbiologische activiteit.

In de gamma bestraalde flessen vond slechts zeer beperkte verwijdering van metformine plaats (5-14% verwijdering in 1-7 dagen; Figuur 8, Figuur 9). De ATP-analyses laten zien dat in deze flessen een beperkte microbiële populatie aanwezig was. Naast biodegradatie van metformine in deze flessen kan de verwijdering veroorzaakt zijn door sorptie van metformine aan het filtermateriaal. De zeer beperkte toename van de guanylureum-concentratie suggereert dat biodegradatie hier (mede) verantwoordelijk voor is.

Deze resultaten laten zien dat de verwijdering van metformine in het batch-experiment nagenoeg geheel wordt veroorzaakt door biologische afbraak en in veel mindere mate door sorptie van metformine (en guanylureum) aan het filtermateriaal. Dit blijkt uit de beperkte afbraak van metformine in de gamma bestraalde flessen waar verwijdering van metformine, bij volledige sterilisatie, alleen veroorzaakt kan worden door sorptie.

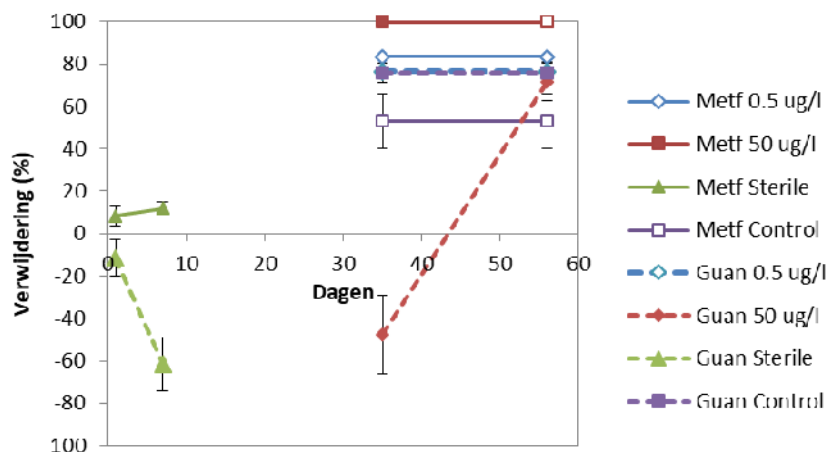


Figuur 8. Concentratie metformine en guanylureum in de batchexperimenten. Gegeven is het gemiddelde (N=2). \* De detectielimiet van de methode is 0,05 µg/l; als de gemeten concentratie < 0,05 µg/l is, is deze weergegeven als 0,04 µg/l in de grafiek. Control = blanco

De metformineconcentratie daalde snel in de batchexperimenten waaraan 0,5 µg/l of 50 µg/l metformine is gedoseerd (Figuur 8, Figuur 9). Al na 35 dagen werd er geen metformine meer gedetecteerd in deze flessen en is het percentage verwijdering hoger dan 80-90%. Guanylureum is van nature in lage concentraties aanwezig in het influent water (0,2 – 0,25 µg/l), maar werd niet meetbaar gevormd tijdens de biologische afbraak van metformine in de 0,5 of 50 µg/l conditie. De percentuele toename van guanylureum in Figuur 9 (50 µg/l conditie op dag 35) suggereert dat guanylureum wordt gevormd tijdens de biologische afbraak van metformine. Echter, bij bestudering van de gemeten concentraties bleek dat de guanylureumconcentratie slechts van 0,2 naar 0,3 µg/l steeg, en dat het dus niet in grote mate werd gevormd of dat het werd gevormd maar meteen werd omgezet tot een onbekende stof. De microbiële populatie op het filtermateriaal of in het water van de flessen was dus in staat om zowel metformine als guanylureum biologisch af te breken.

In de blanco flessen ("Control" in Figuur 9) werd de al aanwezige metformine in het influent water ook verwijderd. Interessant is dat het afbraakproduct van metformine, guanylureum, nauwelijks werd aangetroffen in deze flessen.

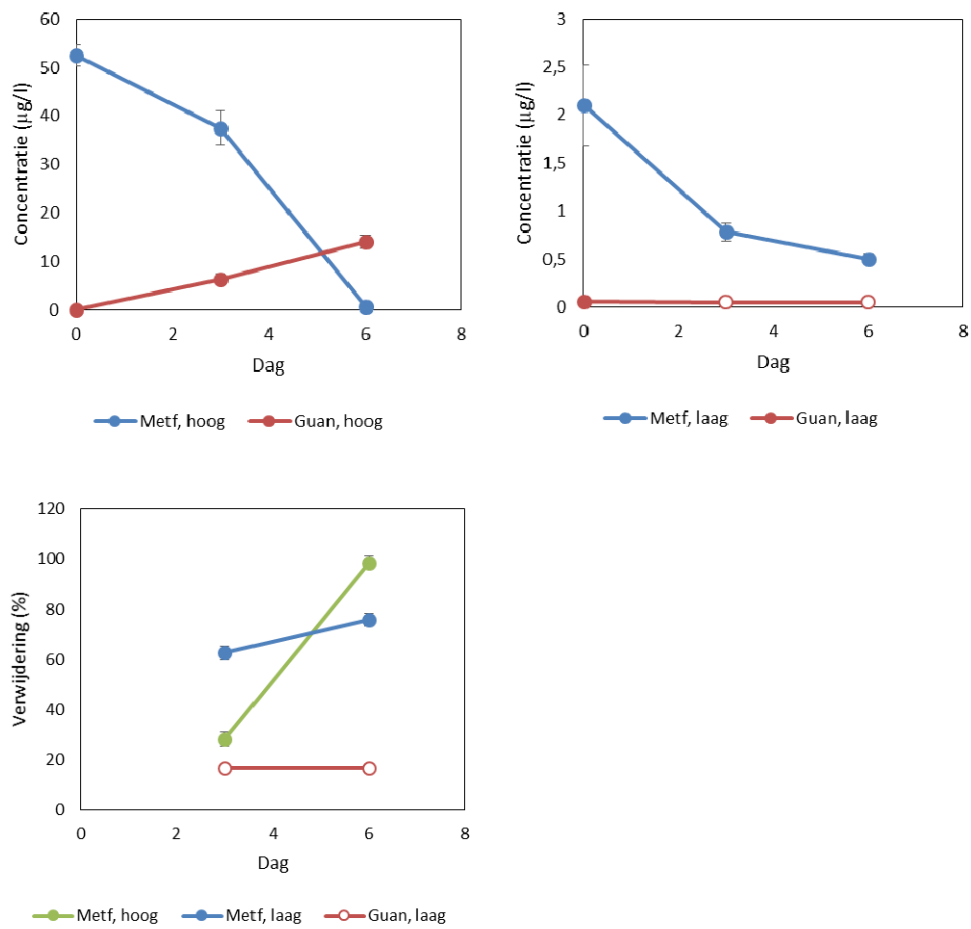




Figuur 9. Verwijdering van metformine en guanylureum in percentages in de batchexperimenten. Gegeven is het gemiddelde ( $N=2$ ) met standaarddeviatie. Open symbool: de concentratie is onder de detectielimiet, waardoor het percentage verwijdering een '>-waarde' is. Control = blanco

Na 104 dagen is nog een keer metformine aan de flessen gedoseerd om na te gaan of metformine nog steeds kan worden afgebroken en hoe snel dit proces gaat. Metformine is 6 dagen na het extra doseren bijna helemaal afgebroken, ongeacht de startconcentratie (Figuur 10, Tabel 9). Bij dosering van ongeveer  $2 \mu\text{g/l}$  metformine werd er geen meetbare concentratie guanylureum gevormd ( $<0,05 \mu\text{g/l}$ ; Tabel 9). Alle gevormde guanylureum is dus afgebroken door de aanwezige microbiële populatie. Bij dosering van  $50 \mu\text{g/l}$  metformine nam de concentratie guanylureum in het water wel sterk toe, van gemiddeld  $0,07 \mu\text{g/l}$  op dag 0 tot  $6,3 \mu\text{g/l}$  op dag 3 en  $14 \mu\text{g/l}$  op dag 7 (Figuur 10).

Op basis van de massabalans zou de afbraak van bijna  $50 \mu\text{g/l}$  metformine moeten leiden tot de vorming van  $40,9 \mu\text{g/l}$  guanylureum (dag 7; Tabel 9). Aangezien de gemeten guanylureum-toename lager is dan wanneer alle afgebroken metformine omgezet zou zijn in guanylureum, wijst dit erop dat guanylureum in de flessen gedeeltelijk is afgebroken. Mogelijk heeft de microbiële populatie meer tijd nodig om deze stof af te breken, of is de populatie veranderd door de lange afwezigheid van guanylureum tussen dag 35 en dag 104 en is het alleen in staat lagere hoeveelheden guanylureum af te breken. De lange periode zonder metformine of guanylureum lijkt echter geen (sterk) effect te hebben op de metformine-afbrekende micro-organismen aangezien metformine binnen een week wordt afgebroken. Of metformine- en guanylureum-afbrekende micro-organismen hetzelfde bacteriesoort zijn, valt buiten de scope van dit onderzoek en is daarom niet verder onderzocht.



Figuur 10. Concentratie (boven) en percentage verwijdering (onder) van metformine en guanylureum in de batchexperimenten na herdosering van metformine in week 14. Gegeven is het gemiddelde ( $N=2$ ) met standaarddeviatie (SD). Open symbool: de concentratie is onder de detectielimiet ( $0,05 \mu\text{g/l}$ ). Het verwijderingspercentage van guanylureum, bij dosering van een hoge concentratie metformine, is niet weergegeven in de figuur linksonder zodat de verschillen tussen de andere behandelingen duidelijk zichtbaar zijn in de figuur.

Tabel 9. Concentratie metformine ( $\mu\text{g/l}$ ) en guanylureum ( $\mu\text{g/l}$ ) in de flessen na herdosering van metformine op dag 104. Hoeveelheid metformine die is afgebroken en gevormd is ten op zich van dag 0. De concentratie guanylureum die op basis van de koolstofmassabalans gevormd zou moeten worden is berekend.

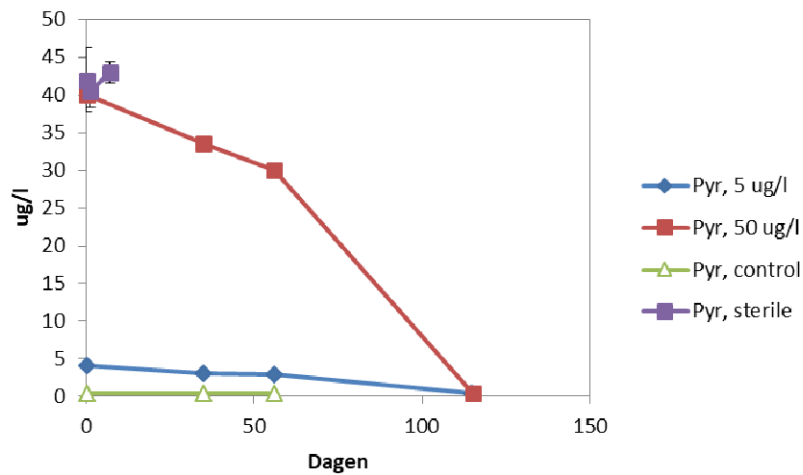
Dosering 0,5 $\mu\text{g/l}$ metformine		Eenheid	Dag 0	Dag 3	Dag 6
Metformine		$\mu\text{g/l}$	2,1	0,78	0,505
Guanylureum		$\mu\text{g/l}$	0,06	<0,05	<0,05
Afbraak metformine t.o.v. dag 0		$\mu\text{g/l}$		1,32	1,60
Vorming guanylureum t.o.v. dag 0		$\mu\text{g/l}$		>0,01	>0,01
Afbraak metformine t.o.v. dag 0		$\text{mol/l}$		$1,02 \times 10^{-8}$	$1,23 \times 10^{-8}$
Voorspelde vorming guanylureum t.o.v. dag 0		$\text{mol/l}$		$1,02 \times 10^{-8}$	$1,23 \times 10^{-8}$
Voorspelde vorming guanylureum t.o.v. dag 0		$\mu\text{g/l}$		1,04	1,26
<b>Dosering 50 <math>\mu\text{g/l}</math> metformine</b>			<b>Dag 0</b>	<b>Dag 3</b>	<b>Dag 6</b>
Metformine		$\mu\text{g/l}$	52,5	37,5	0,735
Guanylureum		$\mu\text{g/l}$	0,07	6,35	14
Afbraak metformine t.o.v. dag 0		$\mu\text{g/l}$		15	51,77
Vorming guanylureum t.o.v. dag 0		$\mu\text{g/l}$		-6,28	-13,93
Afbraak metformine t.o.v. dag 0		$\text{mol/l}$		$1,16 \times 10^{-7}$	$4,01 \times 10^{-7}$
Voorspelde vorming guanylureum t.o.v. dag 0		$\text{mol/l}$		$1,16 \times 10^{-7}$	$4,01 \times 10^{-7}$
Voorspelde vorming guanylureum t.o.v. dag 0		$\mu\text{g/l}$		11,86	40,92

#### 5.1.1.2 Pyrazool

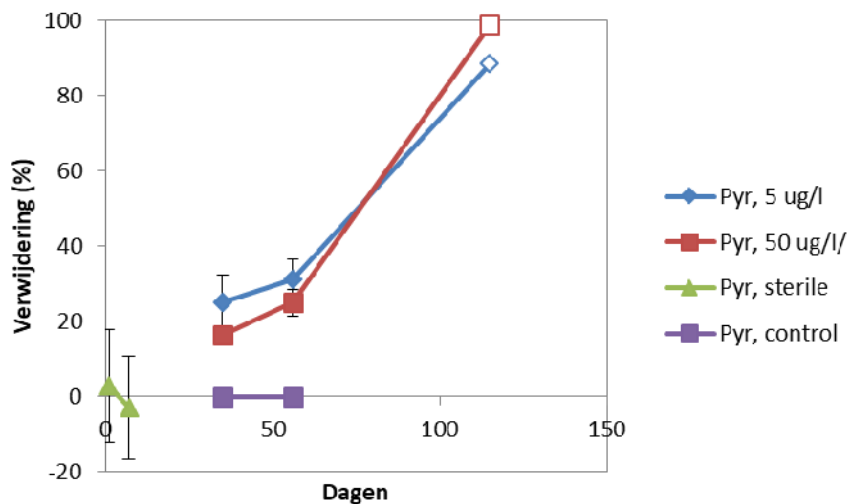
In de batchexperimenten waaraan pyrazool is gedoseerd waren de nitraat- en zuurstofconcentraties, de pH en de elektrische geleidbaarheid vergelijkbaar met de metformine afbraakexperimenten (Figuur 35 in Bijlage VI). Ondanks het lage zuurstofgehalte in week 2 is het experiment nooit zuurstofloos geweest, wat ook terug te zien is in de continue aanwezigheid van nitraat. Ook in dit experiment zijn vanaf week 3 de doppen vervangen door geperforeerd aluminiumfolie.

Ook de trends van de ATP-concentraties in het water en het zand waren vergelijkbaar met de metformine-experimenten (Figuur 36 in Bijlage VI). Er was voornamelijk cellulair ATP aanwezig in het water en filtermateriaal, waarbij geen duidelijk verschil zichtbaar was tussen de experimenten met pyrazool (5  $\mu\text{g/l}$  of 50  $\mu\text{g/l}$ ) en de blanco. Ook hier zijn de steriele flessen bij de start besmet geraakt, al is de ATP-concentratie lager dan in de andere flessen.

In de steriele flessen daalde het pyrazoolgehalte nauwelijks (-13% tot 13%), de sorptie of fysisch/chemische afbraak van pyrazool was dus beperkt (Figuur 11, Figuur 12). Dit komt overeen met eerdere studies naar de verwijdering van pyrazool in biologische zuiveringsprocessen (35). Verwijdering van pyrazool in de andere flessen is daarom grotendeels toe te kennen aan biologische afbraak. In het water dat voor dit experiment is gebruikt (influent water van het snelfilter van de WRK) was de pyrazoolconcentratie onder de detectielimiet, waardoor in de controleflessen geen afbraak gemeten kon worden. Bij dosering van 5 of 50  $\mu\text{g/l}$  pyrazool aan de flessen met filtermateriaal was de afbraak na 35 en 56 dagen min of meer vergelijkbaar en werd 18 - 35% verwijderd. Een extra meting na 115 dagen laat zien dat pyrazool geheel werd afgebroken. Pyrazoolafbraak in de flessen was langzamer dan de afbraak van metformine, maar er vond wel afbraak plaats.



Figuur 11. Concentratie pyrazool in de batchexperimenten. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD. De detectielimiet van de methode is 0,5 µg/l, als de gemeten concentratie onder de detectielimiet is, is dit weergegeven met een open symbol. De steriele flessen zijn alleen gemeten op dag 0, 1 en 7. Control = blanco



Figuur 12. Verwijdering van pyrazool in percentages in de batchexperimenten. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met standaarddeviatie. \* De concentratie is onder de detectielimiet (0,5 µg/l), waardoor het verwijderingspercentage een '>-waarde' is. Control = blanco

### 5.1.2 Kolomexperimenten

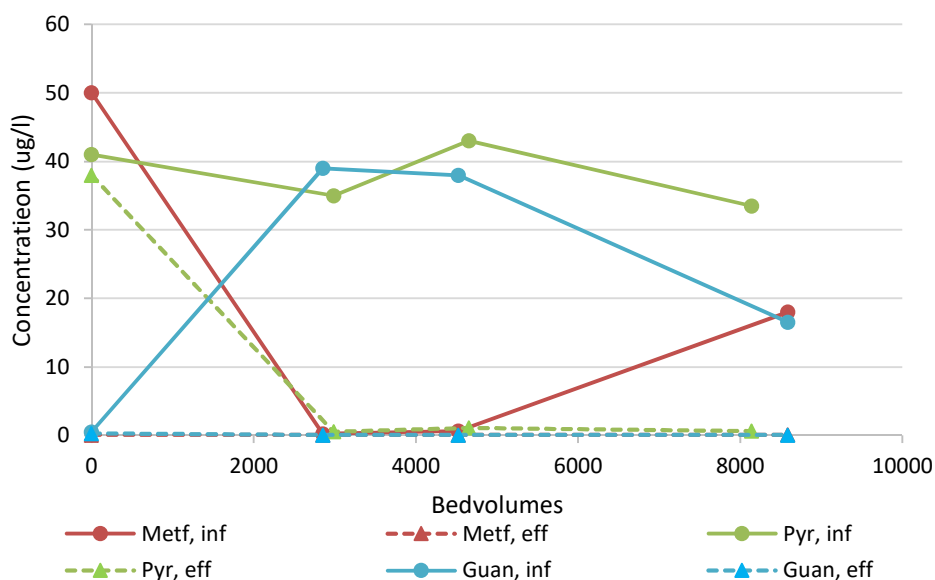
De pH, zuurstofconcentratie en EGV in de kolommen veranderden niet tot nauwelijks tijdens passage van het water over de kolom, maar werden meer beïnvloed door veranderingen in het influentwater (Figuur 37 in Bijlage VI). De pH varieerde tussen 6,3 en 8,2 in de eerste 56 dagen (4600 bedvolumes), het zuurstofgehalte varieerde tussen 8,0 en 13,1 mg/l en de EGV nam sterk toe (673 – 1074 mS/m) tussen dag 35 en 56 (2900 – 4600 bedvolumes). Deze dynamiek werd veroorzaakt door variaties in het influentwater en niet door veranderingen tijdens passage over de kolom. De nitraatconcentratie nam licht toe tijdens passage over de kolom, met name op dag 0 en dag 35 (0 en 2900 bedvolumes). Een verklaring hiervoor is niet gevonden.

De totale ATP-concentratie in het influent van beide kolommen varieerde gedurende de 56 dagen (4600 bedvolumes) van het experiment rond de 100 ng/l, terwijl de totaal ATP-concentratie in het effluent na de eerste week daalde en vervolgens stabiel bleef (Figuur 38 in Bijlage VI). Ook de ATP-concentratie in het filtermateriaal van

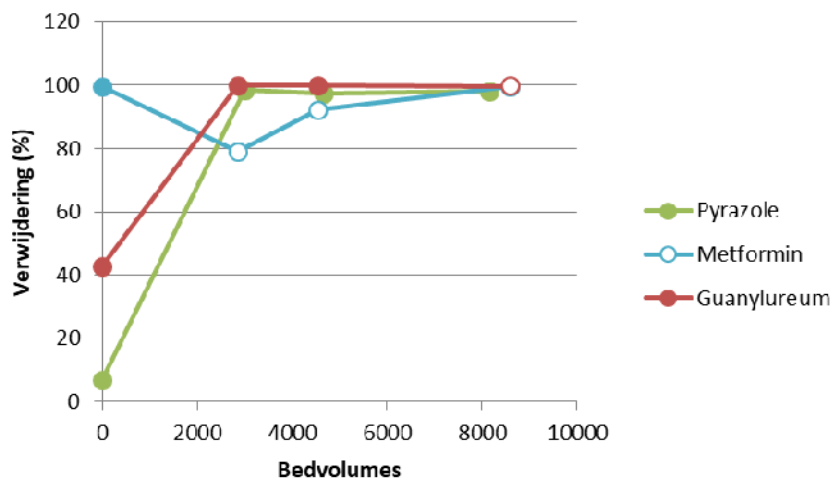
beide kolommen was stabiel. In het influent, effluent en filtermateriaal bestaat het ATP voornamelijk uit cellulair ATP en is slechts een klein percentage vrij ATP.

Al na 35 dagen (2900 bedvolumes) daalde de pyrazoolconcentratie in het effluent van de kolommen onder de detectielimiet ( $<0,5 \mu\text{g/l}$ ; Figuur 13, Figuur 14), waarmee de pyrazoolverwijdering in de kolommen dus sneller was dan in de batchexperimenten. Ook na 56 en 114 dagen (4600 en 8350 bedvolumes) werd pyrazool nog geheel verwijderd in de kolom.

De resultaten voor de verwijdering van metformine in de kolom waren minder eenduidig (Figuur 13, Figuur 14). Op dag 0 (gemeten 1 uur na de start van de kolommen; 3 – 4 bedvolumes) lag de metformineconcentratie in het effluent onder de detectiegrens, wat wijst op biologische afbraak van metformine. Er is geen guanylureum aangetroffen in het effluent, wat erop wijst dat er ook afbraak van guanylureum plaatsvond. Een andere mogelijkheid is dat de stoffen aan het filtermateriaal adsorberen en dat er geen afbraak plaatsvindt. Omdat in de batchexperimenten de sorptie minimaal was, gaat het hier waarschijnlijk al om biologische afbraak. Vanaf dag 35 (2900 bedvolumes) was de metformineconcentratie in het influent echter erg laag ( $0,3 - 0,7 \mu\text{g/l}$ ), maar was de guanylureumconcentratie juist hoog ( $19 - 39 \mu\text{g/l}$ ). Beide stoffen werden vervolgens afgebroken in de kolom en de concentratie in het effluent lag onder de detectielimiet.



Figuur 13. Concentratie pyrazool, metformine en guanylureum in het influent en effluent van de kolommen op dag 0 (1 uur na start; 3 – 4 bedvolumes), dag 35 (2900 bedvolumes), dag 56 (4600 bedvolumes) en dag 114 (4 dagen na verversen tank; 8350 bedvolumes).

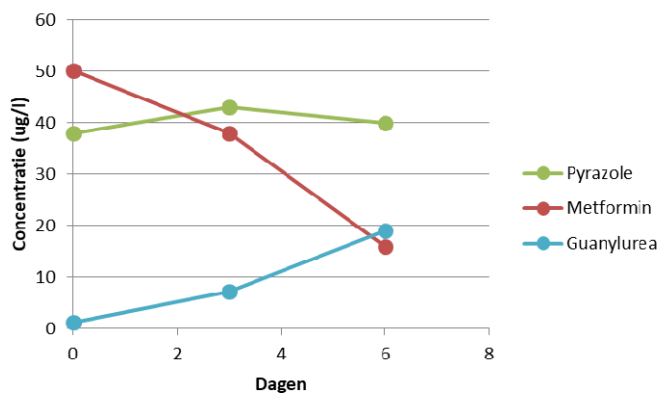


Figuur 14. Percentage verwijdering van pyrazool, metformine en guanylureum in de kolommen op dag 0 (1 uur na start, 3 – 4 bedvolumes), dag 35 (2900 bedvolumes), dag 56 (4600 bedvolumes) en dag 114 (8350 bedvolumes). De open rondjes zijn een '>'-waarde. Zie Bijlage VII voor de exacte datums van monsternamen en verversen van de tank.

Extra metingen aan de metformine en guanylureumconcentratie in de voedingstank lieten zien dat metformine in één week grotendeels werd afgebroken naar guanylureum (Figuur 15). In de eerste dagen na het verversen van de voedingstank was voornamelijk metformine aanwezig en werd de kolom gevoed met metformine. Na een paar dagen was de concentratie metformine lager of geheel afwezig, al leek de metformineconcentratie in de tank per week te verschillen (Figuur 13). Na 3 dagen was ook guanylureum aanwezig in het water van de voedingstank. De kolom werd daarom gevoed met metformine en guanylureum, al varieerden de concentraties sterk en waren deze stoffen waarschijnlijk soms gedurende enkele dagen afwezig in het water van de voedingstank. Het lijkt aannemelijk dat metformine- en guanylureum-afbrekende micro-organismen niet meteen verdwijnen als er enkele dagen geen metformine of guanylureum in het influent zit. Dit komt overeen met de resultaten van de batch-experimenten waarbij metformine na de herdosering na enkele weken afwezigheid nog steeds wordt afgebroken.

De variërende metformine- en guanylureumconcentraties in het influent van de kolom werden veroorzaakt doordat op dag 0 het influent en effluent van de kolom 1 uur na doseren van metformine aan de voedingstank zijn bemonsterd (3 – 4 bedvolumes). Op dag 35, 56 en 114 (respectievelijk 2900, 4600 en 8350 bedvolumes) werd het influent en effluent echter 4 dagen na het verversen van de tank bemonsterd. De metformineconcentratie in de tank was toen al laag en soms was de metformineconcentratie lager dan de detectiegrens terwijl de guanylureumconcentratie hoog was (Figuur 13). Aangezien metformine normaal gesproken ook in lage concentraties in oppervlaktewater aanwezig is, is het onwaarschijnlijk dat micro-organismen die in het water voorkomen in staat zijn om metformine af te breken. Na inspectie van de tank blijkt dat er een dunne laag slib (ongeveer 0,05% van totaal volume van de voedingstank) op de bodem van de voedingstank aanwezig was die niet werd verwijderd tijdens het verversen. Mogelijk zorgden de micro-organismen in dit slib voor de biologische afbraak van metformine in guanylureum. Met dit slib zijn geen verdere experimenten gedaan, met uitzondering van bemonstering van het slib om de microbiële populatie van te bepalen (hoofdstuk 6).

Pyrazool werd niet afgebroken in de voedingstank, de concentratie hiervan bleef stabiel gedurende één week (Figuur 15).



Figuur 15. Concentratie pyrazool, metformine en guanylureum in de voedingstank van de kolomexperimenten.

## 5.2 Inoculatie-experiment met variërende pyrazoolconcentratie in influent

### 5.2.1 Testexperiment Heel en Loenderveen

Uit de kolomexperimenten bleek dat metformine voor een deel al in de voedingstank werd afgebroken tot guanylureum. Het gevolg was dat de kolom waarschijnlijk metformine en guanylureum afbrak, maar dat dit niet met zekerheid kan worden gezegd omdat de metingen om de afbraak te bepalen voornamelijk zijn uitgevoerd als er nagenoeg alleen nog guanylureum in de voedingstank aanwezig was. Er zijn op die manier dus twee bacterieculturen gekweekt, één die pyrazool af kon breken en één die guanylureum (en mogelijk metformine) af kon breken. Voor het inoculatie-experiment kon slechts één stof geselecteerd worden om verder uit te werken.

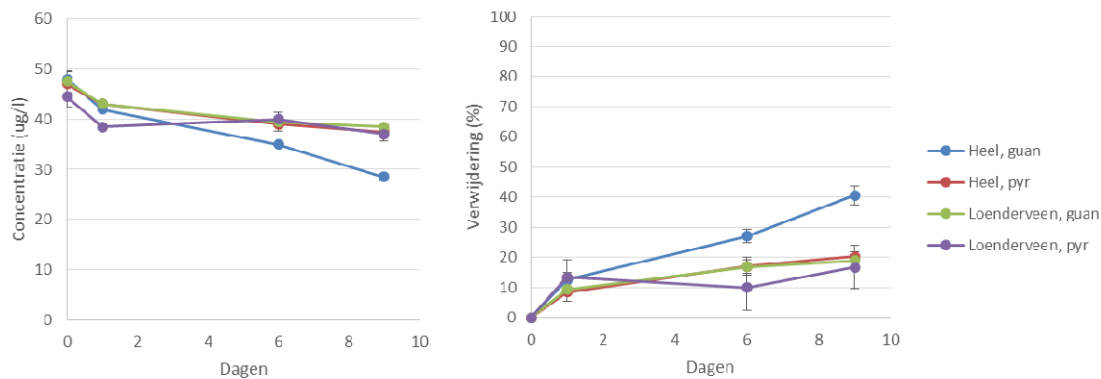
Om te kunnen onderzoeken of een filtermateriaal geënt kan worden om zo toch pyrazool/guanylureumverwijdering te bewerkstelligen, is allereerst filtermateriaal nodig dat niet in staat is deze stof(fen) af te breken. Indien er ook maar al een klein percentage pyrazool en/of guanylureum verwijderd wordt (dit wordt uiteraard begrensd door de meetnauwkeurigheid), wordt er niet meer geïnoculeerd maar wordt de microbiële populatie die hiertoe in staat is slechts vergroot door het inoculatiemateriaal.

Voor de start van het inoculatie-experiment is daarom een test uitgevoerd om filtermateriaal te selecteren dat bij de start van het experiment nog geen pyrazool en/of guanylureum af kan breken.

UV<sub>254</sub>- en ATP-analyses zijn uitgevoerd op het water om te controleren dat er in de flessen van het inoculatie-experiment een actieve microbiële gemeenschap aanwezig was tijdens de test (Figuur 39 en Figuur 40 in Bijlage VI). De ATP-concentraties waren hoger in het filtermateriaal van Loenderveen dan in het filtermateriaal van Heel en varieerden licht gedurende het experiment (Bijlage VI). UV<sub>254</sub> was stabiel voor Heel en nam voor Loenderveen toe. Dit laatste zou kunnen komen doordat er relatief veel organisch materiaal aan het filtermateriaal van Loenderveen geadsorbeerd zit en dit vrijkomt (desorptie) in de waterfase. In beide filtermaterialen was een actieve biomassa aanwezig en biologische afbraak zou mogelijk moeten zijn.

In filtermateriaal van beide locaties daalde de pyrazool- en guanylureumconcentratie gedurende de eerste dag (Figuur 16). In de daarop volgende dagen daalde alleen de guanylureumconcentratie in de Heelconditie, maar bleef de guanylureumconcentratie in de Loenderveenconditie en de pyrazoolconcentratie in de Heel- en Loenderveenconditie min of meer gelijk. Dit laat zien dat de afname gedurende de eerste dag waarschijnlijk sorptie was en dat daarna alleen in het filtermateriaal van Heel afbraak van guanylureum plaatsvond. In de andere

condities (pyrazool in Heel en Loenderveen en guanylureum in Loenderveen) vond er niet tot nauwelijks nog afbraak plaats.



Figuur 16. Concentratie en verwijdering van pyrazool en guanylureum in testexperimenten met filtermateriaal van Heel en Loenderveen. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD.

Op basis van dit experiment is gekozen om het inoculatie-experiment uit te voeren met pyrazool en filtermateriaal van Loenderveen. Door het incident in 2015, waarbij pyrazool werd geloosd op de Maas, en omdat pyrazool nog regelmatig wordt aangetroffen in het oppervlaktewater, is er blijvende interesse in deze stof. Omdat er geen verschil was in afbraak van pyrazool tussen Heel en Loenderveen is vanwege praktische redenen voor Loenderveen gekozen. Gedurende het inoculatie-experiment moest namelijk elke week vers influentwater voor de kolommen worden gehaald, en Loenderveen is dichterbij KWR dan Heel.

### 5.2.2 Resultaten inoculatie experiment

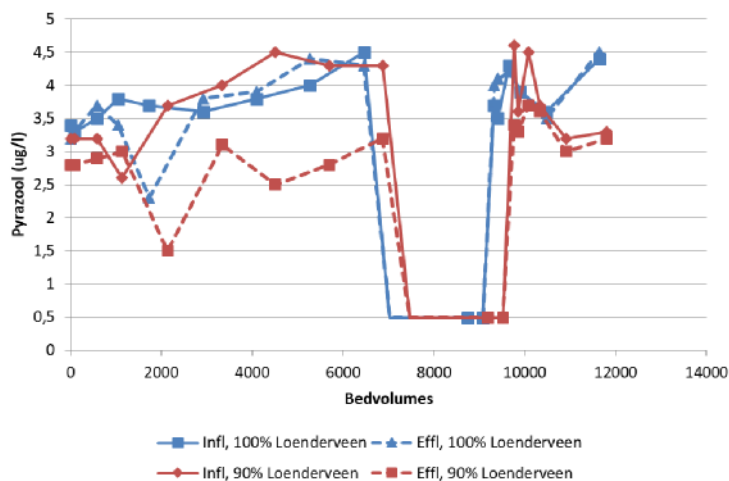
De temperatuur (19 – 21°C), pH (6,2 – 7,8) en EGV-waarden (450 – 550 µS/cm) waren stabiel gedurende het experiment. De temperatuur en pH waren vergelijkbaar met het eerdere kolomexperiment, maar de EGV-waarden waren wat lager. De redoxpotential (25 – 276 mV) en het zuurstofgehalte (influent: 6,2 – 9,3; effluent: 5,2 – 6,8) varieerden meer, maar deze variatie was relatief beperkt (Figuur 41 in Bijlage VI). De variatie in zuurstofgehalte en zuurstofverbruik van de kolom was duidelijk anders dan in de eerdere kolomexperimenten, waarin geen duidelijk zuurstofverbruik werd gemeten. De nitraatconcentratie nam in de eerste 14 – 21 dagen (1100 – 1500 bedvolumes) toe tot 1,1 – 1,2 NO<sub>3</sub>-N mg/l in het influent en 1,3 – 1,4 NO<sub>3</sub>-N mg/l in het effluent. Daarna daalde de concentratie in influent en effluent en bleef deze stabiel tussen 0,7 – 1,0 NO<sub>3</sub>-N mg/l in beide kolommen (Figuur 42 in Bijlage VII). De UV<sub>254</sub>-absorptie was stabiel gedurende het hele experiment waarbij de waarde in het influent (15 – 17 E/m) iets hoger was dan in het effluent (12 – 15 E/m; Figuur 43 in Bijlage VI).

De ATP-concentraties tussen de kolommen verschilden weinig (Figuur 44 in Bijlage VI). De ATP-gehalten in het influent en effluent daalden de eerste twee weken (0 – 1100 bedvolumes) sterk waarna het ATP-gehalte stabiliseerde en soms weer licht toenam. Hierbij was geen duidelijk verschil zichtbaar tussen de geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde kolom, al was er ook geen verschil verwacht. De ATP-gehalten waren hoger in het influent dan het effluent, wat impliceert dat een deel van de micro-organismen in het influent water aan de kolom hecht en niet uitspoelt. In beide kolommen was het ATP-gehalte in het zand hoog. Het vrij ATP-gehalte nam sterk toe over de tijd, wat waarschijnlijk veroorzaakt werd doordat micro-organismen ATP afgaven of doordat er micro-organismen afstierven en het ATP vrijkwam. Het gehalte vrij ATP was een kleine fractie van het totaal en cellulair ATP-gehalte. Deze laatste twee namen licht toe in de tijd, wat laat zien dat de microbiële populatie groeit. De hogere ATP-concentraties in het terugspoelwater, vergeleken met het influent- en effluentwater, werden veroorzaakt doordat tijdens het terugspoelen een gedeelte van de biomassa van het filtermateriaal losliet en wegspoelde.

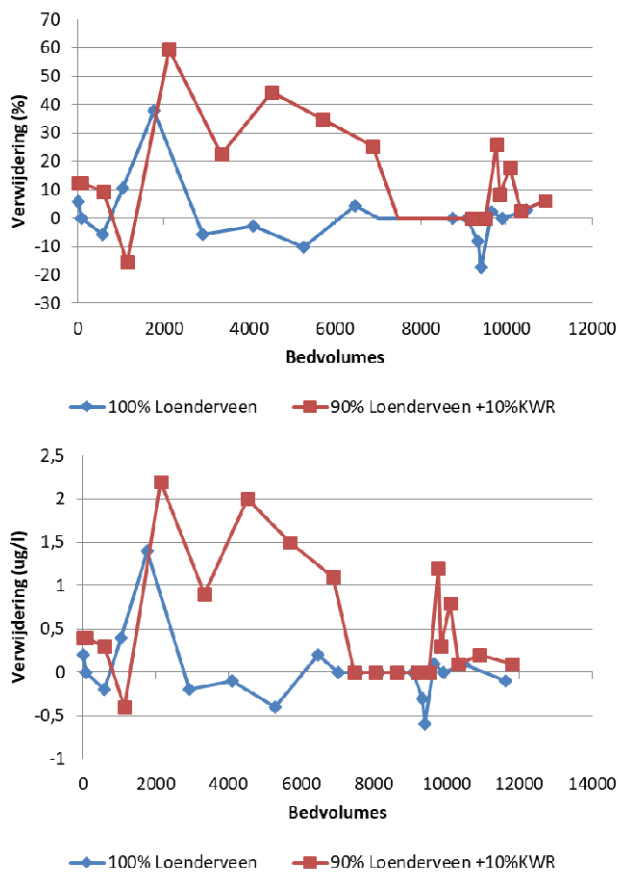


In de eerste 14 dagen (0 – 1100 bedvolumes) van het inoculatie-experiment werd pyrazool niet tot nauwelijks verwijderd in beide kolommen (Figuur 17, Figuur 18). De verwijdering in beide kolommen was vergelijkbaar en varieerde (maximaal 13%). Op dag 28 (2000 bedvolumes) was de verwijdering sterk verhoogd in beide kolommen. In de daarop volgende weken werd in de geïnoculeerde kolom (90% Loenderveen) nog steeds pyrazool verwijderd (22 – 44%; 0,9 – 2 µg/l pyrazool verwijdering) terwijl in de niet-geïnoculeerde kolom (100% Loenderveen) geen pyrazool meer werd verwijderd (maximaal 4% of 0,2 µg/l pyrazool verwijdering). Het inoculeren lijkt dus te werken voor de verwijdering van pyrazool in Loenderveen materiaal. Na 84 dagen (6650 bedvolumes) is de verwijdering van pyrazool ongeveer 35%.

Als na de 28 dagen durende periode zonder pyrazooldosering (dag 84 - 112; 6650 – 8950 bedvolumes) weer pyrazool wordt gedoseerd lijkt de verwijdering bij ca. 2000BV's op de 90% kolom weer op gang te zijn gekomen om vervolgens binnen de 4 weken dat na herdosering is gemeten af te nemen. Bestudering van de ruwe resultaten van de pyrazoolanalyse wijst niet op afwijkingen in de onderliggende gegevens. De NGS-analyse ondersteunt deze pyrazoolverwijdering in de eerste dagen na de start van de herdosering. Dit wordt in hoofdstuk 6 verder besproken. Dit betekent dat het afbraakproces erg gevoelig lijkt voor variaties in de influent OMP concentratie, in ieder geval voor pyrazool. Wat hiervan de oorzaak is, kan met de huidige beschikbare informatie niet gezegd worden. Omdat het onderzoek zich richtte op het weer snel op gang komen van de verwijdering is het experiment 4 weken na herdosering gestaakt. Het is niet uit te sluiten dat de verwijdering daarna alsnog op gang komt.



*Figuur 17. Pyrazoolconcentratie in het influent en effluent van de kolom met 100% Loenderveen filtermateriaal en in de kolom met 90% Loenderveen filtermateriaal en 10% filtermateriaal van de kolom die pyrazool kan verwijderen (zie hoofdstuk 5.1.2). De 90% Loenderveenkolom loopt iets sneller dan de 100% Loenderveenkolom en heeft na hetzelfde aantal weken looptijd een hoger aantal bedvolumes. Hierdoor overlappen de grafieken niet helemaal.*



Figuur 18. Verwijdering van pyrazool (boven:  $\mu\text{g/l}$ ; onder: percentage) in de kolom met 100% Loenderveen filtermateriaal en in de kolom met 90% Loenderveen filtermateriaal en 10% filtermateriaal van de kolom die pyrazool kan verwijderen (zie hoofdstuk 5.1.2). De 90% Loenderveenkolom loopt iets sneller dan de 100% Loenderveenkolom en heeft na hetzelfde aantal weken looptijd een hoger aantal bedvolumes. Hierdoor overlappen de grafieken niet helemaal. In Bijlage VII zijn bovenstaande grafieken gegeven ten op zichte van de tijd (dagen).

De resultaten laten zien dat de geïnoculeerde kolom zich gedurende het experiment aanpaste aan de aanwezigheid van pyrazool en na 28 dagen de gedoseerde pyrazool gedeeltelijk kon verwijderen terwijl de niet-geïnoculeerde kolom na 84 dagen nog steeds niet in staat was om pyrazool af te breken en te verwijderen. Na de eerste 28 dagen werd er echter niet steeds meer pyrazool afgebroken in de geïnoculeerde kolom. Deze resultaten wijzen erop dat de geïnoculeerde microbiële populatie zich in de nieuwe kolom en onder andere omstandigheden kon vestigen en zich daar in beperkte mate kon vermenvuldigen waardoor de pyrazoolverwijdering in de eerste 28 dagen kon toenemen. Een verdere toename in het aantal pyrazool-afbrekende micro-organismen, en dus hogere pyrazoolafbraak, leek door een onbekende factor te worden geremd. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat de pyrazool-afbrekende micro-organismen het Loenderveen-filtermateriaal niet kunnen koloniseren, maar alleen aanwezig zijn op het originele inoculatiemateriaal en het aantal niet verder kan toenemen. Daarnaast zouden mangaanoxides ook een rol kunnen spelen, maar beide hypothesen dienen verder onderzocht te worden. Tijdens de afwezigheid van pyrazool in het influentwater gedurende 28 dagen was de pyrazool-afbrekende bacteriepopulatie geïnactiveerd, afgestorven of hebben de competitie met andere micro-organismen op het filtermateriaal verloren waardoor na herdosering geen pyrazool meer werd verwijderd.

### 5.3 Verwijderingssnelheid pyrazool, metformine en guanylureum in laboratoriumexperimenten

Voor de batchexperimenten is de verwijderingssnelheid van pyrazool, metformine en/of guanylureum berekend. Met de verwijderingssnelheid kunnen de verschillende batchexperimenten beter met elkaar vergeleken worden. De verwijdering wordt gevormd door de volgende drie componenten:

- Biologische verwijdering (biodegradatie)
- Chemische verwijdering (hydrolyse, radicaalreacties, oxidatie/reductie)
- Fysische verwijdering (sorptie van de stof aan het filtermateriaal)

Uit de batchexperimenten met steriele flessen blijkt dat de bijdrage van de laatste twee componenten beperkt is (maximaal 14%) en dat de verwijderingssnelheid waarschijnlijk grotendeels bepaald wordt door de (biologische) afbraaksnelheid.

De biologische afbraaksnelheid in de kolommen kan niet worden berekend aangezien er geen doorbraakcurves bepaald zijn in de kolommen. Dit is niet gedaan omdat het bepalen van de biodegradatiesnelheid van deze stoffen in de kolommen buiten de scope van deze studie viel.

In de batchexperimenten is de verwijderingssnelheid berekend per gram filtermateriaal en gecorrigeerd voor de duur van het experiment (de contacttijd tussen filtermateriaal en OMV, Tabel 10). De afbraaksnelheden in de batchexperimenten zijn hoger als een hogere concentratie OMV wordt gedoseerd. Dit geldt voor pyrazool en metformine, maar niet voor guanylureum wat juist gevormd wordt. Er wordt wel meer guanylureum gevormd bij een hogere metformine-dosering. Bij zowel de hoge als lage concentratie is de verwijderingssnelheid van metformine hoger dan van pyrazool. Hogere afbraaksnelheden en een kortere adaptatietijd bij hogere doseerconcentraties werd ook geobserveerd door Baumgarten et al. voor sulfamethoxazole (37).

*Tabel 10. Verwijdering van pyrazool, metformine en guanylureum (ng/l) per gram filtermateriaal per dag t.o.v. het vorige meetpunt. Geteste condities: steriel (dag 0, 1 en 7), blanco (dag 0, week, 5, 8), dosering van 0,5 (metformine, guanylureum), 5 (pyrazool) en/of 50 µg/l (metformine en pyrazool) en herdosering (\* in tabel) van 0,5 en 50 µg/l metformine in week 14. Resultaten van bijbehorende experimenten zijn gegeven in hoofdstuk 5.1.1. gg: geen gegevens omdat de concentratie metformine en guanylureum al na 5 weken onder de detectiegrens ligt.*

	0,5 µg/l of 5 µg/l			50 µg/l			Steriel			Blanco		
	Metf	Guan	Pyr	Metf	Guan	Pyr	Metf	Guan	Pyr	Metf	Guan	Pyr
Dag 0			0,00			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dag 1							16,67	-0,03	7,14			
Dag 7							1,09	-0,11	-1,55			
Dag 35	gg	gg	0,14	gg	gg	0,88				0,01	0,03	0,00
Dag 56	gg	gg	0,03	gg	gg	0,43				0,00	-0,00	0,00
Dag 114			0,28			3,38						0,00
Dag 0*	0,00	0,00		0,00	0,00							
Dag 3*	1,76*	>0,01*		20,00*	-8,37*							
Dag 6*	0,37*	>0,00*		49,02*	-10,20*							

## 6 Microbiële populatie tijdens biologische afbraak

### 6.1 Batchexperimenten

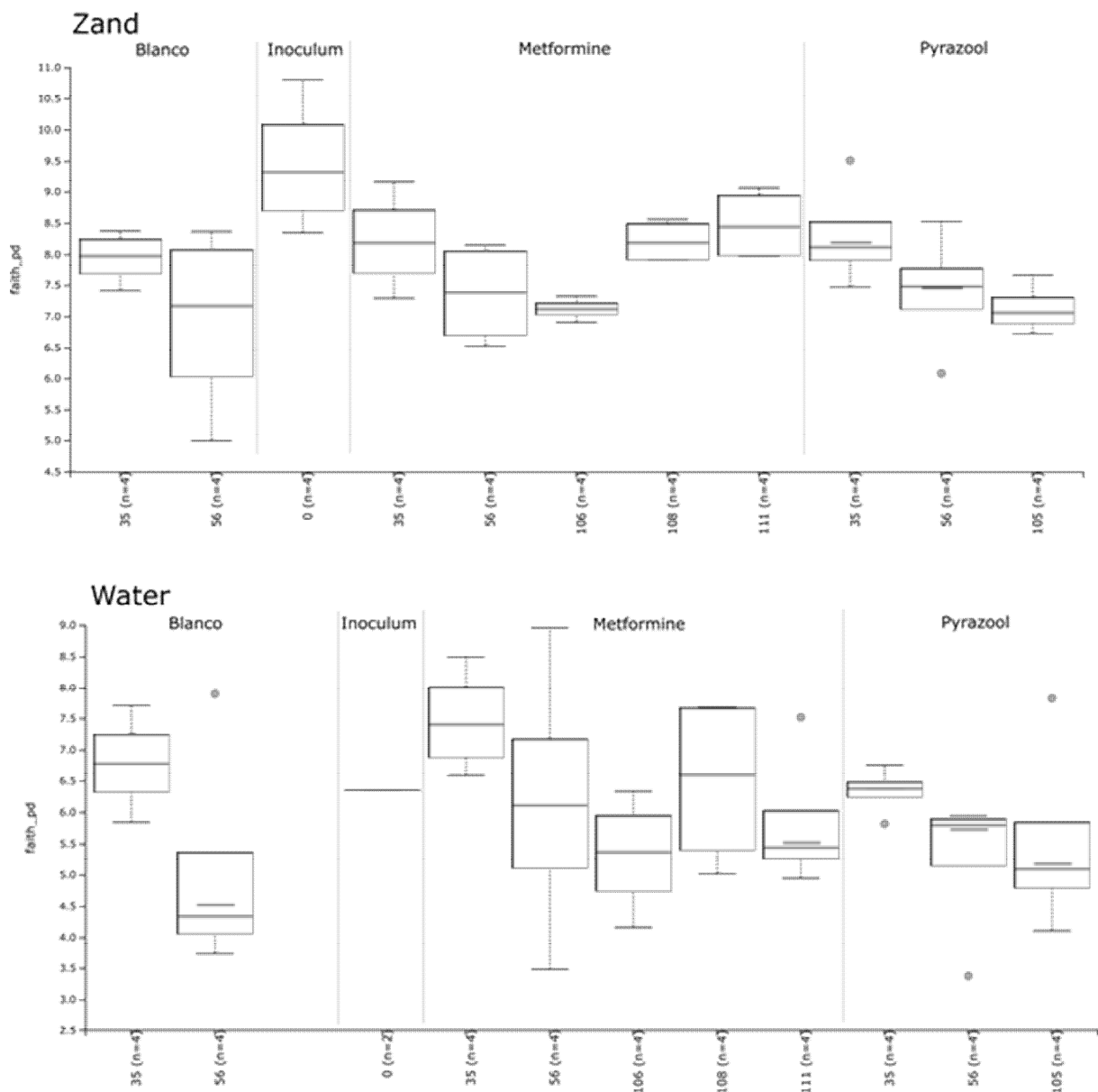
#### 6.1.1 Microbiële diversiteit

Van de batchexperimenten zijn de microbiële gemeenschappen geanalyseerd van alle genomen monsters in de tijd. Een belangrijke vraag is of de microbiële gemeenschap in zijn algemeenheid verschillen laat zien in de batchexperimenten tussen de verschillende condities, in dit geval pyrazool en metformine toevoeging. Een belangrijke microbiële ecologische parameter is de microbiële diversiteit, uitgedrukt in Faith's Phylogenetic Diversity (PD). Faith's PD is de fylogenetische analoog van 'taxon richness'. Hoe hoger de waarde voor Faith's PD, hoe hoger de diversiteit. Diversiteit bestaat uit het aantal verschillende taxa (richness) en de hoe de distributie van de aantallen van deze taxa is (evenness).

De microbiële diversiteit in het water en zand van de batchexperimenten verandert in de tijd (Figuur 19). De metformine en pyrazool condities verliezen significant microbiële diversiteit tussen het inoculum (start experiment) en >56 dagen wanneer alleen zandmonsters in beschouwing worden genomen. Het blanco batchexperiment laat geen significant verschil zien tussen dag 35 en 56. In de batchexperimenten met metformine neemt de diversiteit tussen 35 en 106 dagen wel significant af, voor zowel water- als zandmonsters. Voor pyrazool is er alleen een significante afname in diversiteit van de zandmonsters tussen 35 en 105 dagen incubatie.

In de metformine conditie is de diversiteit na lange tijd van geen dosering (tijdpunt 106 dagen) significant lager dan na 35 dagen voor de water- en zandmonsters. Verder is er een significant hogere diversiteit in de metformine conditie na doseren (108 dagen alleen zand en 111 dagen voor beide) t.o.v. voor doseren (106 dagen). Deze dosering zorgt dus voor een snelle toename in diversiteit.

Tussen de pyrazool en metformine condities is er alleen een significant hogere diversiteit in de zandmonsters van 108 dagen conditie van metformine t.o.v. 105 dagen van pyrazool. Dit verschil komt dus door de herdosering bij de metformine condities.



Figuur 19. Verschillen in diversiteit (Faith's PD index) tussen condities (metformine, pyrazool en blanco) van batchexperimenten in de tijd (dagen op x-as) t.o.v. het inoculum waarbij alleen zand (boven) of alleen water (beneden) monsters zijn geanalyseerd. De bovenste en onderste 'whiskers' van de boxplot tonen de 9de en 91ste percentielen van de distributie en de bovenste en onderste grens van de box geven de 25ste en 75ste percentielen weer. De horizontale lijn door het midden van de box is de mediaan van de distributie (50ste percentiel). Outliers zijn weergegeven als stippen.

Deze resultaten geven aan dat er verschillen optreden in de diversiteit van de microbiële populaties gedurende langdurige batchexperimenten en dat deze verschillen niet veroorzaakt zijn door behandeling (blanco, metformine of pyrazool dosering), en voornamelijk optreden na 56 dagen incubatie. De blanco flessen zijn niet lang genoeg geïncubeerd om deze verandering te laten plaatsvinden. De grootste verschillen in diversiteit treden op in de microbiële populaties gebonden aan het zand.

### 6.1.2 Microbiële populaties

Naast microbiële diversiteit is de samenstelling van de microbiële gemeenschap ook van belang; twee microbiële gemeenschappen kunnen dezelfde diversiteit hebben, maar uit een heel andere gemeenschap bestaan. Hiervoor zijn de Bray Curtis dissimilariteiten berekend tussen alle watermonsters en alle zandmonsters. De Bray Curtis

dissimilariteit is een index voor hoe verschillend de microbiële populaties van elkaar zijn. Op deze Bray Curtis dissimilariteiten zijn gepaarde PERMANOVA tests uitgevoerd om de significante verschillen te bepalen.

De resultaten geven een soortgelijk beeld als de microbiële diversiteit:

- De blanco condities van 35 en 56 dagen zijn niet significant verschillend in microbiële compositie van de andere condities (metformine en pyrazool) op deze tijdstippen.
- De microbiële populaties in de zandmonsters van het inoculum verschillen in samenstelling van alle andere condities (metformine en pyrazool), de populaties in watermonsters van het inoculum verschillen niet van de populaties in monsters die andere behandelingen hebben ondergaan.
- De microbiële populaties in zand- en watermonsters van de metformine en pyrazool condities zijn op geen enkel vergelijkbaar tijdstip significant verschillend van elkaar.
- De microbiële populaties in de conditie met pyrazool verschillen significant in de tijd tussen 35 en >56 dagen in zandmonsters en tussen 35 en >105 dagen in watermonsters (Bray Curtis distance, PERMANOVA, pairwise,  $p < 0.05$ ).
- De microbiële populaties in de conditie met metformine verschillen pas significant tussen 56 dagen en 106 dagen in de zandmonsters. Watermonsters verschillen pas na dosering (108 dagen) van het monster genomen na 35 dagen. Tussen 106 en 108 dagen verschilt metformine ook significant in zandmonsters (Bray Curtis distance, PERMANOVA, pairwise,  $p < 0.05$ ).

Verklarende factoren voor de verschillen in microbiële populaties zijn voor de watermonsters verschillen in de conditie (blanco, metformine of pyrazool) (14% van de statistische gegevens), en verschillen in de incubatietijd (6,4% van de statistische gegevens). Bij zandmonsters is dit 10% conditie en 7,9% incubatietijd (Adonis test,  $p < 0.05$ ). ATP en UV<sub>254</sub> waren niet significant verklarend voor de verschillen in de microbiële populaties. Incubatietijd heeft dus een groter effect op de zandmonsters dan op de watermonsters. Het effect van de conditie verklaart maar een klein deel van de verschillen tussen de microbiële populaties.

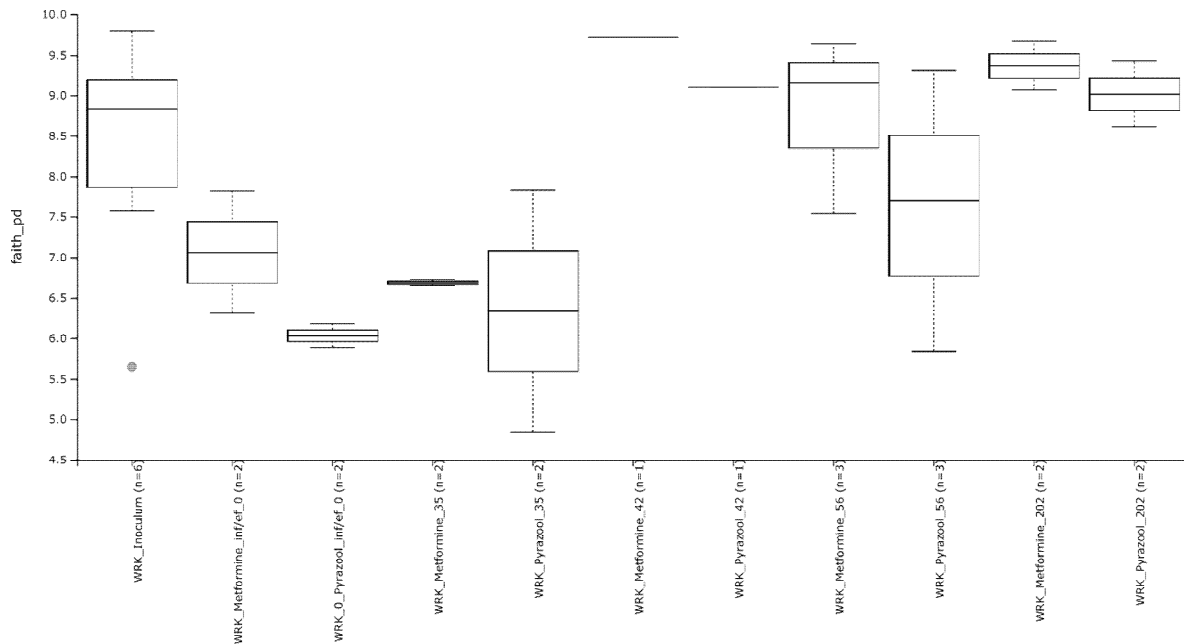
Omdat de zandmonsters de grootste verschillen in diversiteit laten zien, is voor het bepalen van de microbiële composities alleen naar de zandmonsters gekeken. Voor het bepalen van de microbiële composities wordt de Bray Curtis dissimilariteit gebruikt. In Figuur 20 is een Principal coördinatie Analysis (PCoA) plot te zien van de Bray Curtis dissimilariteit van alle zandmonsters die verzameld zijn van de batchexperimenten. Met PCoA kunnen de verschillen in de samenstelling van een microbiële gemeenschap worden gevisualiseerd. Elk punt in een PCoA stelt een microbiële gemeenschap van één monster voor. Hoe dichter twee punten bij elkaar liggen, hoe meer deze microbiële gemeenschappen op elkaar lijken. In Figuur 20 is te zien dat de microbiële populaties veranderen gedurende de tijd, maar dat metformine of pyrazool dosering niet zorgt voor een grote verschillen in microbiële populaties.



## 6.2.1 WRK kolommen met metformine of pyrazool

### 6.2.1.1 Microbiële diversiteit

Voor de kolomexperimenten is ook van de microbiële populatie de diversiteit weergegeven (Figuur 21). De microbiële diversiteit tussen alle monsters genomen gedurende de tijd van de kolommen met dosering van metformine of pyrazool is niet significant verschillend, en ook niet tussen alleen de zandmonsters (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ). Ook gedurende de tijd is er geen significant verschil, maar dit is lastig te toetsen gezien het lage aantal monsters per tijdspunt (zie Figuur 21).

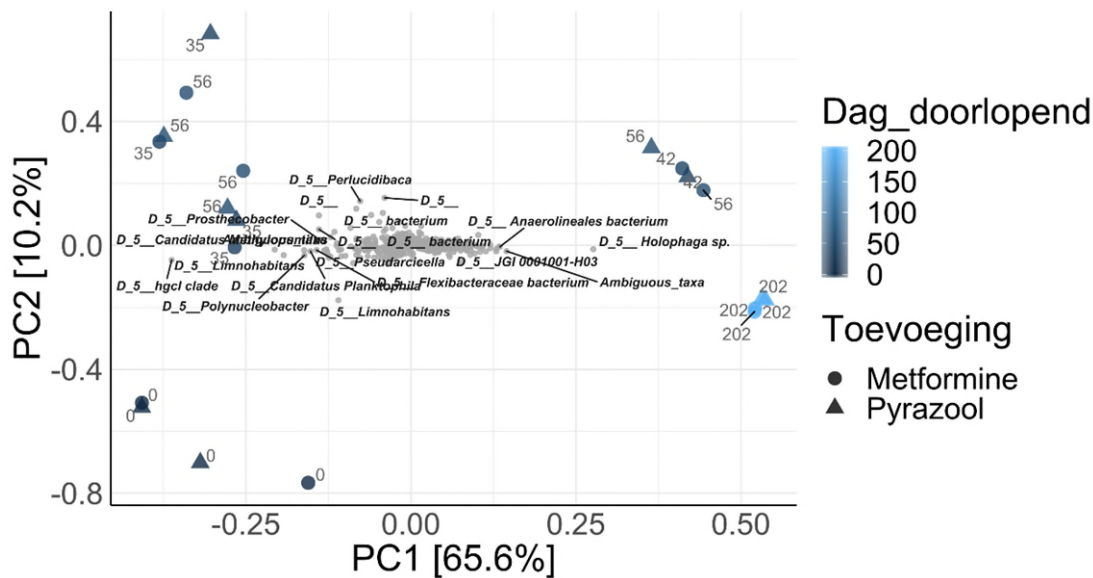


Figuur 21. Verschillen in diversiteit (Faith's PD index) tussen de condities in kolomexperimenten in de tijd (metformine, pyrazool) t.o.v. het inoculum. Alle monsters (influent, effluent en zand) zijn geanalyseerd. Op de x-as staan van links naar rechts het WRK inoculum, metformine en pyrazool 0 dagen (alleen influent en effluent), 35, 42, 56 en 202 dagen incubatie. De bovenste en onderste 'whiskers' van de boxplot tonen de 9de en 91ste percentielen van de distributie en de bovenste en onderste grens van de box geven de 25ste en 75ste percentielen weer. De horizontale lijn door het midden van de box is de mediaan van de distributie (50ste percentiel). Outliers zijn weergegeven als stippen.

### 6.2.1.2 Microbiële populaties

Wat betreft de samenstelling van de microbiële gemeenschappen zijn ook hier geen significante verschillen tussen de kolommen met metformine en pyrazool wanneer alle monsters samen geanalyseerd worden, of alleen de zandmonsters (pairwise PERMANOVA,  $p > 0.05$ ). Of dit gedurende de incubatietijd verandert is niet met significantie te testen, gezien het lage aantal monsters per tijdspunt. Het is in Figuur 22 wel te zien dat gedurende de tijd de microbiële gemeenschappen van het zand veranderen, maar er lijkt geen sterk verschil te zijn tussen de conditie met pyrazool en de conditie met metformine.

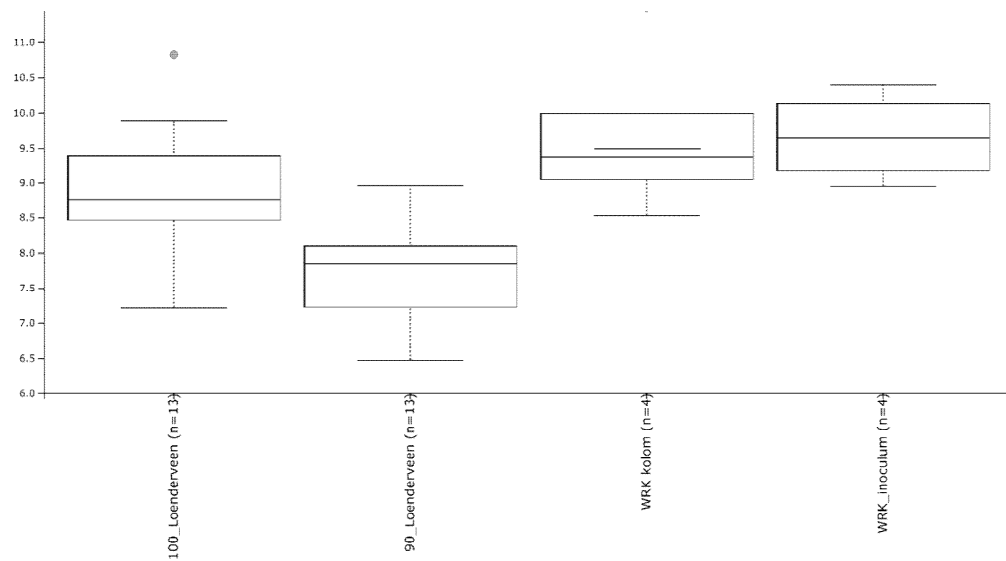




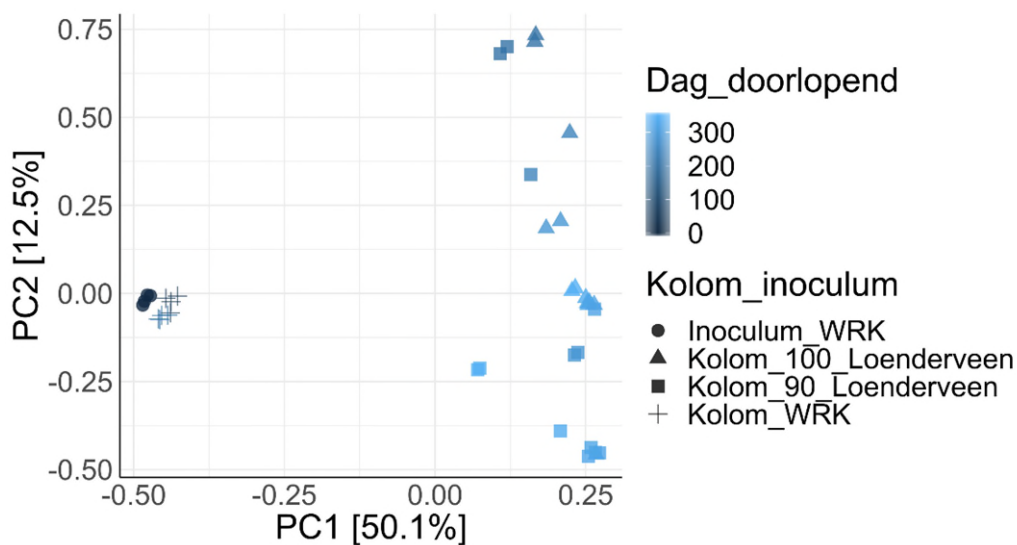
Figuur 22. PCA van Bray-Curtis dissimilariteit van alle zandmonsters van kolommen van WRK met metformine en pyrazool additie. De kleurcodering geeft het aantal dagen incubatie weer en de vorm van de symbolen de toevoeging (zie legenda).

### 6.3 Inoculatie experimenten

De 90% Loenderveen kolom heeft gedurende de incubatietijd een significant lagere diversiteit dan (i) de 100% Loenderveen kolom, (ii) de WRK kolom waaraan pyrazool of metformine wordt gedoseerd en (iii) het WRK inoculum (Figuur 23). Dit is tegen de verwachting, omdat de 90% Loenderveen kolom afkomstig is van Loenderveen materiaal dat een hogere diversiteit heeft, en geënt is met materiaal van de WRK-pyrazool kolom dat ook een hogere diversiteit heeft. Ook de microbiële compositie is significant verschillend tussen 100% Loenderveen, 90% Loenderveen, de WRK-pyrazool kolom en het WRK inoculum (Figuur 24). De WRK-pyrazool kolom en het inoculum zijn niet significant verschillend, wat de voorgaande resultaten bevestigt. Het enten van de 90% Loenderveen kolom met WRK-pyrazool filtermateriaal heeft er dus niet voor gezorgd dat de gehele microbiële populatie significant meer is gaan lijken op het zand van de WRK kolom, maar wel dat het significant verschilt van 100% Loenderveen.



Figuur 23. Verschillen in diversiteit (Faith's PD index) tussen geënte (90% Loenderveen) en niet geënte (100% Loenderveen) kolomexperimenten t.o.v. het WRK inoculum en de WRK-pyrazool kolomexperimenten waarbij alleen zandmonsters zijn geanalyseerd. Alle monsters die in de tijd genomen zijn, zijn samengevoegd. De bovenste en onderste 'whiskers' van de boxplot tonen de 9de en 91ste percentielen van de distributie en de bovenste en onderste grens van de box geven de 25ste en 75ste percentielen weer. De horizontale lijn door het midden van de box is de mediaan van de distributie (50ste percentiel). Outliers zijn weergegeven als stippen.



Figuur 24. Principal coördinatie Analyse (PCoA) plot gebaseerd op Bray Curtis distance van alle zandmonsters van de WRK-pyrazool en Loenderveen kolommen en WRK inoculum waarop microbiële analyse gedaan is met NGS. De assen verklaren een aandeel van de variatie in de data, in dit geval 50.1% voor de X-as en 12.5% voor de Y-as. Elk punt staat voor een microbiële gemeenschap van een monster. De verschillende kleuren geven de incubatietijd weer, zie legenda. Bray Curtis distances zijn getest voor significantie met paired PERMANOVA test. Kolom\_WRK = WRK-pyrazoolkolom.

## 6.4 Differentiële abundantie van verschillende micro-organismen

Pyrazool en metformine kunnen afgebroken worden tijdens metabolische of co-metabolische activiteit van micro-organismen. Afbraak tijdens metabolische activiteit houdt in dat de micro-organismen energie voor groei halen uit het afbraakproces, terwijl bij co-metabolische afbraak tijdens het normale metabolisme (bijvoorbeeld nitrificatie) de OMV's ook worden afgebroken en dat de micro-organismen hier dus mogelijk geen of weinig energie uit halen voor groei. Bij metabolisme verwacht je dat micro-organismen die de OMV's afbreken toenemen in concentratie in het water en/of filtermateriaal door groei.

Uit bovenstaande analyses blijkt dat de microbiële populatie niet veel verandert na langdurige incubatie met pyrazool en metformine, in zowel batch- als kolomexperimenten. Dit kan betekenen dat de micro-organismen geen groei vertoonden en dus vooral de OMV's afbreken via co-metabolisme. Het kan ook betekenen dat er geringe groei heeft opgetreden tijdens metabolische afbraak die niet op te merken is als gekeken wordt naar de gehele microbiële gemeenschap. De concentraties van OMV's zijn relatief zo laag dat deze het metabolisme en groei van micro-organismen moeilijk kunnen ondersteunen, wat betekent dat de groei beperkt is. Groei van deze micro-organismen blijft daardoor onopgemerkt met bovenstaande analyse.

Om specifiek te zoeken naar micro-organismen die mogelijk groei vertonen tijdens de incubaties door blootstelling aan de OMV's, moeten zogenaamde 'differentiële abundantie' analyses op de NGS data gedaan worden. Bij deze analyses wordt onderzocht of er statistisch meer van bepaalde soorten micro-organismen aanwezig zijn in de condities met metformine en pyrazool t.o.v. de blanco's (in het geval van de batchexperimenten) en het inoculum (in geval van de kolomexperimenten).

Met NGS data worden alle DNA sequenties gegroepeerd in zogenaamde amplicon sequence variants (ASVs). Van deze ASVs is bepaald bij welke genus van micro-organismen deze horen. In deze analyse wordt daarom gesproken van ASVs, waarvan we alleen weten tot welke genus de ASVs horen en dus niet tot welke specifieke soort micro-organismen.

Voor de statistische tests zijn gepaarde Wilcoxon rank tests uitgevoerd op de ASVs. Met de Wilcoxon rank test wordt geen rekening gehouden met het feit dat in NGS data wordt gewerkt met relatieve abundanties waardoor er een groter aantal vals positieven gedetecteerd kan worden. Als namelijk de relatieve abundantie van 1 genus omlaag gaat, gaat automatisch de relatieve abundantie van andere omhoog om weer tot 100% te komen. Deze verhoging lijkt dan een toename, maar in feite is dat niet zo.

De tests zijn uitgevoerd op de gepaarde vergelijkingen:

- Kolom incubaties (dag 0 tot en met dag 202)
  - WRK kolommen: Pyrazool vs metformine kolommen
  - WRK kolommen: Pyrazool vs inoculum
  - WRK kolommen: Pyrazool + metformine vs inoculum
  - WRK kolommen: Metformine vs inoculum
  - Loenderveen kolommen: Kolommen Loenderveen 90% vs 100%
- Batch incubaties
  - Blanco vs pyrazool (alle tijdstippen)
  - Blanco vs metformine (voor metformine alleen t/m 56 dagen)

Metformine vs pyrazool (voor metformine alleen t/m 56 dagen)

Voor de gepaarde test van metformine t.o.v. blanco batch conditie waren alleen monsters tot en met 56 dagen meegenomen omdat i) er geen data is van de blanco's na 56 dagen en ii) omdat metformine daarna al afwezig was. Ook zijn de monsters vóór dosering (er was 50 dagen niet gedoseerd) en 3 en 10 dagen na dosering (107 en 114

dagen) niet meegenomen, want er wordt geen groei verwacht in die korte tijd. Voor WRK pyrazool kolommen en batches zijn alle monsters meegenomen.

Deze tests gaven zeer veel resultaten van ASVs die significant meer of minder voorkomen in monsters die bepaalde condities hebben ondergaan. Van deze lijst zijn alleen de micro-organismen van belang die een redelijk aandeel van de populatie vormen, hiervoor zijn alleen micro-organismen meegenomen die gemiddeld in alle monsters meer dan 0,0001% voorkomen. Daarnaast zijn alleen micro-organismen van belang die in abundantie toenemen tijdens incubatie. Alleen de micro-organismen die toenemen in de tijd tijdens OMV afbraak zijn potentieel metabolisch betrokken bij de afbraak. Daarom is gekozen om alleen ASVs te analyseren die een Spearman correlatie van  $>0,4$  met incubatietijd hebben. Deze correlatie is berekend voor ASVs voor alle experimenten samen en voor de verschillende experimenten afzonderlijk. Zo is er een correlatie met tijd berekend voor de metformine batch condities waarbij alleen de monsters tot en met 56 dagen zijn meegenomen. Ook zijn de monsters vóór dosering (er was 50 dagen niet gedoseerd) en 3 en 10 dagen na dosering (107 en 114 dagen) niet meegenomen. Voor WRK pyrazool kolommen en batches zijn alle monsters meegenomen. Voor de Loenderveen kolommen is alleen de 90% Loenderveen kolom meegenomen.

Deze filtering zorgde voor een aanzienlijk kortere lijst met 100 ASVs. Van deze ASVs is bepaald in welke conditie deze significant meer voorkomen. Wanneer de ASVs bijvoorbeeld significant meer voorkomen in het inoculum t.o.v. de kolom, wordt deze ASV buiten beschouwing gelaten omdat in dit onderzoek alleen de genera van belang zijn die meer voorkomen in de condities (door groei) dan in het inoculum. Na deze laatste filterstap zijn er 35 ASVs overgebleven (Tabel 11).

Het is ook van belang is om te zien of micro-organismen toenemen in relatieve abundantie wanneer er een OMV dosering is, zoals verwacht voor de Loenderveen kolommen die gedoseerd werden met pyrazool en de batchexperimenten met metformine. Er is daarom van deze 35 ASVs handmatig bekeken of deze daadwerkelijk toenemen in de tijd in de verschillende experimenten. Deze informatie is ook gegeven in Tabel 11.

Uit deze analyse komt naar voren dat de meeste ASVs die significant meer voorkomen in de experimenten met OMV's (batch- en kolomexperimenten) behoren tot genera binnen de phyla van *Planctomyceten* en *Proteobacteriën* (Tabel 11). De meeste *Planctomyceten* die hieronder vallen behoren tot de familie van *Pirellulaceae*. Voor de *Proteobacteriën* behoren de meeste genera tot de orde *Rhizobiales*. Deze genera komen in veel gevallen ook significant meer voor in de geënte kolom van Loenderveen met WRK-pyrazool materiaal (90% Loenderveen) t.o.v. de 100% Loenderveen kolom. Opvallend is dat de meeste ASVs die significant meer voorkomen in de experimenten met metformine, ook significant meer voorkomen in de experimenten met pyrazool. Er zijn enkele ASVs die alleen significant meer voorkomen in de experimenten met metformine, maar deze vertonen in de meeste gevallen geen toename in de tijd (Tabel 11), met uitzondering van ASVs behorende bij het genus *Ottowia* en de klasse subgroup 17.

De relatieve abundantie van een aantal genera van bovengenoemde *Planctomyceten* en *Proteobacteriën* neemt toe in de kolommen en batchexperimenten met pyrazool en metformine gedurende de incubatietijd. Bij de kolommen gaat dit meestal gepaard met een toename in het effluent van deze genera in de kolommen. In Figuur 25 zijn boxplots van de totale relatieve abundanties gegeven en in Figuur 26 zijn deze getoond tijdens incubatietijd voor de kolomexperimenten met metformine en pyrazool. Van de *Planctomyceten* nemen de genera *Pirellula* en *Gemmata* toe tijdens incubatie in beide kolommen met metformine en pyrazool (Figuur 25). In de batchexperimenten is er geen duidelijke toe- of afname van *Pirellula* te zien (Figuur 26), maar gemiddeld kwam deze significant meer voor in de batchexperimenten met pyrazool dan de blanco's (Tabel 11). Het genus *Gemmata* kwam niet significant meer voor in de batchexperimenten met OMV's t.o.v. de blanco's. Voor de genera behorende bij de orde *Rhizobiales* (*Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Pseudorhodoplanes*) was een toename in de kolommen en de batchexperimenten met pyrazool en metformine te zien (Figuur 25 en Figuur 26). In de batchexperimenten met metformine was deze toename niet hoger dan in de blanco condities (Figuur 25 en Figuur 26) en was de totale

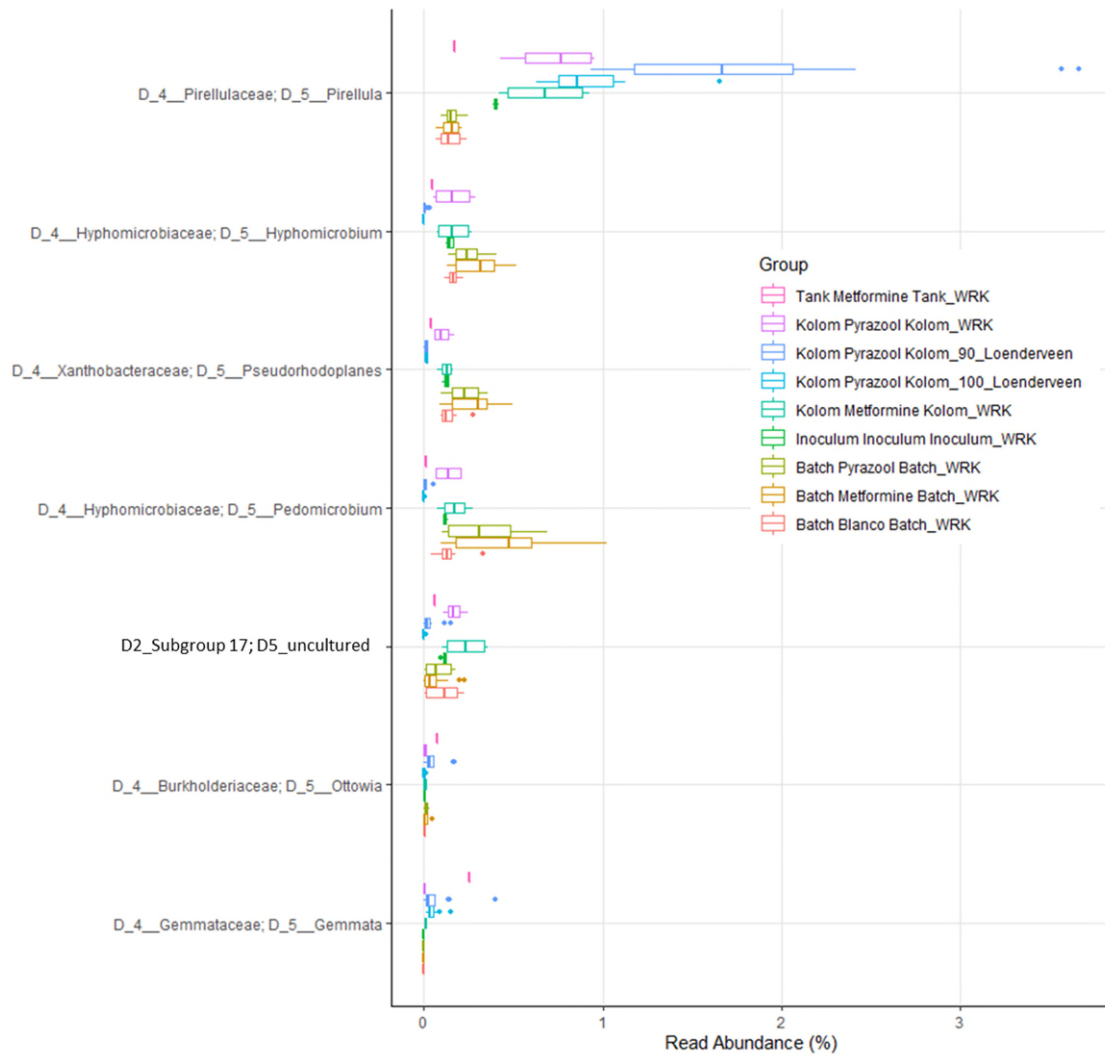
relatieve abundantie ook niet significant verschillend tussen metformine en blanco condities in de batchexperimenten (Tabel 11).

Van de ASVs die alleen significant meer voorkwamen in de metformine condities, nam het genus *Ottowia* in de kolomexperimenten met metformine en pyrazool af tijdens incubatie (Figuur 25) maar deze nam toe in de batchexperimenten met metformine (Figuur 26). Deze was dan ook significant meer aanwezig in de batchexperimenten met metformine t.o.v. de blanco's (Tabel 11). De klasse subgroup 17 nam juist toe in de kolomexperimenten met metformine en pyrazool (Figuur 25) maar nam af in de batchexperimenten (Figuur 26). Deze was ook significant meer aanwezig in de kolommen met metformine t.o.v. het inoculum (Tabel 10).

Een aantal van deze genera kwamen ook significant meer voor in de Loenderveen kolommen die geënt zijn (90%) dan die niet geënt zijn (100%) (Tabel 10). Dat is de verwachting aangezien het entmateriaal van de WRK-pyrazool kolom komt. De mogelijke relatie met afbraak van pyrazool wordt waarschijnlijker als deze genera ook in de geënte Loenderveen kolommen toenemen in abundantie in de tijd en een groeistop of afname in abundantie laten zien wanneer dosering met pyrazool stopt (tussen 84 en 116 dagen), gevolgd door weer een toename als dosering weer begint.

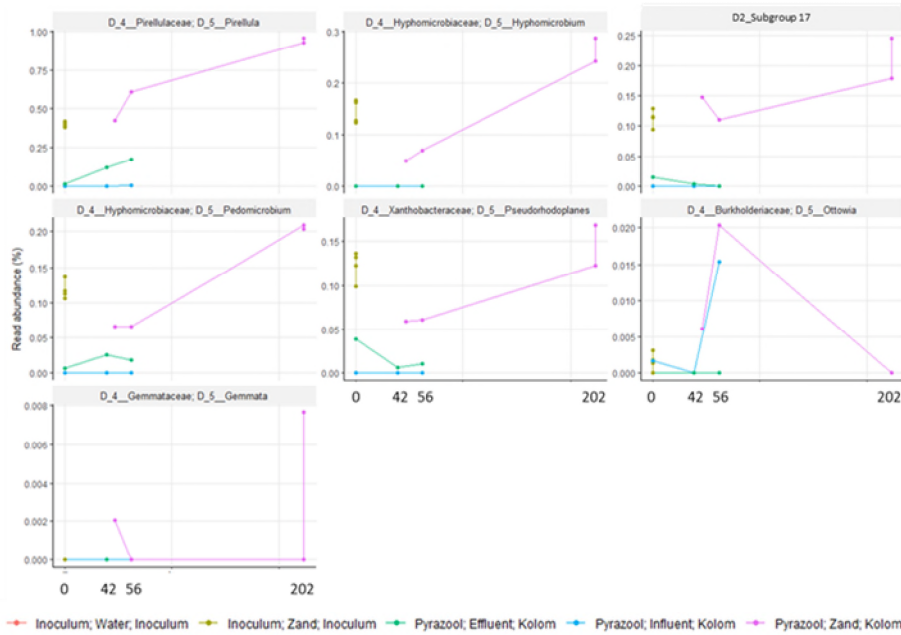
Voor alle genera die hierboven genoemd zijn is dit het geval, behalve voor *Gemmata* (Figuur 27). Het genus *Gemmata* lijkt in eerste instantie toe te nemen in relatieve abundantie, maar is op hetzelfde niveau als de 100% Loenderveen kolom voordat de dosering met pyrazool stopt en neemt daarna met soortgelijke trend af als in de 100% Loenderveen kolom. Dit geeft aan dat er dus niet meer groei was in de geënte kolom dan de niet-geënte kolom die geen pyrazool afbraak. Voor *Ottowia* geldt dat er een afname plaatsvindt tijdens dosering, maar weer een sterke toename wanneer dosering met pyrazool hervat (Figuur 27). Dit genus was ook alleen significant hoger in de WRK experimenten met metformine en niet tijdens pyrazool dosering (Tabel 10).



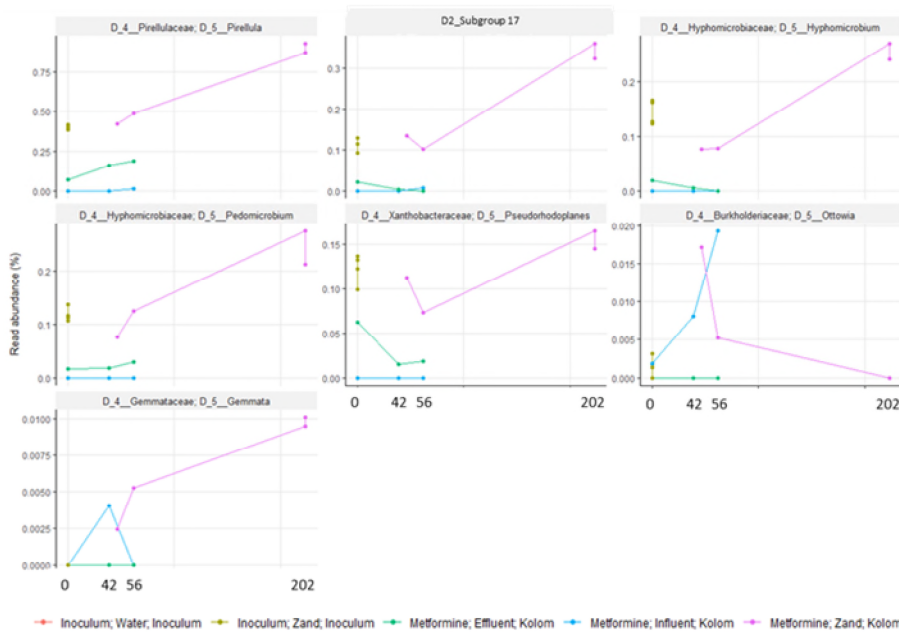


Figuur 25. Relatieve abundantie (read abundance, %) van de verschillende ASVs behorende bij de genera *Pirellula*, *Hyphomicrobium*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, klasse subgroup 17, *Ottowia* en *Gemmata*. De relatieve abundantie is gegroepeerd voor de verschillende genomen monsters van de experimenten in de tijd (zie legenda).

### Kolom WRK pyrazool



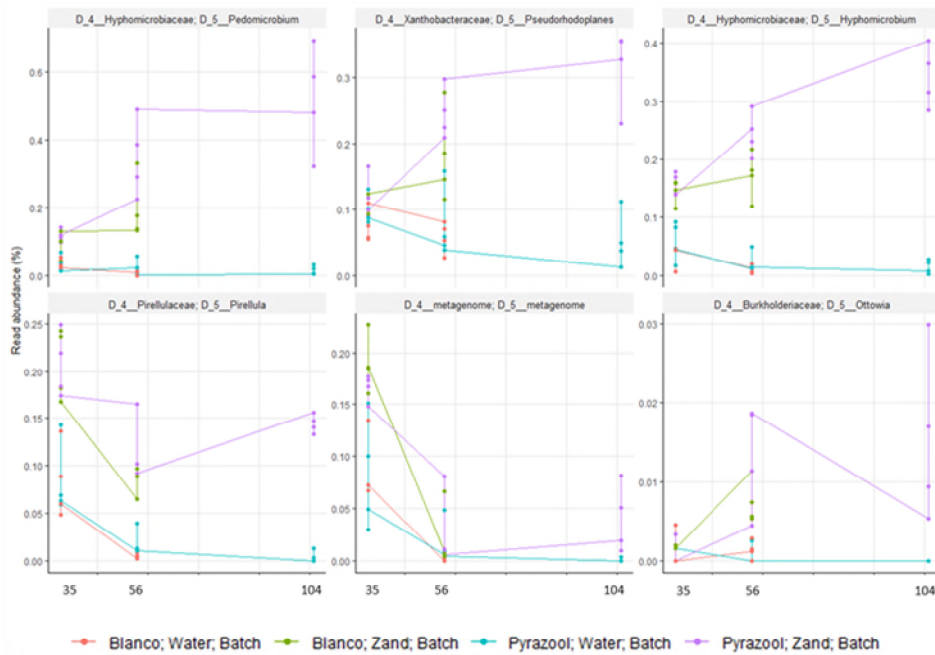
### Kolom WRK metformine



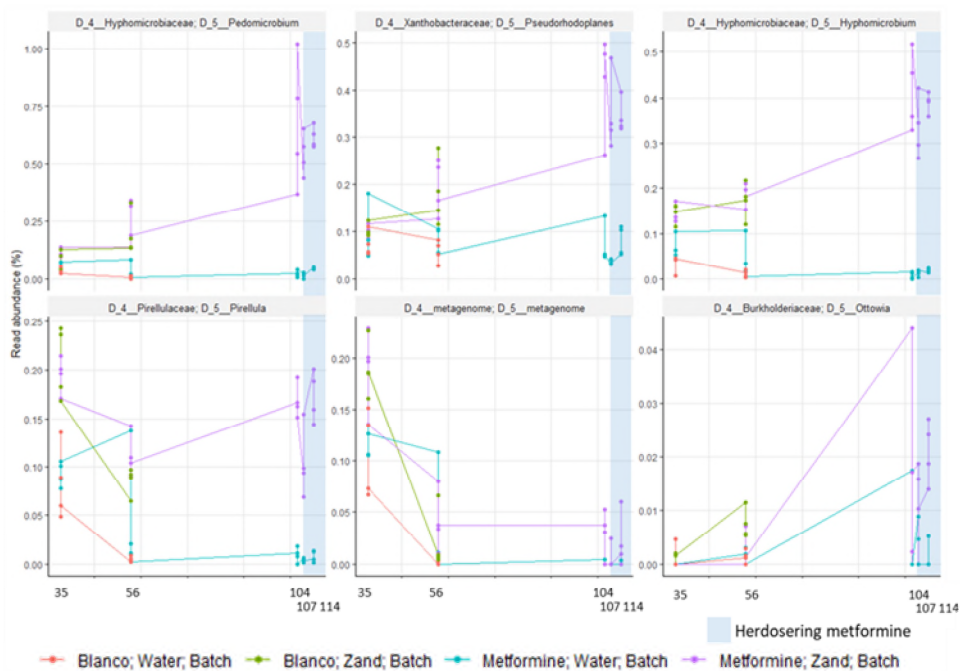
Figuur 26. De relatieve abundantie (read abundance, %) van de verschillende ASVs behorende bij de genera Pirrelula, Hyphomicrobium, Pseudorhodoplanes, Pedomicrobium, klasse subgroup 17, Ottowia en Gemmata gedurende incubatie in de kolommen met pyrazool (boven) en metformine (onder). Getoond zijn de relatieve abundantie in het inoculum en in het influent, effluent en het zand van de kolommen (zie legenda).



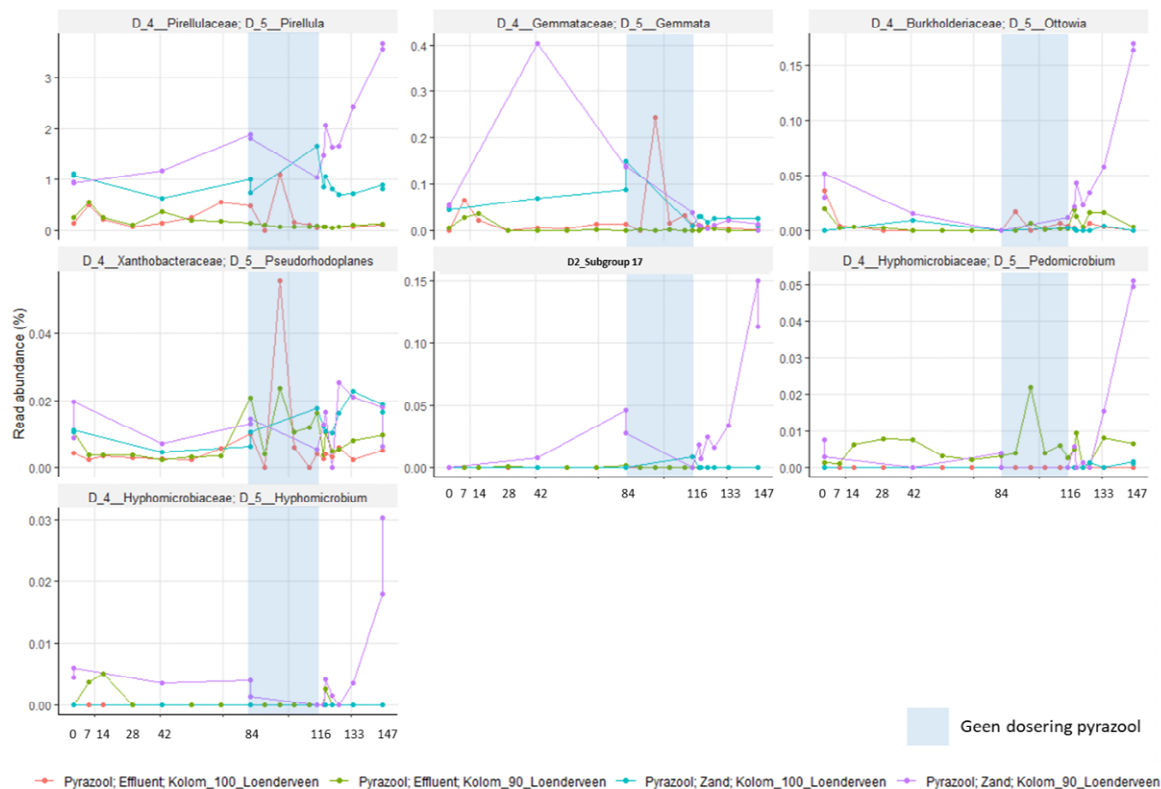
### Batch WRK pyrazool



### Batch WRK metformine



Figuur 27. De relatieve abundantie (read abundance, %) van de verschillende ASVs behorende bij de genera Pirellula, Hyphomicrobium, Pseudorhodoplans, Pedomicrobium, klasse subgroup 17, Ottowia en Gemmata gedurende incubatie in de batchexperimenten met pyrazool (boven) en metformine (onder). Getoond zijn de relatieve abundantie in het water en het zand van de batches met pyrazool en blanco's (boven) en met metformine en blanco's (onder, zie legenda). In de grafieken is de periode waar metformine opnieuw is gedoseerd gemarkeerd (zie legenda).



Figuur 28. De relatieve abundantie (read abundance, %) van de verschillende ASVs behorende bij de genera *Pirrellula*, *Hyphomicrobium*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, klasse subgroep 17, *Ottowia* en *Gemmata* gedurende incubatie in de geënte (90% Loenderveen) en niet geënte (100% Loenderveen) kolommen van Loenderveen met pyrazool. Getoond zijn de relatieve abundantie in het zand en effluent (zie legenda). In de grafiek zijn periodes zonder pyrazool dosering gemarkeerd (zie legenda).

## 6.5 Metformine tanks

De tanks van de kolomexperimenten voor metformine dosering waren ook in staat om metformine af te breken. Het slib in deze tanks is daarom ook bemonsterd voor NGS analyse. In Figuur 25 zijn de relatieve abundanties van de genera *Pirrellula*, *Hyphomicrobium*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, klasse subgroep 17, *Ottowia* en *Gemmata* weergegeven in de metformine tank. Al deze genera zijn aanwezig in de metformine tank. Het is opvallend dat de genera *Gemmata* en min of meer *Pirrellula* in hoge relatieve abundantie voorkomen in de metformine tank. Deze genera zijn beide significant meer aanwezig in de metformine kolommen t.o.v. het inoculum (Tabel 11). De genera *Pirrellula*, *Hyphomicrobium*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, klasse subgroep 17 en *Ottowia* worden dus mogelijk in verband gebracht met de afbraak van pyrazool en metformine, terwijl *Gemmata* mogelijk alleen gerelateerd is met metformine-afbraak.

## 6.6 IAZI en Noordbargeres

Gedurende het project zijn twee extra zuiveringsprocessen bemonsterd, het gaat om een industriële afvalwaterzuiveringsinstallatie (IAZI) waarin een hoge pyrazool verwijdering werd waargenomen en een snelfilter van een drinkwaterzuivering dat wordt gevoed met grondwater (PS Noordbargeres nabij Emmen). Uit een

meetcampagne was gebleken dat het snelfilter van Noordbargeres in staat is een specifieke OMV voor meer dan 97% te verwijderen, maar deze informatie is niet openbaar beschikbaar.

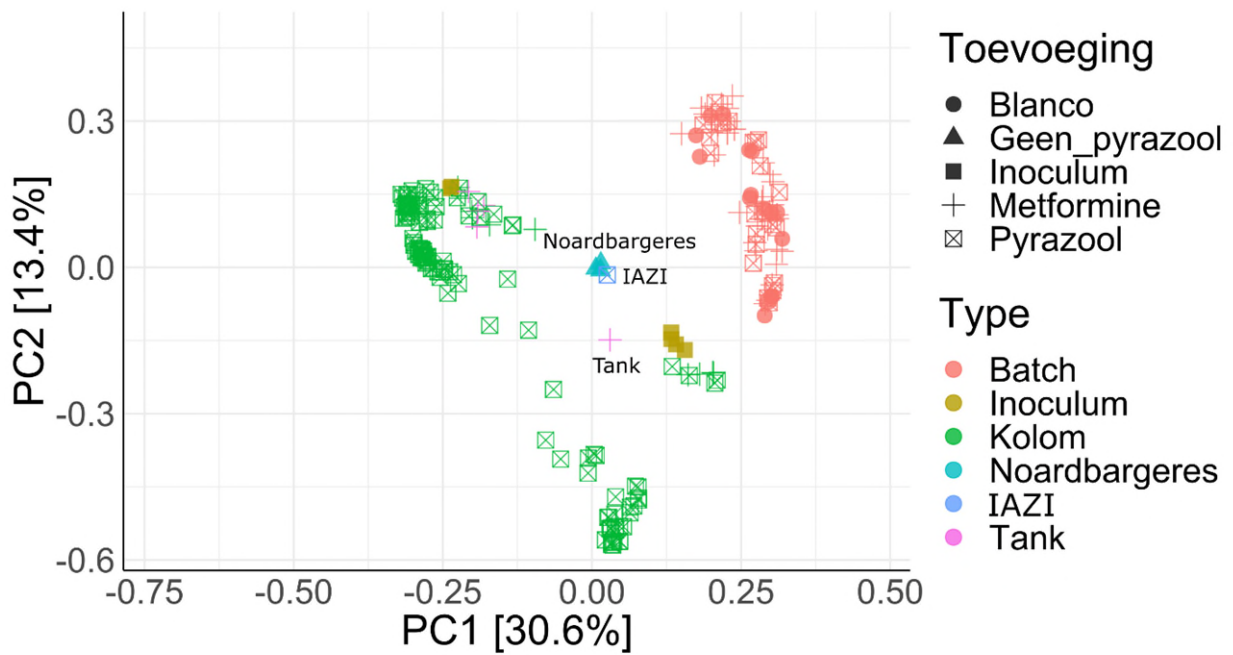
De IAZI en het snelfilter van Noordbargeres zijn bemonsterd voor NGS analyse om te onderzoeken of de kandidaat micro-organismen die mogelijk betrokken zijn bij metformine/pyrazool-afbraak, zoals geïdentificeerd in dit onderzoek, ook worden aangetroffen in een biologisch afvalwaterzuiveringsproces en een grondwaterfilter. Indien deze kandidaat micro-organismen worden aangetroffen in deze processen, kunnen deze micro-organismen ook hier betrokken zijn bij de afbraak van metformine/pyrazool en geeft dit extra aanwijzingen voor de betrokkenheid van de, in dit onderzoek geïdentificeerde micro-organismen bij afbraak van deze OMV's. Indien de kandidaat micro-organismen niet aanwezig zijn, zou dit betekenen dat er andere typen micro-organismen aanwezig in deze processen die ook in staat zijn metformine/pyrazool af te breken.

Daarnaast is het interessant om te kijken in hoeverre de microbiële populaties gevonden in de IAZI en het grondwaterfilter overeenkomen/verschillen van de eerder in kaart gebrachte populaties in de full-scale snelfilters gevoed met oppervlaktewater (Hoofdstuk 4).

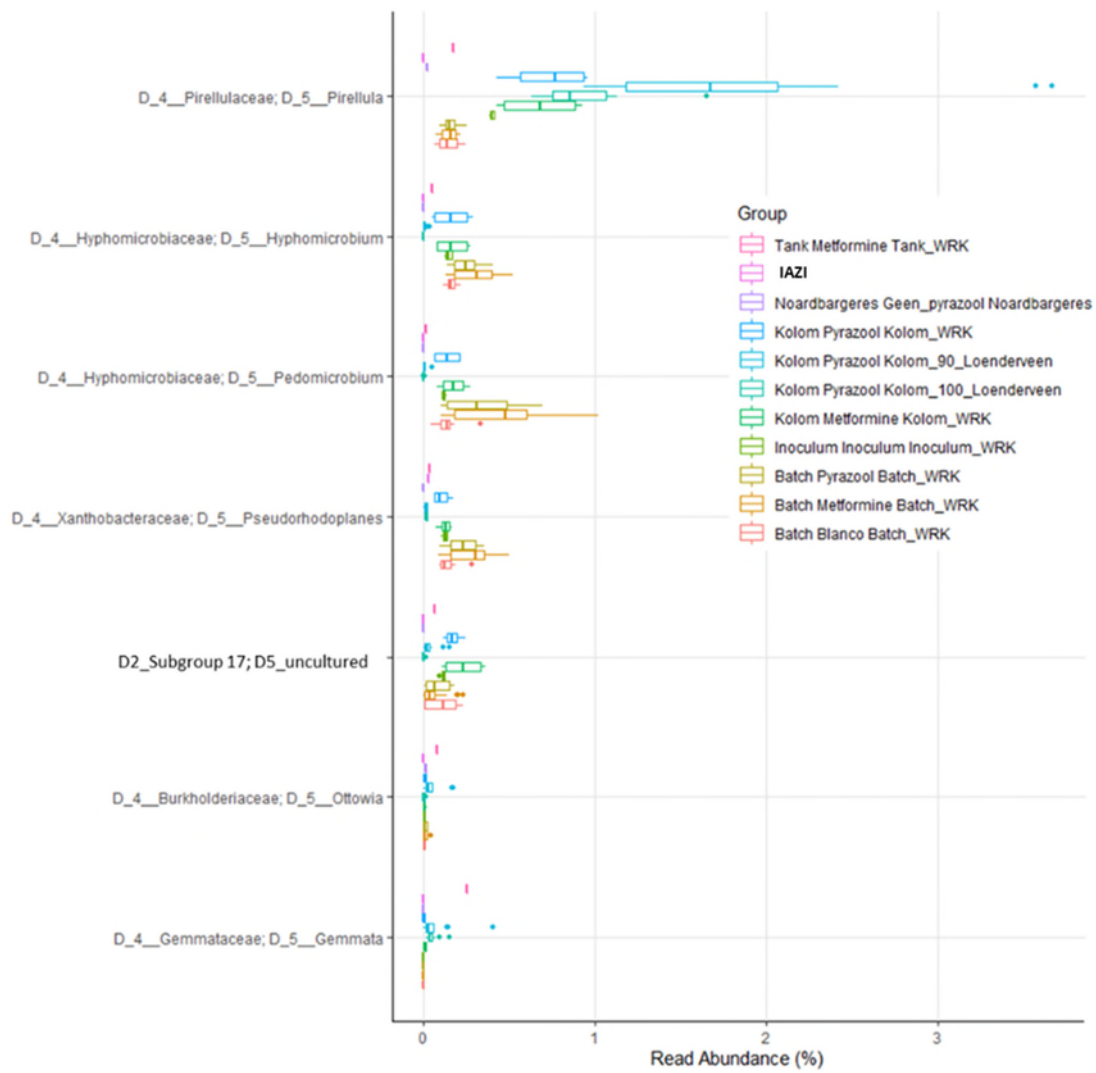
De microbiële populatie van de IAZI en Noordbargeres monsters zijn zeer anders dan die van de snelfilters gevoed met oppervlaktewater (Figuur 29). Dit was te verwachten aangezien het actief-slib proces dat bemonsterd is in de IAZI bestaat uit gesuspendeerde biomassa (in tegenstelling tot de aangehechte biomassa aan het materiaal in een snelfilter) en gevoed wordt met veel hogere concentraties organisch koolstof en OMV's. Hoewel het klassieke grondwaterfilter in de kern erg lijkt op de eerder geanalyseerde full-scale snelfilters, wordt deze wel gevoed met een andere type water (grondwater). Grondwater bevat over het algemeen lagere concentraties organisch materiaal en OMV's en vaak lage concentraties of geen zuurstof (afhankelijk van de verblijftijd en heersende redox omstandigheden).

Aangezien er slechts eenmalig bemonsterd is, kan er hoogstens bekeken worden of de hierboven beschreven kandidaat micro-organismen die mogelijk betrokken zijn bij metformine en pyrazool afbraak, ook voorkomen in deze monsters. In Figuur 30 zijn deze ASVs weergegeven die behoren bij deze genera. Zoals te zien is, zijn alle genera ook aanwezig in deze monsters. Hierbij dient opgemerkt worden dat deze genera ook aanwezig waren in de blanco van de batch experimenten, dus zonder pyrazool/metformine dosering.

Het is dus mogelijk dat de kandidaat micro-organismen ook in deze processen betrokken zijn bij de afbraak van pyrazool/metformine, maar dit kan op basis van de huidige data niet geconcludeerd worden. Toekomstig onderzoek waarbij deze processen frequenter worden bemonsterd, zal helpen met het correleren van afbraak en de microbiële gemeenschappen. Daarnaast zal het in kaart brengen van de enzymen die betrokken zijn bij de afbraak van OMV's (proteomics) inzicht geven in welke micro-organismen actief betrokken zijn bij de afbraak van OMV's zoals metformine/pyrazool.



Figuur 29. Principal coördinatie Analysis (PCoA) plot gebaseerd op Bray Curtis distance van alle zand monsters van de WRK en Loenderveen kolommen en batchexperimenten en WRK inoculum waarop microbiële analyse gedaan is met NGS. De assen verklaren een aandeel van de variatie in de data, in dit geval 30.6% voor de X-as en 13.4 % voor de Y-as. Elk punt staat voor een microbiële gemeenschap van een monster. De verschillende kleuren geven het monstertype weer, zie legenda.



Figuur 30. Relatieve abundantie (read abundance, %) van de verschillende ASVs behorende bij de genera *Pirellula*, *Hyphomicrobium*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, klasse subgroup 17, *Ottowia* en *Gemmata*. De relatieve abundantie is gegroepeerd voor de verschillende genomen monsters van de experimenten in de tijd (zie legenda).

## 7 Discussie

### 7.1 Variatie in verwijdering tussen full-scale snelfilters

Uit de screeningscampagne (hoofdstuk 4) blijkt dat sommige snelfilters wel in staat zijn specifieke OMV's te verwijderen, maar andere snelfilters niet of nauwelijks. Hoewel de OMV verwijderingscapaciteit verschilt tussen de acht snelfilters, kon deze niet worden verklaard door het aantal OMV's gedetecteerd in het influent van de filters of het cellulair ATP gehalte in het zand van de filters.

Hoewel uit de NGS resultaten blijkt dat de gehele microbiële populatie geen grote verschillen vertoont in dominante groepen tussen de acht snelfilters, vertoont de microbiële populatie wel verschillen tussen het filtermateriaal en het water (influent en effluent). De microbiële populatie van het effluent lijkt meer op die van het filtermateriaal dan het influent. Dit wordt veroorzaakt doordat de micro-organismen die op het filtermateriaal groeien uitspoelen en in het effluent terecht komen. Voor een uitgebreidere discussie wordt verwezen naar Bijlage I.

De hypothese is dat de verschillen in OMV verwijdering tussen de acht snelfilters worden veroorzaakt door i) de aan- of afwezigheid van specialistische of generalistische micro-organismen die de OMV's metabool afbreken en niet-dominant zijn in de algehele microbiële populatie, ii) door verschillen in de effectiviteit van co-metabolisme van een dominant micro-organisme, of iii) een combinatie van bovenstaande hypothesen. De influentwaterkwaliteit en procesomstandigheden spelen mogelijk een grote rol bij het wel of niet aanwezig en actief betrokken zijn bij OMV verwijdering van specifieke micro-organismen. Om de verschillen in OMV verwijdering te kunnen verklaren is een uitgebreidere meetcampagne nodig, waarin de microbiële populatie frequenter wordt bemonsterd voor een langere periode, in combinatie met karakterisering van het influent (makkelijk biodegradeerbaar materiaal, nutriënten, OMV's, etc.), het filtermateriaal (aangroei van mangaan en evt. ijzer) en de procesomstandigheden.

### 7.2 Metabool vs co-metabool

Doordat OMV's in lage concentraties voorkomen in oppervlaktewater (ng- $\mu$ g/L) is de verwachting dat micro-organismen zeer weinig energie uit deze stoffen kunnen halen om in leven te blijven en zich te vermenigvuldigen. Dit kan betekenen dat specialistische micro-organismen die OMV's metabool afbreken zeer traag groeien. Het is ook mogelijk dat de micro-organismen aanvullende energiebronnen gebruiken: i) generalistische micro-organismen die OMV's metabool afbreken kunnen daarnaast ook andere voedingsbronnen gebruiken en wisselen tussen beide, ii) bij co-metabole afbraak is de OMV niet de belangrijkste voedingsbron en dus niet noodzakelijk voor overleving van de bacterie. Hoewel het aantonen van metabole of co-metabole afbraak buiten de scope van het huidige onderzoek viel, zijn er wel aanwijzingen te vinden welke hieronder kort besproken zullen worden.

In de inoculatie-kolom werd geobserveerd dat na een tijdelijke doseerstop van 4 weken, na herdoseren, geen afbraak van pyrazool meer kon worden waargenomen. De micro-organismen die in staat zijn pyrazool af te breken lijken dus inactief te worden of af te sterven. Dit is een indicatie voor metabole afbraak door specialistische micro-organismen. Uit de NGS resultaten blijkt namelijk dat de relatieve abundantie van de genera die mogelijk betrokken zijn bij pyrazool afbraak toeneemt tijdens pyrazooldosering in het inoculatie-experiment en dat er geen toename, maar ook geen afname, is tijdens de doseerstop. Dit maakt metabole afbraak van pyrazool aannemelijk voor deze micro-organismen, maar co-metabolisme kan niet worden uitgesloten aangezien dit met de experimentele opzet van deze studie niet bepaald kon worden.

Uit de batch-experimenten bleek dat na een periode van afwezigheid van metformine na herdoseren weer direct metformine afgebroken kon worden. Deze resultaten werden onderbouwd door de ophopingsexperimenten in de kolom. Hier was metformine ook voor bepaalde periodes afwezig in het influent, maar de kolom bleef in staat metformine te degraderen. Dit is een indicatie voor co-metabole afbraak van metformine of metabole afbraak van metformine door meer generalistische micro-organismen. De kandidaat-micro-organismen die mogelijk betrokken zijn bij de afbraak van metformine/pyrazool behoren o.a. tot de planctomycetes.

Afbraak van OMV's in snelfilters via metabolisme door generalistische micro-organismen en/of afbraak via co-metabolisme zijn voor drinkwaterbedrijven de meest wenselijke scenario's scenario. Co-metabolisme heeft waarschijnlijk de voorkeur. De kans dat deze micro-organismen afsterven of op een andere manier uit de snelfilters verdwijnen, is dan het kleinst aangezien hun metabolisme grotendeels van andere stoffen afhankelijk is (co-metabolisme) of dat de bacterie gemakkelijk kan wisselen van voedingsstof (metabole afbraak door generalistische bacterie).

AOBs (Ammonium Oxiderende Bacteriën) zijn een voorbeeld van een groep micro-organismen die in staat zijn verschillende OMV's co-metabool af te breken (38). Hierbij lift de OMV mee op de ammoniumstofwisseling van de bacterie. Door experimenten uit te voeren in aan- of afwezigheid van ammonium, of door het doseren van een inhibitor (bijv. allylthioureum) die de ammoniumstofwisseling van AOB kan stoppen, kan worden getest hoe specifieke OMV's worden afgebroken.

Toekomstig onderzoek naar pyrazool, metformine of mengsels van OMV's zou meer inzicht kunnen geven in de types OMV's die metabool, co-metabool of met een combinatie van beide worden afgebroken.

### 7.3 Inoculatie en variërende concentraties

Met de experimentele opzet gebruikt in deze studie bleek het mogelijk een snelfilter dat geen pyrazool kon verwijderen (Loenderveen filtermateriaal) te inoculeren met 10% entmateriaal met pyrazooldegraderende micro-organismen (opgekweekt in een kolom) om zo pyrazoolverwijdering te bewerkstelligen. Hoewel er in de eerste twee weken geen duidelijke pyrazoolverwijdering kon worden waargenomen, nam deze na vier weken toe en varieerde in de daaropvolgende weken van 22 – 44%. Het is onduidelijk waarom dit verwijderingspercentage niet verder toenam in de kolom. Mogelijk waren er limiterende omstandigheden voor de specifieke bacterie of groep van micro-organismen verantwoordelijk voor de omzetting van pyrazool. Een andere mogelijkheid is dat de geïnoculeerde bacteriën zich niet kunnen vestigen in het nieuwe filtermateriaal, maar alleen op het inoculatiemateriaal aanwezig zijn. Ook zouden mangaanoxides een rol kunnen spelen, maar beide hypothesen dienen verder onderzocht te worden. Er dient opgemerkt te worden dat de verkregen resultaten zijn gebaseerd op enkele kolommen (geen gebruik gemaakt van duplo's) en er dus aanvullende studies nodig zijn om de kwantitatieve resultaten te bevestigen.

Eerder pilot-onderzoek van Bertelkamp et al. (2017) heeft aangetoond dat Kralingen filtermateriaal waaraan 50% Ouddorp filtermateriaal werd ge-ent, na ongeveer 400 bedvolumes circa 40% pyrazool kon verwijderen (influent doseerconcentratie 6 – 8 µg/L) (36). Na 400 BV liep de pyrazool verwijdering sterk terug naar slechts 10%. Met een ent-percentage van 50% leek het ent-concept dus niet te werken. Het is hoopgevend dat in de huidige studie slechts 10% ent-materiaal is gebruikt en hiermee na 4 weken ongeveer 22 – 44% pyrazool verwijderd kon worden (influent doseerconcentratie 5 µg/L). Mogelijk worden de variaties in verwijdering veroorzaakt door verschillen in het ent-materiaal. In de eerdere studie was het ent-materiaal filtermateriaal uit het snelfilter in Ouddorp, terwijl in het huidige experiment het ent-materiaal filtermateriaal was uit een kolom waarin de pyrazool degraderende bacteriën waren opgekweekt (mogelijk een grotere dichtheid aan geschikte micro-organismen).

Het concept waarbij drinkwaterbedrijven filtermateriaal zouden kunnen uitwisselen of specifieke biomassa aankopen om OMV verwijdering in snelfilters te verbeteren lijkt dus mogelijk. Wel zijn er aanvullende studies

noodzakelijk, voordat het concept toegepast kan worden in de praktijk. Er is daarbij ook meer inzicht nodig in het effect van enten ten behoeve van het verbeteren van de OMV verwijdering op de conventionele processen die plaatsvinden in het (zand)filter.

Het inoculatie experiment is in de huidige studies uitgevoerd met 10% ent-materiaal. Hoewel dit op slechts één experiment is gebaseerd en dus aanvullend onderzoek nodig is naar de minimale/optimale hoeveelheid ent-materiaal, lijkt 10% ent-materiaal in de praktijk moeilijk uitvoerbaar. Tevens zal onderzocht moeten worden of er andere manieren van enten mogelijk zijn. Daarnaast is het in de praktijk wenselijk de opstartperiode (in het huidige experiment 2 – 4 weken) te minimaliseren en het OMV verwijderingspercentage verder te verhogen. Hiervoor zou onderzocht moeten worden wat de limiterende omstandigheden zijn voor adaptatietijd en verwijderingsrendement en hoe deze vermeden kunnen worden. Tenslotte zal duidelijk moeten worden welke bacteriesoort of consortium betrokken is bij de afbraak van OMV's en hoe de afbraak wordt bewerkstelligd.

Albers et al. hebben in een pilot-studie een bacteriesuspensie gemengd met de toplaag van een snelfilter om zo de verwijdering van 2,6-dichlorobenzamide (BAM) te bewerkstelligen (39). De BAM verwijdering liep al snel terug in het filter en het vermoeden was dat dit kwam door het uitspoelen van de micro-organismen door terugspoelen van het filter, graasactiviteit door protozoa en afbraak. Een daaropvolgende studie van Horemans et al. probeerde cellen in te brengen in het filter met behulp van biocarriers in plaats van als suspensie (40). Hoewel de periode van BAM verwijdering langer aanhield, liep ook in het geval van de biocarriers de BAM verwijdering terug. Uithongering van de micro-organismen werd als voornaamste reden genoemd. Hieruit werd geconcludeerd dat naast het adequaat enten van een filter ook de concentratie assimileerbaar organisch koolstof (AOC) voldoende moet zijn.

Indien bekend is hoe de afbraak plaats vindt (metabool en/of co-metabool), kan gericht worden gezocht naar het voorkomen van eventuele limiterende omstandigheden. Eerst moet bekend zijn of de specifieke OMV metabool of co-metabool wordt afgebroken. Hiervoor kunnen experimenten uitgevoerd worden waarin co-metabolisme niet mogelijk is door bijvoorbeeld een specifiek koolstof- of stikstofmetabolisme stil te leggen of door experimenten uit te voeren met synthetisch water waarin deze koolstof of stikstofbron niet aanwezig is of met specifieke remmers. Een andere optie is isotopenonderzoek waarmee duidelijk kan worden gemaakt hoe de OMV wordt afgebroken en waar de transformatieproducten terecht komen. Het is echter niet bekend of het verschil in isotopen van de afbraakproducten bij deze lage concentraties te detecteren is. Een andere mogelijkheid is om met proteomics eiwitten te meten die verhoogd aanwezig zijn tijdens de afbraak van OMV's. Wanneer dit bijvoorbeeld enzymen betreffen die betrokken zijn bij nitrificatie, kan dit duiden op co-metabolisme. Ook kan vastgesteld worden van welke organismen deze eiwitten afkomen. Hierdoor wordt duidelijk welke micro-organismen actief betrokken zijn bij de afbraak van OMV's en kunnen mogelijk ook de afbraakroutes en mogelijke transformatieproducten in kaart worden gebracht. Een voordeel van proteomics ten opzichte van DNA-analyses is dat alleen naar de bacteriepopulatie wordt gekeken die enzymen heeft geproduceerd terwijl met DNA ook naar de inactieve of dode bacteriepopulatie wordt gekeken.

Een andere uitdaging is het uitblijven van pyrazoolverwijdering na een tijdelijke doseerstop van 4 weken in het inoculatie-experiment. Hierbij dient opgemerkt te worden dat het experiment niet in duplo is uitgevoerd en het niet uitgesloten kan worden dat het om een kolom-artefact gaat. Aanvullend onderzoek is dus nodig om de verkregen resultaten te bevestigen. Het uitblijven van OMV verwijdering na een tijdelijke afwezigheid van de stof in het influent, zou in de praktijk kunnen resulteren in een plotselinge afname in OMV verwijdering die moeilijk te voorspellen is. Echter, door de afbraak van metformine in de voedingstank van de kolomexperimenten is indirect ook het effect van fluctuaties in de metformine- en guanylureumconcentratie op de verwijderingscapaciteit van de kolom getest. Deze kortcyclische veranderingen lijken geen effect te hebben. Dit is echter niet met zekerheid te zeggen omdat de metformineconcentratie steeds erg laag was in het influent waardoor de verwijdering niet goed kon worden bepaald. Deze tegengestelde resultaten laten wel zien dat er mogelijk grote verschillen zijn in het effect van een doseerstop op de verwijderingscapaciteit van verschillende OMV's.



Er is meer inzicht nodig om te begrijpen waarom de pyrazoolverwijdering, na een doseerstop, niet meer opstart. Voor zover bekend wordt in de full-scale snelfilters van de WRK in Nieuwegein wel altijd pyrazool verwijderd. Er zijn verschillende mogelijke verklaringen (bijv. in de WRK zijn de episodes zonder pyrazool korter vergeleken met de kolom, de omstandigheden in het experiment verschillen met het full-scale filter of samenstelling van influentwater). Uit metingen van Waternet blijkt dat in alle (1 – 2 maandelijks) metingen altijd pyrazool in het influentwater aanwezig is, eventuele episodes zonder pyrazool zullen dus kort zijn. Zonder aanvullend onderzoek kan geen uitspraak worden gedaan deze hypothesen.

## 7.4 Microbiële populaties

In de batch- en kolomexperimenten traden grote veranderingen op in de microbiële populaties in de tijd. In de batchexperimenten houden deze mogelijk een verband met afbraakprocessen van organisch materiaal en dode cellen maar dit kon niet vastgesteld worden omdat er geen ATP- en UV<sub>254</sub>-metingen gedaan waren na 56 dagen. In de kolomexperimenten was dit niet te achterhalen, omdat er niet genoeg meetpunten beschikbaar waren voor statistische tests. Het was wel duidelijk dat de grote veranderingen in de microbiële populaties maar voor een klein deel te verklaren waren door dosering van metformine of pyrazool. Dit kan betekenen dat:

- Afbraak niet biologisch van aard was
- Er sprake was van afbraak van OMV's via co-metabolisme, waardoor er geen significante groei van dominante micro-organismen plaatsvond
- Er sprake was van afbraak van OMV's via metabolisme, maar dat groei van micro-organismen t.o.v. de gehele microbiële populatie niet significant is door de lage concentraties OMV's en/of de geringe energie die er uit groei van deze OMV's te halen is

Om onderscheid te maken tussen bovenstaande mogelijkheden is onderzocht of er specifieke micro-organismen met mogelijk lage relatieve abundantie significant toenamen tijdens afbraak van de OMV's metformine en pyrazool. Hiervoor is bepaald welke amplicon sequence variants (ASVs) significant verschilden tussen behandelingen.

### 7.4.1 Batchexperimenten

In de batchexperimenten waren er meer ASVs die significant verschilden tussen de batches met pyrazool en de blanco's dan tussen batches met metformine en de blanco's. Dit zijn vaak dezelfde ASVs als die significant verschillend waren in de kolom experimenten. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat in de batchexperimenten met metformine alleen verschillen getest zijn tot 56 dagen incubatie, terwijl dit voor pyrazool gedaan was voor de gehele incubatietijd. Bij de metformine conditie was namelijk al na 56 dagen het metformine afgebroken. Daardoor is deze conditie na 56 dagen niet meer verschillend van de blanco incubaties, wat een mogelijke verklaring is van de vergelijkbare microbiële populaties in deze behandelingen. Daarnaast zijn de blanco incubaties niet langer gemonitord dan 56 dagen, waardoor een vergelijking op lange termijn niet mogelijk is. Herdosering van metformine zorgde voor een verhoging van de microbiële diversiteit die waarschijnlijk niet kwam door dosering van de OMV, maar meer door de uitvoering van de dosering zelf, wat hiervan de precieze oorzaak hiervan is, is met de huidige data niet vast te stellen. Metformine werd namelijk gedoseerd in ultrapuur water. Op de andere tijdstippen van de batchexperimenten met metformine en pyrazool dosering nam de diversiteit namelijk af in de tijd. Het is aan de hand van deze batchexperimenten dus niet mogelijk om te stellen of er significante verschillen zouden zijn na langdurige incubatie met metformine dosering, zoals bij de pyrazool batchexperimenten. Hierdoor is het dus ook niet mogelijk om te bepalen of afbraak van metformine een co-metabool of metabool proces is in de batchexperimenten. Dit valt ook buiten de scope van de huidige studie.

#### 7.4.2 Kolomexperimenten

Over het algemeen was bij de kolomexperimenten met WRK-materiaal gedoseerd met pyrazool en metformine een duidelijke relatieve toename te zien van bepaalde ASVs. In de meeste gevallen waren ASVs die horen bij dezelfde genera in beide kolomexperimenten met metformine en pyrazool significant meer aanwezig dan in het entmateriaal en namen deze in beide kolommen ook toe in de tijd. Dit kan betekenen dat dezelfde micro-organismen verantwoordelijk zijn voor de afbraak van metformine en pyrazool. Het kan ook betekenen dat deze micro-organismen goed gedijen in kolomproeven, ongeacht het doseren van een OMV. Omdat er geen controlekolom (WRK filtermateriaal met WRK water, zonder dosering van pyrazool of metformine) is geïncubeerd, kan dit helaas niet uitgesloten worden. Enkele ASVs kwamen alleen significant meer voor in de kolom met pyrazool (*Halangium*, *Hyphomicrobium*, *Pedosphaeraceae* en subgroup 6) en enkele juist significant meer in de metformine kolom (*Rhizobiaceae*, *Obscuribacterales*, *Phycisphaeraceae*, Subgroup 17 en *Zixibacteria*) t.o.v. het inoculum. Ook hiervan is het niet uit te sluiten dat deze gedijen in kolommen ongeacht de gedoseerde OMV's, omdat significantie getest is t.o.v. het inoculum waarvan de omstandigheden zeer anders zijn dan een kolomexperiment.

Op de vraag of de toename van bepaalde ASV's afhankelijk is van de OMV dosering kan het inoculatie-experiment wel meer inzicht bieden. In dit experiment is namelijk de pyrazoolverwijdering in een kolom geënt met WRK materiaal van de pyrazool kolommen (90% Loenderveen, 10% entmateriaal) vergeleken met een controlekolom die niet geënt was (100% Loenderveen). Significant verschillende ASVs tussen deze kolommen zijn afkomstig uit het WRK materiaal en aanwezigheid zegt dus ook niets over de betrokkenheid bij afbraak van OMV's. Wanneer deze micro-organismen groei vertonen in de geënte kolom, kan dit erop duiden dat deze micro-organismen goed gedijen in kolommen, ongeacht de aanwezigheid van pyrazool. Wat de zaak sterk maakt is dat bepaalde micro-organismen stoppen met groeien wanneer OMV-dosering van de kolom stopt en weer groei vertonen wanneer dosering hervat wordt. Dit was het geval voor ASVs behorende bij de genera *Pirellula*, *Ottowia*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, *Hyphomicrobium* en bij de klasse subgroup 17. Voor *Ottowia* lijkt er een afname plaats te vinden tijdens pyrazooldosering, wat verklaard kan worden omdat dit genus mogelijk niet betrokken is bij pyrazool afbraak maar bij metformine afbraak. Dit genus was namelijk significant hoger in de batchincubaties met metformine en niet tijdens pyrazool dosering.

Ander extra bewijs dat bepaalde genera betrokken zijn bij de afbraak van pyrazool komt uit het vergelijken van afbraakcurves en het voorkomen van deze genera in de kolomexperimenten. Wanneer we het verschil in afbraak van pyrazool tussen de geënte en niet-geënte Loenderveenkolommen vergelijken met relatieve abundantie van bovengenoemde genera, zien we dat er ook een piek is in de relatieve abundantie van deze genera op het tijdstip van een piek in de afbraak, behalve voor *Gemmata*. Op dag 126 is deze piek weer verdwenen en is ook de afbraak van pyrazool een stuk lager. Na 13 dagen begon de relatieve abundantie van deze genera weer te stijgen en ook de afbraak nam weer toe. Dit toont dat de afbraak van pyrazool gecorreleerd is aan de toename van deze genera en geeft extra onderbouwing dat deze genera betrokken zijn bij de afbraak en dat we niet te maken hebben met een artefact. Op dag 147 was de abundantie het hoogst en is dus ook weer een verhoging van de afbraak van pyrazool verwacht. Helaas is op dit tijdstip de pyrazool afbraak niet meer gemonitord. De combinatie van deze gegevens laat zien dat er dus waarschijnlijk meer pyrazool afbraak plaats zou vinden in de kolom na 147 dagen.

#### 7.4.3 Opkweken en identificeren van micro-organismen betrokken bij OMV afbraak

Het opkweken en identificeren van micro-organismen verantwoordelijk voor OMV afbraak lijkt mogelijk met de experimentele opzet zoals ontworpen in deze studie. Dit onderzoek was gelimiteerd tot snelfilters, maar de beschreven aanpak is ook te vertalen naar andere biologische processen zoals biologisch actieve-koolfilters, langzame zandfiltratie, duinpassage en oeverfiltratie in de drinkwaterproductie en/of biologische afvalwaterzuiveringsprocessen. Kolomproeven lijken het meest geschikt voor het opkweken van OMV afbrekende bacteriën, omdat OMV's continue gedoseerd kunnen worden, waardoor OMV afbrekende micro-organismen groei kunnen vertonen. Hierdoor is het beter mogelijk om OMV afbrekende micro-organismen te identificeren. De micro-organismen die mogelijk betrokken zijn bij de afbraak van pyrazool, metformine en guanylurea (Tabel 10), behoren

voornamelijk tot de klasse van *alphaproteobacterien* (voornamelijk orde *Rhizobiales*) en de klasse *Planctomycetacia* (families *Pirellulaceae* en *Gemmataceae*).

Er is zeer weinig informatie bekend over micro-organismen die pyrazool af kunnen breken. Onderzoek heeft wel aangetoond dat *Gemmataceae*, *Pirellulaceae* en *Planctomycetaceae* in verhoogde relatieve abundantie aanwezig waren in de aanwezigheid van organische microverontreinigingen, dat suggereert dat ze betrokken zijn bij de afbraak daarvan (41). Genetische analyse van 11 vertegenwoordigers van de orde *Planctomycetales* geeft aan dat ze de potentie hebben om diverse toxische stoffen af te breken zoals ethylbenzeen, aminobenzoaat, naphthaleen, bisphenol A, chlorocyclohexaan en polycyclische aromatische koolwaterstoffen (42).

Voor metformine en guanlyureum afbraak is meer bekend, maar de verantwoordelijke micro-organismen zijn ook niet beschreven. In een studie is een *Aminobacter* soort geïsoleerd uit actief slib die 15 mg/l metformine af kan breken binnen 3 dagen (20). In deze studie met actief slib namen afbraaksnelheden juist af na langere incubatie, in tegenstelling tot de resultaten in dit rapport. In een andere studie met actief slib bleek dat metformine volledig afgebroken kan worden als koolstof en energiebron. Guanlyureum afbraak werd juist gestimuleerd door toevoeging van glucose. Daarnaast nam de afbraak van metformine toe in aanwezigheid van guanlyureum (21). Deze resultaten impliceren dat metformine metabool afgebroken kan worden, terwijl dat niet geldt voor guanlyureum. In weer een andere studie blijkt dat metformine in afvalwater compleet afgebroken kan worden wanneer organische co-substraten aanwezig zijn, die ook de afbraak van het product guanlyureum stimuleert. Dit impliceert weer dat metformine co-metabool wordt afgebroken (43). Deze gegevens tonen aan dat in verschillende milieus metformine metabool of co-metabool afgebroken lijkt te worden en dat er waarschijnlijk andere micro-organismen betrokken zijn in andere milieus en onder andere condities.

## 8 Conclusies en aanbevelingen

### 8.1 Conclusies

Voorliggend rapport heeft getracht antwoord te vinden op de volgende onderzoeksvragen:

- Welke types micro-organismen zijn (mogelijk) betrokken bij de afbraak van OMV's in snelfilters van oppervlaktewaterzuiveringen in Nederland en België (De Watergroep)?
- Kan de afbraak van OMV's in biologische filtratieprocessen verbeterd/geoptimaliseerd worden door filters te enten met specifiek opgekweekte microbiële populaties?

Om de eerste vraag te beantwoorden zijn ophopingsexperimenten uitgevoerd. Hiervoor was inzicht nodig in welke types OMV's goed verwijderd konden worden in full-scale snelfilters. Aangezien er onvoldoende data beschikbaar was om dit te bepalen, is er gestart met een meetcampagne. Deze heeft laten zien dat snelfilters van oppervlaktewaterzuiveringen in staat zijn om een aantal OMV's te verwijderen (tot 93%). Het volle potentieel van snelfilters om OMV's te verwijderen is moeilijk vast te stellen omdat de meeste OMV's in zeer lage concentraties aanwezig zijn in het influent. In deze studie is voor het eerst aangetoond dat snelfilters uit de drinkwaterzuivering in staat zijn metformine en tri-n-butyl-fosfaat af te breken. Gebaseerd op de resultaten uit deze meetcampagne en eerder onderzoek naar pyrazool, is besloten de ophopingsexperimenten uit te voeren met pyrazool en metformine.

De analyse van de microbiële gemeenschappen toonde een vergelijkbare samenstelling van het influent en effluent in de meeste snelfilters aan, maar deze verschilt wel van het filtermedium. Dit impliceert dat specifieke micro-organismen groeien in het filtermateriaal van snelfilters. Er was echter geen duidelijk verband tussen de efficiëntie van de verwijdering van OMV's en de samenstelling van de microbiële gemeenschap waar te nemen. Dit betekent dat OMV's hoogstwaarschijnlijk via co-metabolisme worden afgebroken in deze filters, door metabolisme van micro-organismen die niet tot de dominante groepen van de gemeenschap behoren, of door sorptie. Deze laatste is minder aannemelijk, omdat sorptie voor de meeste OMV's beperkt is.

Op basis van de verschillende experimenten (ophopingsexperimenten en ent-experiment) die uitgevoerd zijn, kan geconcludeerd worden dat het voor een aantal genera aannemelijk te maken is dat deze betrokken zijn bij de afbraak van metformine en pyrazool. Het gaat dan om de volgende genera: *Pirellula*, *Ottowia*, *Pseudorhodoplanes*, *Pedomicrobium*, *Hyphomicrobium* en voor ASVs behorende bij de klasse subgroup 17. Het genus *Gemmata* lijkt minder betrokken te zijn bij de afbraak van pyrazool, maar is mogelijk wel betrokken bij de afbraak van metformine. Verder bewijs kan alleen geleverd worden door te onderzoeken of er afbraak plaatsvindt van beide stoffen in zogenaamde reïncultures of ophopingcultures waarin deze micro-organismen dominant zijn. Dit valt echter buiten de scope van dit onderzoek.

Bovengenoemde micro-organismen bleken ook aanwezig in de full-scale snelfilters, de IAZI en het grondwaterfilter van Noordbargeres waar afbraak van deze stoffen werd waargenomen. Aangezien er alleen op DNA is geanalyseerd, kan niet vastgesteld worden of deze kandidaat micro-organismen ook daadwerkelijk actief betrokken waren bij de afbraak van metformine/pyrazool in de full-scale snelfilters. Dit is de eerste studie die heeft aangetoond dat het op deze manier mogelijk is micro-organismen te identificeren die mogelijk betrokken zijn bij de afbraak van specifieke OMV's in biologische filtratieprocessen van de drinkwaterzuivering.

Voor het beantwoorden van de tweede onderzoeksvraag is een ent-experiment uitgevoerd. Hiervoor is filtermateriaal dat niet in staat was pyrazool af te breken, ge-ent met filtermateriaal dat wel pyrazool kon afbreken. Hieruit bleek dat het mogelijk was om pyrazool afbraak op te starten in het filtermateriaal dat dit eerst niet kon

door gebruik te maken van 10% ent-materiaal. Na 4 weken werd ongeveer 22-44% pyrazool verwijderd, maar dit percentage nam niet verder toe. Daarnaast resulteerde het tijdelijk stoppen van de pyrazool dosering binnen 4 weken na herstart van de dosering niet tot een herstel van de eerder waargenomen pyrazool afbraak. Dit betekent dat in de praktijk wellicht ent-materiaal tussen filters uitgewisseld kan worden, maar dat het proces gevoelig is voor veranderingen in de influent concentratie.

## 8.2 Aanbevelingen

De volgende aanbevelingen worden gedaan gerangschikt op prioriteit:

- Toekomstig onderzoek zal zich moeten focussen op het verkrijgen van meer inzicht in de factoren die limiterend zijn voor verregaande (>95%) pyrazool afbraak in een kolom ge-ent met specifiek pyrazool afbrekende biomassa en waarom pyrazool niet meer wordt afgebroken na een tijdelijke doseerstop.
- Daarnaast zal er ook gekeken moeten worden of het ent-concept effectief is voor andere OMV's (bijv. toxicologisch relevante OMV's die moeilijk te verwijderen zijn in de drinkwaterzuivering). Tevens dient onderzocht te worden wat het effect is van het doseren van OMV mengsels (in plaats van het doseren van één enkele stof zoals pyrazool) op de samenstelling van de microbiële populatie en de potentie van deze populatie om deze OMV's om te zetten.
- Onderzoek naar metabole/co-metabole afbraak van OMV's om te kijken of er bepaalde categorieën OMV's onderscheiden kunnen worden (metabool afgebroken OMV's, co-metabool afgebroken OMV's, of een combinatie van beide). Hierbij moet onderzocht worden welke nutriënten de co-metabolische afbraak stimuleren (bijv. ammonium en verschillende koolstofbronnen) en moet ook onderzocht worden hoe de bacteriepopulatie zich ontwikkelt en welke enzymen geproduceerd worden (proteomics of qPCR op RNA of DNA van specifieke enzymen) om zo onderscheid te kunnen maken tussen actief betrokken micro-organismen en niet betrokken micro-organismen. Deze informatie zal ook inzicht bieden in voor welke OMV's een tijdelijke afwezigheid in het influent problematisch kan zijn (metabool afgebroken OMV's) en voor welke OMV's een tijdelijke afwezigheid in het influent geen effect zal hebben (co-metabool afgebroken OMV's).
- Verder onderzoek doen naar andere manieren van enten (inoculatie) en de procedure verbeteren. Hierbij moeten de volgende onderwerpen onderzocht worden: het minimaal benodigde percentage ent-materiaal, verbeteren van de OMV verwijdering na enten, hoe het proces robuuster gemaakt kan worden tegen variërende influent concentraties en of het principe van enten met filtermateriaal ook op andere OMV's van toepassing is.
- Een uitgebreidere meetcampagne van full-scale snelfilters (frequenter analyseren over een langere periode) inclusief het meten van transformatieproducten van OMV's. Hierdoor kunnen deze gegevens gecombineerd worden om zo beter de biologische afbraak van OMV's in full-scale snelfilters te kunnen begrijpen en deze kennis te gebruiken om de snelfilters voor de afbraak van OMV's te optimaliseren. Kennis van de transformatieproducten maakt het mogelijk om de afbraakroutes in kaart te brengen en mogelijk de betrokken bacteriën/enzymen aan te wijzen. Door meer metingen uit te voeren kunnen de resultaten statistisch onderbouwd worden. Hierbij zal ook het influent (NOM, AOC, nutriënten, NH<sub>4</sub>, etc.) en het zand (Mn-, Fe-oxides, etc.) uitgebreid gekarakteriseerd moeten worden aangezien aangetoond is dat deze parameters OMV afbraak kunnen beïnvloeden.
- De ophopingsexperimenten zoals ontwikkeld in deze studie zijn niet alleen bruikbaar voor snelfilters. Aanbevolen wordt om de ophopingsexperimenten ook voor andere biologische processen zoals granulair actief-koolfiltratie, actief-slibproces en langzame zandfiltratie uit te voeren. Daarnaast dient er ook gekeken te worden naar de biologische afbraak van mengsels van OMV's en of dit verschilt van de afbraak van één specifieke OMV's, om zo de praktijk beter te benaderen. Mengsels van OMV's kunnen ervoor zorgen dat er competitie ontstaat in de microbiële populatie. Hierdoor worden sommige OMV's in mengsels mogelijk

slechter afgebroken dan bij het doseren van één stof. Door een blanco conditie mee te nemen in nieuw te ontwerpen kolomexperimenten kan beter bepaald worden welke micro-organismen wel of niet verantwoordelijk zijn voor OMV afbraak.

## 9 Referenties

1. Zearley TL, Summers RS. 2012. Removal of Trace Organic Micropollutants by Drinking Water Biological Filters. *Environ Sci Technol* 46:9412-9419.
2. D'Alessio M, Yoneyama B, Kirs M, Kisand V, Ray C. 2015. Pharmaceutically active compounds: Their removal during slow sand filtration and their impact on slow sand filtration bacterial removal. *Sci Total Environ* 524-525:124-135.
3. Hijnen W, Hofman-Caris, R., Bertelkamp, C. 2016. BTO 2016.203(s) Pyrazool - inventarisatie full-scale data en verkennend experimenteel onderzoek. KWR Nieuwegein.
4. Rattier M, Reungoat J, Gernjak W, Joss A, Keller J. 2012. Investigating the role of adsorption and biodegradation in the removal of organic micropollutants during biological activated carbon filtration of treated wastewater. *Journal of Water Reuse and Desalination* 2:127-139.
5. Hollender J, Rothardt J, Radny D, Loos M, Epting J, Huggenberger P, Borer P, Singer H. 2018. Comprehensive micropollutant screening using LC-HRMS/MS at three riverbank filtration sites to assess natural attenuation and potential implications for human health. *Water Research X* 1:100007.
6. Bertelkamp C, Reungoat J, Cornelissen ER, Singhal N, Reynisson J, Cabo AJ, van der Hoek JP, Verliefe ARD. 2014. Sorption and biodegradation of organic micropollutants during river bank filtration: A laboratory column study. *Water Res* 52:231-241.
7. OECD. 2002. Test No. 308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems.
8. OECD. 2000. Test no. 106: Guideline for the testing of chemicals – Adsorption – Desorption Using a Batch Equilibrium Method
9. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537.
10. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852-857.
11. Bisanz JE, Soto-Perez P, Lam KN, Bess EN, Haiser HJ, Allen-Vercoe E, Rekdal VM, Balskus EP, Turnbaugh PJ. 2018. Illuminating the microbiome's dark matter: a functional genomic toolkit for the study of human gut Actinobacteria. *bioRxiv* doi:10.1101/304840:304840.
12. Andersen KS, Kirkegaard RH, Karst SM, Albertsen M. 2018. ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *bioRxiv* doi:10.1101/299537:299537.
13. McMurdie PJ, Holmes S. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8:e61217.
14. Hamann E, Stuyfzand PJ, Greskowiak J, Timmer H, Massmann G. 2015. The fate of organic micropollutants during long-term/long-distance river bank filtration. *Sci Total Environ* 545-546:629-640.
15. Bogunovic M, Knezevic, V., Simeunovic, J., Teodorovic, I., Ivancev-Tumbas, I. 2017. Biodegradation of a mixture of benzophenone, benzophenone-3, caffeine and carbamazepine in a laboratory test filter. *Journal of the Serbian Chemical Society* 82:1445-1459.
16. Greenstein KE, Lew J, Dickenson ERV, Wert EC. 2018. Investigation of biotransformation, sorption, and desorption of multiple chemical contaminants in pilot-scale drinking water biofilters. *Chemosphere* 200:248-256.

17. Tran NH, Gan J, Nguyen VT, Chen H, You L, Duarah A, Zhang L, Gin KY-H. 2015. Sorption and biodegradation of artificial sweeteners in activated sludge processes. *Bioresour Technol* 197:329-338.
18. Hermes N, Jewell KS, Schulz M, Müller J, Hübner U, Wick A, Drewes JE, Ternes TA. 2019. Elucidation of removal processes in sequential biofiltration (SBF) and soil aquifer treatment (SAT) by analysis of a broad range of trace organic chemicals (TOCs) and their transformation products (TPs). *Water Res* 163:114857.
19. Foolad M, Ong SL, Hu J. 2015. Transport of sewage molecular markers through saturated soil column and effect of easily biodegradable primary substrate on their removal. *Chemosphere* 138:553-559.
20. Poursat BAJ, van Spanning RJM, Braster M, Helmus R, de Voogt WP, Parsons JR. 2019. Biodegradation of metformin and its transformation product, guanylurea, by natural and exposed microbial communities (Open Access). *Ecotoxicol Environ Saf* 182.
21. Briones RM, Zhuang W-Q, Sarmah AK. 2018. Biodegradation of metformin and guanylurea by aerobic cultures enriched from sludge. *Environ Pollut* 243:255-262.
22. Scheurer M, Brauch H-J, Lange FT. 2009. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal Bioanal Chem* 394:1585-1594.
23. Piai L, Blokland M, van der Wal A, Langenhoff A. 2020. Biodegradation and adsorption of micropollutants by biological activated carbon from a drinking water production plant. *J Hazard Mater* 388:122028.
24. Kahl S, Kleinstüber S, Nivala J, van Afferden M, Reemtsma T. 2018. Emerging Biodegradation of the Previously Persistent Artificial Sweetener Acesulfame in Biological Wastewater Treatment. *Environ Sci Technol* 52:2717-2725.
25. Castronovo S, Wick A, Scheurer M, Nödler K, Schulz M, Ternes TA. 2017. Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters. *Water Res* 110:342-353.
26. Hellauer K, Karakurt S, Sperlich A, Burke V, Massmann G, Hübner U, Drewes JE. 2018. Establishing sequential managed aquifer recharge technology (SMART) for enhanced removal of trace organic chemicals: Experiences from field studies in Berlin, Germany. *Journal of Hydrology* 563:1161-1168.
27. Nakamura A. 1991. Tri-n-butyl phosphate. *Environ Health Criter* 112:1-80.
28. Sheldon LS, Hites RA. 1979. Sources and movement of organic chemicals in the Delaware River. *Environ Sci Technol* 13:574-579.
29. Alidina M, Li D, Ouf M, Drewes JE. 2014. Role of primary substrate composition and concentration on attenuation of trace organic chemicals in managed aquifer recharge systems. *J Environ Manag* 144:58-66.
30. Burke V, Greskowiak J, Grünenbaum N, Massmann G. 2017. Redox and Temperature Dependent Attenuation of Twenty Organic Micropollutants – A Systematic Column Study. *Water Environ Res* 89:155-167.
31. Oh S, Hammes F, Liu W-T. 2018. Metagenomic characterization of biofilter microbial communities in a full-scale drinking water treatment plant. *Water Res* 128:278-285.
32. Trautwein C, Kümmerer K. 2011. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* 85:765-773.
33. Straub JO, Caldwell DJ, Davidson T, D'Aco V, Kappler K, Robinson PF, Simon-Hettich B, Tell J. 2019. Environmental risk assessment of metformin and its transformation product guanylurea. I. Environmental fate. *Chemosphere* 216:844-854.
34. Bertelkamp C, Hijnen W, Siegers W, Hofman-Caris R, van der Leer R. 2016. Verwijdering van Pyrazool in drinkwaterzuiveringsprocessen.
35. Hijnen W, Hofman-Caris R, Bertelkamp C. 2016. De verwijdering van pyrazool: verkennend experimenteel onderzoek. KWR, Nieuwegein.
36. Bertelkamp C, Hofman-Caris CHM, Siegers W. 2017. Biologische verwijdering van pyrazool, metformine, guanylurea, melamine en urotropine in snelle zandfilters. KWR, Nieuwegein.
37. Baumgarten B, Jählig J, Reemtsma T, Jekel M. 2011. Long term laboratory column experiments to simulate bank filtration: Factors controlling removal of sulfamethoxazole. *Water Res* 45:211-220.
38. Xu Y, Yuan Z, Ni B-J. 2016. Biotransformation of pharmaceuticals by ammonia oxidizing bacteria in wastewater treatment processes. *Sci Total Environ* 566-567:796-805.



39. Albers CN, Feld L, Ellegaard-Jensen L, Aamand J. 2015. Degradation of trace concentrations of the persistent groundwater pollutant 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in bioaugmented rapid sand filters. *Water Res* 83:61-70.
40. Horemans B, Raes B, Vandermaesen J, Simanjuntak Y, Brocatus H, T'Syen J, Degryse J, Boonen J, Wittebol J, Lapanje A, Sørensen SR, Springael D. 2017. Biocarriers Improve Bioaugmentation Efficiency of a Rapid Sand Filter for the Treatment of 2,6-Dichlorobenzamide-Contaminated Drinking Water. *Environ Sci Technol* 51:1616-1625.
41. Phan HV, Hai FI, Zhang R, Kang J, Price WE, Nghiem LD. 2016. Bacterial community dynamics in an anoxic-aerobic membrane bioreactor – Impact on nutrient and trace organic contaminant removal. *Int Biodeterior Biodegrad* 109:61-72.
42. Guo M, Zhou Q, Zhou Y, Yang L, Liu T, Yang J, Chen Y, Su L, Xu J, Chen J, Liu F, Chen J, Dai W, Ni P, Fang C, Yang R. 2014. Genomic Evolution of 11 Type Strains within Family Planctomycetaceae. *PLOS ONE* 9:e86752.
43. Janka E, Carvajal D, Wang S, Bakke R, Dinamarca C. 2019. Treatment of Metformin-Containing Wastewater by a Hybrid Vertical Anaerobic Biofilm-Reactor (HyVAB). *Int J Environ Res Public Health* 16.

# I Organic micropollutant removal in full-scale rapid sand filters used for drinking water treatment in The Netherlands and Belgium

Camilla di Marcantonio<sup>1</sup>, Cheryl Bertelkamp<sup>2</sup>, Nikki van Bel<sup>2</sup>, Tessa E. Pronk<sup>2</sup>, Peer H.A. Timmers<sup>2</sup>, Paul van der Wielen<sup>2,3</sup>, Andrea M Brunner<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Sapienza University of Rome, Department of Civil, Constructional and Environmental Engineering (DICEA), Rome, Italy

<sup>2</sup> KWR Water Research Institute, P.O. Box 1072, 3430 BB Nieuwegein, the Netherlands

<sup>3</sup> Laboratory of Microbiology, Wageningen University & Research, Stippeneng 4, 6708WE Wageningen, The Netherlands

\*Corresponding author, E-mail address: andrea.brunner@kwrwater.nl

## Abstract

Biological treatment processes have the potential to remove organic micropollutants (OMPs) during water treatment. The OMP removal capacity of conventional drinking water treatment processes such as rapid sand filters (RSF), however, has not been studied in detail. We investigated OMP removal and transformation product (TP) formation in seven full-scale RSFs in The Netherlands and Belgium all treating surface water, using high-resolution mass spectrometry based quantitative suspect and non-target screening (NTS). Additionally, we studied the microbial communities with 16S rRNA gene amplicon sequencing in both influent and effluent waters as well as the RSF filter medium, and integrated these data to comprehensively assess the processes that affect OMP removal.

In the RSF influent, 9 to 30 of the 127 target OMPs were detected. The removal efficiencies ranged from 0 to 93%. A data-driven workflow was established to monitor TPs, based on the combination of NTS feature intensity profiles between influent and effluent samples and the prediction of biotic TPs. The workflow identified 10 TPs, including molecular structure. Microbial community composition analysis showed similar community composition in the influent and effluent of most RSFs, but different from the filter medium, implying that specific microorganisms proliferate in the RSF. Some of these are able to perform typical processes in water treatment such as nitrification and iron oxidation. However, there was no clear relationship between OMP removal efficiency and microbial community composition. This implies that OMPs are removed via co-metabolism, by microorganisms that are not the dominant members of the community, or by sorption.



# Organic micropollutant removal in full-scale rapid sand filters used for drinking water treatment in The Netherlands and Belgium

Camilla Di Marcantonio<sup>a</sup>, Cheryl Bertelkamp<sup>b</sup>, Nikki van Bel<sup>b</sup>, Tessa E. Pronk<sup>b</sup>, Peer H.A. Timmers<sup>b</sup>, Paul van der Wielen<sup>b,c</sup>, Andrea M. Brunner<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Sapienza University of Rome, Department of Civil, Constructional and Environmental Engineering (DICEA), Rome, Italy

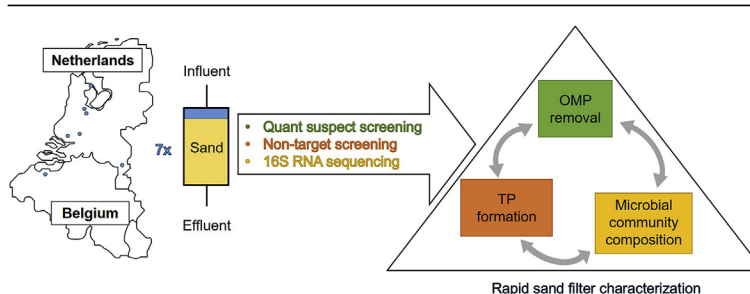
<sup>b</sup> KWR Water Research Institute, P.O. Box 1072, 3430, BB, Nieuwegein, the Netherlands

<sup>c</sup> Laboratory of Microbiology, Wageningen University & Research, Stippeneng 4, 6708WE, Wageningen, the Netherlands

## HIGHLIGHTS

- 27% of OMPs detected in RSF influents removed during filtration.
- Structure of ten transformation products from RSF effluents elucidated.
- Two novel transformation products identified using BioTransformer prediction.
- Microbial community similar in influent and effluent, different in filter medium.
- Overall OMP removal efficiencies not related to microbial community composition.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 7 April 2020

Received in revised form

19 June 2020

Accepted 5 July 2020

Available online 12 July 2020

Handling Editor: Chennai Guest Editor

### Keywords:

Organic micropollutants  
Drinking water treatment  
Rapid sand filtration  
Non-target screening  
Microbial community composition analysis  
Transformation products

## ABSTRACT

Biological treatment processes have the potential to remove organic micropollutants (OMPs) during water treatment. The OMP removal capacity of conventional drinking water treatment processes such as rapid sand filters (RSFs), however, has not been studied in detail. We investigated OMP removal and transformation product (TP) formation in seven full-scale RSFs all treating surface water, using high-resolution mass spectrometry based quantitative suspect and non-target screening (NTS). Additionally, we studied the microbial communities with 16S rRNA gene amplicon sequencing (NGS) in both influent and effluent waters as well as the filter medium, and integrated these data to comprehensively assess the processes that affect OMP removal. In the RSF influent, 9 to 30 of the 127 target OMPs were detected. The removal efficiencies ranged from 0 to 93%. A data-driven workflow was established to monitor TPs, based on the combination of NTS feature intensity profiles between influent and effluent samples and the prediction of biotic TPs. The workflow identified 10 TPs, including molecular structure. Microbial community composition analysis showed similar community composition in the influent and effluent of most RSFs, but different from the filter medium, implying that specific microorganisms proliferate in the RSFs. Some of these are able to perform typical processes in water treatment such as nitrification and iron oxidation. However, there was no clear relationship between OMP removal efficiency and microbial

**Abbreviations:** BMIT, biotransformer metabolite identification tool; BMPT, biotransformer metabolite prediction tool; CL, confidence level; FC, fold change; FISH, fragment ion search; IS-eq. conc. internal standard equivalent concentration; LC HR MS/MS, liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry; MW, molecular weight; MS, mass spectrometry; NTS, non target screening; OMP, organic micro-pollutant; OTU, operational taxonomic unit; PC, parent compounds; RSF, rapid sand filter; RT, retention time; TP, transformation product.

\* Corresponding author.

E-mail address: [andrea.brunner@kwrwater.nl](mailto:andrea.brunner@kwrwater.nl) (A.M. Brunner).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127630>

0045-6535/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

community composition. The innovative combination of quantitative analyses, NTS and NGS allowed to characterize real scale biological water treatments, emphasizing the potential of bio-stimulation applications in drinking water treatment.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. OMP removal in drinking water treatment with biological filtration processes

Organic micropollutants (OMPs) cover a large and diverse number of compounds such as pharmaceuticals, pesticides, personal care and industrial waste products as well as their transformation products (TPs). They have been detected in the lower ng/L - µg/L range in several drinking water sources in the Netherlands, Belgium, and worldwide (de Jongh et al., 2012; Wilkinson et al., 2017). Commonly applied treatment processes for OMP removal are membrane filtration, (advanced) oxidation techniques and/or activated carbon filtration. Although these processes are effective for a wide array of compounds, they are also energy intensive and require the use of chemicals.

Biological processes such as riverbank filtration, dune filtration, rapid and slow sand filtration and activated carbon filtration (ACF) may be a promising alternative with respect to their ability to remove OMPs without extensive demand for energy and chemicals (Abu Hasan et al., 2020; Alidina et al., 2014a; Bertelkamp et al., 2017; Vandermaesen et al., 2016; Zearley and Summers, 2012). A further advantage of these biological processes are that they are present in existing drinking water treatment plants. Rapid sand filters for example have the additional advantage that they are often already present in conventional drinking water treatment plants to remove (in)organic compounds and residual particles remaining after upstream processes such as aeration or coagulation/sedimentation (Cakmakci et al., 2008; Clasen, 1998; Gude et al., 2018). Although not specifically designed for the removal of OMPs, RSFs seem to have the capability to (partially) degrade a number of different OMPs (Hedegaard and Albrechtsen, 2014; Shimabuku et al., 2019; Zearley and Summers, 2012). For instance, Zearley and Summers (2012) investigated OMP removal in a laboratory-scale column filled with sand from a full-scale drinking water treatment plant. More than 30% of OMPs dosed into the feed of the column were degraded by more than 50%. Also, Hedegaard and Albrechtsen (2014) demonstrated the removal of the specific OMPs MCP, bentazone, glyphosate and *p*-nitrophenol in microcosms with sand obtained from three different full-scale groundwater filters, and Shimabuku et al. (2019) the removal of MIB and 2,4-D in a column filled with sand obtained from a full-scale bio-filter. Although these studies demonstrated the capacity of RSFs to remove OMPs, they were limited to laboratory-scale set-ups and used synthetic feed water. Since substrate concentration and composition has been reported to play an important role in shaping the microbial population and thus OMP removal (Alidina et al., 2014b), it remained to be shown how well the results of these lab-scale studies would translate to full-scale RSFs.

### 1.2. Microbial populations in RSF

Previous studies indicated that OMP removal could vary between different types of biological filtration processes, as well as between similar filters of different drinking water treatment plants (Bertelkamp et al., 2017). Since a number of studies have reported

that for most OMPs biodegradation is the most important removal mechanism (Bertelkamp et al., 2014; Maeng et al., 2011b; Regnery et al., 2015), it is likely that the differences in OMP removal efficiency are caused by differences in the microbial population present in these systems. Although knowledge about the microorganisms involved in OMP removal is limited, bacterial genera such as *Rhodococcus*, *Acidovorax*, *Mesorhizobium*, *Sphingomonas*, *Chryseobacterium*, *Methylophilus*, *Mesorhizobium*, *Termonas*, *Paracoccus*, *Bacillus* (species *B. thuringiensis*), *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* have been shown to degrade certain OMPs, such as pesticides, PCBs, and PAHs (Jabeen et al., 2015; Keum et al., 2006; Kumar et al., 2012; Mandal et al., 2013; Ning et al., 2010; Ohtsubo et al., 2006; Poonthiripun et al., 2006; Tu et al., 2011; Yam et al., 2010; Zhang et al., 2011). In addition, ammonia oxidizing bacteria (AOBs) have been reported to play an important role in the degradation of OMPs in wastewater treatment processes (Margot et al., 2016; Park et al., 2017). However, these studies used other inocula than RSF and were mostly limited to laboratory-scale studies. The microbial community composition of RSFs in relation to OMP removal thus remains largely unknown.

### 1.3. Transformation product formation

OMP concentrations in source water for drinking water production are usually in the ng - µg/L range. Since these concentrations are probably too low for bacteria to use them as a sole carbon source for growth, it is likely that (part of the) OMPs are co-metabolically degraded, resulting in TP formation (Alidina and Li, 2014) (Alidina et al., 2014b; Maeng et al., 2011a; Rauch-Williams et al., 2010). Biodegradation of OMPs resulting in the formation of transformation products (TPs) has become a concern in drinking water treatment since the number of TPs and their molecular structure are often unknown, and TP toxicity can be similar or higher than the parent compound's (PC) (Li et al., 2017).

Several studies have described TP formation during wastewater treatment and their environmental risk assessment (Bletsou et al., 2015; Schollée et al., 2018; Schymanski et al., 2015). However, studies on TP monitoring in drinking water treatment are limited; they mainly focused on abiotic drinking water treatment processes such as advanced oxidation and laboratory scale experiments (Brunner et al., 2019; Hübner et al., 2015; Postigo and Richardson, 2014). Whereas biological processes have been shown to (partially) remove OMPs, possible TP formation during these drinking water treatment processes remains to be elucidated (Benner et al., 2013).

A major challenge in identifying TPs in drinking water treatment is the low concentration of both PCs and TPs in full-scale studies. Moreover, there is not necessarily a one-to-one relationship between PC decrease and TP formation, one PC can form multiple TPs and also the same TP can be formed from various PCs. Additionally, also partial PC removal can cause an increase of a TP to a low, but toxicologically relevant concentration. To avoid these challenges, studies typically focused on laboratory experiments at elevated concentrations (Brunner et al., 2019; Kaiser et al., 2014) which might be less representative for full-scale operated drinking water treatment processes. However, only full-scale experiments that

monitor PC removal and TP formation can provide information on the actual potential of RSFs for drinking water treatment.

#### 1.4. Non-target screening for the identification of unknown unknowns

As the TPs' molecular structures are often unknown, their identification requires an analytical method of detection that can identify compounds for which no previous knowledge is available, such as non-target screening (NTS) based on liquid chromatography (LC) coupled to high-resolution tandem mass spectrometry (HR MS/MS). NTS allows the analysis of target compounds suspects, i.e. compounds that are expected to be present in a sample and unknown compounds in a single analytical run (Bletsou et al., 2015). However, as a single run can result in thousands of so called features, i.e. mass and retention time pairs associated with a signal intensity, a prioritization step is needed to limit the number of unknown peaks to be identified (Schollée et al., 2018).

The computational workflows to prioritize TPs from NTS data follow two general strategies; the first is a true NTS strategy that considers all detected features and treats them based on temporal, spatial, or process-related connections (Bletsou et al., 2015; Schollée et al., 2016). The second strategy is based on suspect screening and relies on the prediction of possible TPs through computational tools (Djombou-Feunang et al., 2019; Ellis et al., 2008; Li et al., 2017). The predicted potential TPs from a suspect list can then be searched for in the NTS data, based on accurate mass matches. Finally, with both strategies, the structures of the prioritized features, i.e. potential TPs, are elucidated based on the match of mass spectrometric information of the full scan (MS1) and fragmentation spectra (MS2), using spectral libraries or *in silico* fragmentation tools (Hollender et al., 2017). While workflows combining both strategies have been described previously for full-scale waste water treatment plants and lab-scale drinking water treatment processes, to date they have not been applied to full-scale drinking water treatment.

## 2. Objectives

Insight in the OMP removal capacity of full-scale RSFs, including the formed TPs and the microbial species involved is needed to understand why certain OMPs are removed or partially degraded while others persist in similar biological filtration processes. Based on this information OMP removal in RSFs could then be optimized.

This study investigated OMP removal, TP formation and microbial community composition and the interdependencies of the three in seven full-scale RSFs from drinking water treatment plants in The Netherlands and Belgium. All investigated RSFs use surface water as a source. OMP removal was assessed for 127 OMPs based on quantitative suspect screening. Based on the NTS analysis, OMP removal and TP identification was achieved through a combined data-driven approach that used feature intensity profiles for prioritization and suspect screening for PC identification, TP prediction with the prediction tool BioTransformer, suspect screening for predicted TPs and structural elucidation of suspect TP matches. Ultimately, based on occurrence and abundance, microbial communities were linked to target and NTS data for a comprehensive characterization of RSF based water treatment.

## 3. Materials and methods

### 3.1. Rapid sand filter locations and sampling

Seven RSFs from different full-scale drinking water treatment plants, using surface water as source water, in The Netherlands and

Belgium (operational parameters provided in Table SI 1) were sampled in May 2018, during two consecutive days. Influent water, effluent water and filter medium from the top of the filter-bed were sampled at all RSFs. At each drinking water treatment plant, the filter with the longest run time was selected because of expected highest and stable biomass concentrations. For sampling of the filter material, the filter was temporarily taken out of operation and the water level was lowered to the height of the filter bed. About 1 kg of the filter material, the top layer of the RSF (including the Schmutzdecke), was sampled using a stainless steel beaker which was flushed with drinking water, disinfected with chlorine and flushed again with drinking water before each sample was taken. The filter material was transferred to a sterile bottle and kept on ice until the analyses were performed within 24 h. Microorganisms were released from the filter material by low energy sonification with 40 kHz for 2 min in sterile, unchlorinated drinking water (sterilization by autoclave) (Magic-Knezev and van der Kooij, 2004). For LC-HRMS analyses, 1 L of influent and effluent water was sampled in dark glass bottles flushed with distilled water. To determine the microbial community composition, 2 L of influent and effluent was sampled in sterile bottles and kept on ice until further analyses, which were performed within 24 h.

A second sampling campaign was performed in September 2018 to assess OMP removal rates. Since the results were largely similar to those of May 2018, only the latter are discussed in this paper.

### 3.2. LC-HRMS analyses and quantitative suspect screening

NTS based on LC-HR MS/MS was carried out as described previously (Brunner et al., 2020) with the distinction that the mass range in the full scan was 80–800 *m/z* for acquisition. Suspects were quantified by means of a one-point calibration using the Xcalibur data processing program (ThermoFisher Scientific). Suspect calibrants used for quantification are listed in Table SI 3. OMP removal was defined based on influent OMP concentrations; at influent OMP concentrations less than 0.1 µg/L at least 50% of the OMP had to be removed, and at influent OMP concentrations larger than 0.1 µg/L at least 30% of the OMP had to be removed. However, this definition might underestimate the OMP removal efficiencies.

### 3.3. Molecular fingerprints, biodegradability and hydrophobicity of detected OMPs

OMP detected with the quantitative suspect screening were clustered based on their molecular fingerprints, i.e. mathematical representations of the structures of the molecules. The extended versions of path-based hashed molecular fingerprints which take into account rings systems were used in the R package "rcdk". The fingerprint similarity was calculated based on the Tanimoto distance using the R package "fingerprint".

Biodegradability was predicted using the biodegradation probability program (BIOWIN) and two different models (a) non-linear model prediction and (b) ultimate biodegradation timeframe prediction according to the European technical guidance on risk assessment (European Commission, 2003). An OMP was considered *Readily Biodegradable* if the probability from model a) was >0.5 and the persistence scoring from model b) was >2.2.

### 3.4. NTS data analysis

LC-HRMS/MS data was analysed in Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA), including peak picking, feature building, and MS1 and MS2 based suspect screening. The summary of data processing parameters and Compound Discoverer 3.0 settings are reported in the SI (Table SI 2). The feature output,

i.e. mass and retention time pairs with intensities reported as area under the curve for every sample, was imported into R for further data analysis. Principal Component Analysis (PCA) was performed using the R package “FactoMineR” (Lê et al., 2008). Statistical differences between feature intensities of influent and effluent samples were assessed with the Student’s t-test using the R package “Stats”. The difference was considered statistically significant if the p-value was <0.05.

To reduce feature numbers, features a) which did not have an associated MS2 spectrum, b) to which no elemental formula was assigned in Compound Discoverer or c) that did not exceed at least 10x the blank signal intensity in any sample were removed prior to suspect screening.

### 3.5. Workflow for the identification and structural elucidation of transformation products in NTS data

A data-driven workflow was developed for the identification of TPs based on feature treatment profiles and TP prediction, followed by a wide-scope suspect screening, exceeding the quantitative screening described in 2.2. The workflow is schematically depicted in Fig. 1 and consists of three main phases: 1) PC identification (blue squares), 2) TP prediction (green ellipse) and 3) TP identification (green squares). Lists of PCs detected with the quantitative (trapeze and red font) and the wide-scope suspect screening (squares) were both used to predict TPs to evaluate the advantage in using NTS data for the selection of PCs.

#### 3.5.1. Parent compound identification

PC identification was performed with a wide-scope suspect screening in Compound Discoverer. To this end, NTS features were searched for matches in monoisotopic mass (MS1) and - if available - fragmentation spectra (MS2) in different databases in the following order of priority: 1) in-house suspect list of the 127 water relevant chemicals that were also quantified (Table SI 3, MS1 and MS2 based identification); 2) the mass spectral library mzCloud (www.mzcloud.org, MS1 and MS2 based identification); 3) the chemical structure databases EAWAG Biocatalysis/Biodegradation Database, EPA DSSTox, and EPA Toxcast via ChemSpider (MS1 based identification (Little et al., 2012)).

For features that matched a suspect, their concentration relative to the internal standard (IS) atrazine-d<sub>5</sub> was calculated and

expressed as Internal Standard equivalent concentration (IS-eq conc.).

$$IS\ eq\ conc. = \frac{A_f}{A_{IS}} \cdot C_{IS} \tag{1}$$

where A<sub>f</sub> is the peak area of the unknown feature, A<sub>IS</sub> is the peak area of the IS (atrazine-d<sub>5</sub>) and C<sub>IS</sub> is the concentration of IS spiked in each sample (1 µg/L).

The change in the intensity between influent and effluent samples was determined and expressed as base-2 logarithm of the fold change (log<sub>2</sub>FC).

$$\log_2FC = \log_2 \frac{A_E}{A_I} \tag{2}$$

where the fold change between influent and effluent (FC) is expressed as base-2 logarithm of the ratio of peak area of the feature in the effluent (A<sub>E</sub>) and in the influent (A<sub>I</sub>). The log<sub>2</sub>FC is negative if the intensity of the feature decreases during the treatment (removal) and it is positive if the intensity increases (formation). Identified suspects were classified as PCs if they met the following criteria:

- a) the influent IS-eq conc. exceeded 10 ng/L in at least one location;
- b) a minimum removal of 10% which corresponds to a log<sub>2</sub>FC smaller than -0.152 was observed in at least in one location.

For all features classified as PCs, feature identification was attempted using MS1 and MS2 information. A confidence level (CL) for the confidence of the identification according to Schymanski et al. (2014) was assigned through visual inspection of the match between experimental fragmentation spectra and *in silico* predicted spectra through Fragment Ion search (FISH) coverage calculation in Compound Discoverer. The five defined CLs range from the highest level of confidence CL1, at which the chemical structure is confirmed with a reference standard, to CL5 the lowest level at which merely the exact mass of the compound is known. CL3 refers to one or more tentative suspect candidates, CL2 to a probable structure by library or diagnostic evidence. Both are assigned based on MS1 and MS2 information. If CL3 or 2 was reached by more than one suspect candidate, all candidates were

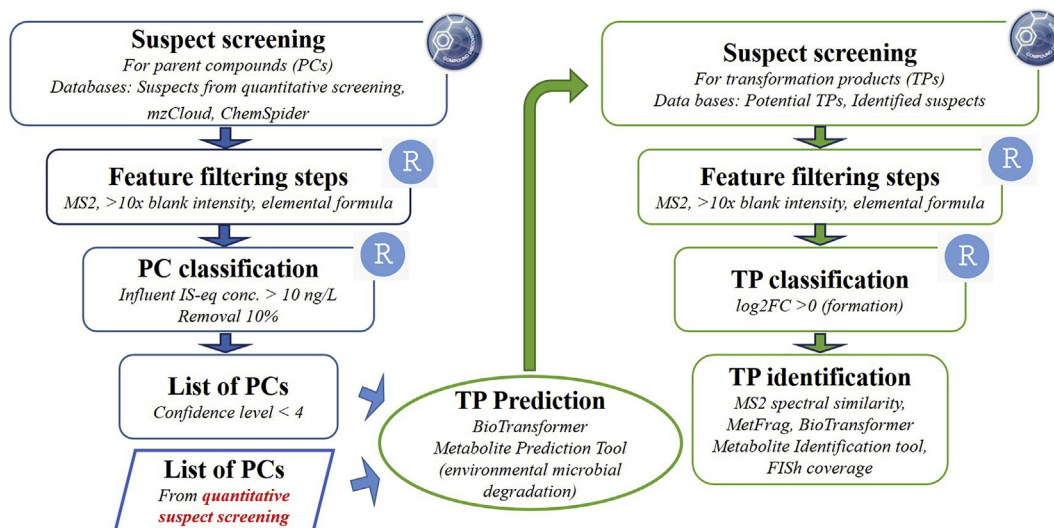


Fig. 1. Workflow for TP identification from NTS data.

used in the TP prediction step. For PC features for which a corresponding TP was detected, further steps to confirm the identification were performed, following the same procedure described in section 2.5.3.

### 3.5.2. Transformation product prediction

Prediction of TPs was performed using the environmental microbial module of the metabolism prediction tool (BMPT) in BioTransformer, an open access web service for *in silico* metabolism prediction and metabolite identification (Djombou-Feunang et al., 2019). The TPs of the OMPs previously defined as PCs were predicted using the SMILES of the PCs as input and a set of rules provided by the EAWAG-BBD/PPS system for prediction (Ellis et al., 2008). The resulting suspect list of predicted TPs consisted of an elemental formula, monoisotopic mass and International Chemical Identifier (InChI) as structural identifier. The name used to identify the molecules was defined merging the CAS of the PC and the metabolite ID proposed by BioTransformer (e.g. 116,459-29-1-BTM00004).

### 3.5.3. Transformation product identification

TP identification was achieved through a second suspect screening of the NTS data. The suspect list consisted of both the identified suspects and the TPs predicted with BioTransformer. Matched features were filtered for increasing intensity from influent to effluent, i.e. positive log<sub>2</sub>FC, which indicates TP formation in at least one location. To increase the level of confidence of identification (Schymanski et al., 2014), the metabolite identification tool (BMIT) was used in BioTransformer; BMIT performed the metabolite identification based on PubChem suspect screening using as input the chemical structure of the starting molecule (the PC) and the mass or molecular formula of the metabolite (obtained from BMPT). To structurally elucidate the detected suspects, their fragmentation spectra were compared to mzCloud library and/or *in silico* spectra generated with MetFrag (Ruttkies et al., 2016) and Compound Discoverer FiSH. To confirm the tentatively identified TPs, comparison with the mass and retention time (RT) of a reference standard was performed. Furthermore, the spectral similarity between PC and TP spectra was calculated using the R package "OrgMassSpecR" (<http://OrgMassSpec.github.io/>). Head-to-tail plots of the mass spectra were generated and a similarity score was calculated as the dot product between the aligned intensity vectors of the two spectra.

### 3.6. DNA extraction and microbial community analysis

After sampling, influent and effluent water, sonicated filter material as well as negative control samples consisting of ultrapure water were filtered over 0.2 µm polycarbonate filters (Sartorius) and stored at -20 °C until further processing. DNA isolation was performed with the DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. For DNA amplification, the V4 variable region of the 16S rRNA genes was amplified from all samples, commercially available Mock communities (Zymo research, Irvine, CA) and negative controls with primers 515 F and 806 R (Caporaso et al., 2010) using the KAPA Hifi polymerase (KAPABiosystems). The DNA concentrations of PCR products were measured using QuBit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and amplicons were barcoded, pooled in equimolar DNA concentrations and sequenced on an Illumina MiSeq platform according to the manufacturer's instructions, with 20% PhiX Control v3 (Illumina, San Diego, CA). From the raw sequence data (2 × 250 bp paired-end reads), quality-filtered sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) with a 97% identity cut-off using the mothur pipeline (Schloss et al., 2009). Taxonomic identification was

performed against the Silva SSU 16S rRNA gene database (version 132; Quast et al., 2013) and only prokaryotic reads were retained in the dataset. Data analysis was performed in R studio version February 1, 1335 (R studio Inc., Boston, MA) using the R package "Ampvis2" (Andersen et al., 2018).

### 3.7. Correlation analysis between OTUs and micropollutant increase or decrease

Correlations between individual OTU abundance and NTS features were assessed using correlation analysis. To limit noise and false positives for inclusion, OTUs were required to have >0.15% total read abundance in at least one sample and at least 25% of this amount in at least two other samples. In addition, OTUs were filtered for positive Spearman correlation of at least 0.8 with any measured feature in the influent.

NTS features were filtered based on their difference between influent and effluent of RSF locations. Features with less than 10 ng/L IS-equivalent intensity difference between the highest and lowest decrease in RSF locations were omitted. In addition, NTS features that did not have a difference of 15% of that value in at least two separate RSF locations were also omitted.

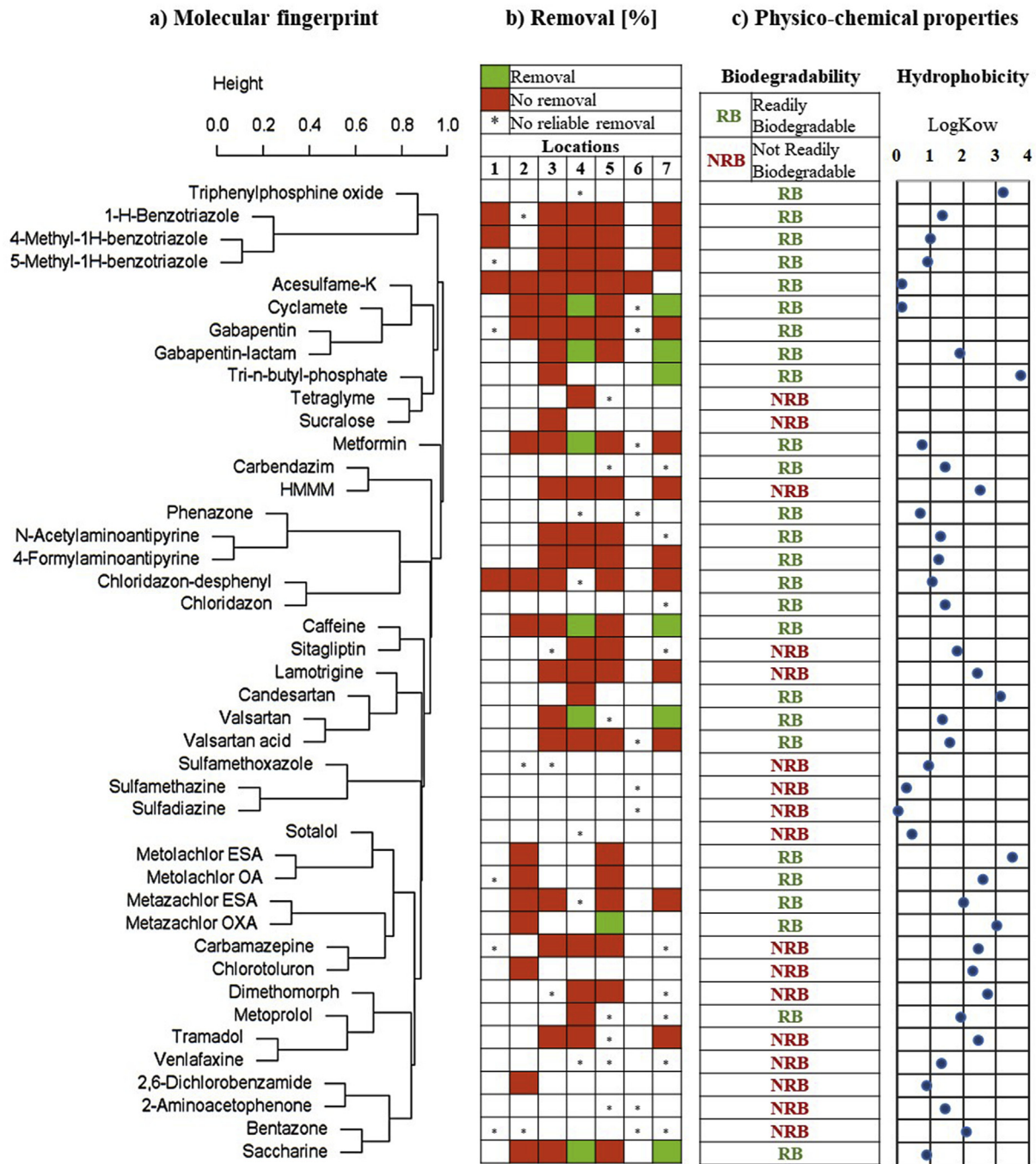
A Spearman correlation between the feature intensity difference between influent and effluent and OTU abundance was calculated for each possible pair of selected NTS feature and OTU over all 7 RSF locations. Pairs of features and OTUs with a correlation (negative or positive) of at least 0.9 were selected. This correlation is stricter than used in the selection criteria for OTUs, because we want to limit noise as much as possible. For the NTS features of correlated pairs, feature peak shape was manually assessed and noise features introduced by faulty peak picking discarded. MS2 information based identification was attempted for the NTS feature of the remaining pairs.

## 4. Results and discussion

### 4.1. OMP removal in full-scale rapid sand filters in The Netherlands and Belgium

Since the source waters and process configurations were different between the seven RSF locations, the initial OMP levels and the resulting OMP removal rates varied significantly (Table SI 6). Most OMPs (97 of 127 OMPs) were not detected in the influent water, the other 30 OMPs were detected in the influent waters and 8 of these OMPs showed a substantial removal (Fig. 2) in one of the full-scale RSFs (corresponding to 27% of the detected OMPs). Corresponding to these results from May 2018, similar OMP removal rates were detected in a second sampling round in October 2018 (Table SI 6). These findings confirm the results of other studies that demonstrated OMP removal in laboratory-scale RSF (Hedegaard and Albrechtsen, 2014; Shimabuku et al., 2019; Thomas L. Zearley and Summers, 2012). It should be noted that the results of the current study do not reflect the full OMP removal potential of the RSFs, since removal of OMPs that are not detected in the influent or only in very low concentrations cannot be assessed. The true OMP removal potential of RSFs might thus be higher.

In the influent of locations 1 and 6, 10 or less OMPs could be detected on average. A possible explanation is the source water of the drinking water treatment plant and the position of the RSF in the treatment plant configuration. The RSF of location 1 is preceded by river bank filtration, a process known to be able to degrade a wide variety of OMPs (Hamann et al., 2016). The RSF of location 6 is fed mainly with surface water from a protected area, for which the OMP concentration and the number of OMPs is expected to be lower than for most surface waters. The influents of locations 4, 5



**Fig. 2.** OMPs detected in RSF through suspect screening. A) OMPs clustered based on molecular fingerprint; b) OMP removal in the different RSFs; c) OMP properties: and biodegradability (BIOWIN) and octanol-water partition coefficient (LogKow) (Chemistry Dashboard, OPERA model). Red: OMP not removed. Green: OMP removed (OMP removal considered to be substantial if (1) at influent OMP concentrations of <0.1 µg/L at least 50% of the OMP was removed, or 2) if, at influent OMP concentrations of >0.1 µg/L, at least 30% of the OMP was removed.) White with \*: OMP detected in influent, but no reliable removal could be demonstrated. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

and 7 were characterized by the highest number of OMPs (29, 30 and 27 OMPs, respectively). This could be expected since these RSFs are located closest to the water intake and are only preceded by coagulation/sedimentation having a minor effect on OMP removal. In addition, RSFs 4 and 7 also removed most of the OMPs.

Two categories in OMP removal by RSFs are distinguished: 1) OMPs that are removed, and 2) OMPs that were not removed. In addition, it should be mentioned that some OMPs were detected in the influent but in concentrations close to the detection limit

(white boxes with \* in Fig. 2). This means that a reliable removal could not be demonstrated, but it cannot be stated that the filter is not able to remove these OMPs.

Several OMPs belonged to the first category and were biologically degraded by the RSFs: metformin, cyclamate, tri-*n*-butyl-phosphate, gabapentin-lactam, saccharin, metazachlor-OXA, valsartan and caffeine. Cyclamate, gabapentin-lactam, saccharine, valsartan and caffeine show considerable removal in two RSF (location 4 and 7). This is in line with a number of studies that



demonstrated removal of these compounds in biological processes. Caffeine showed good removal in several lab-scale drinking water filter processes (Bogunovic et al., 2017; D'Alessio et al., 2015). Tran et al. (2015) demonstrated removal till below the detection level for saccharine and cyclamate after biological treatment (Modified Ludzack-Ettinger (MLE) process) followed by conventional sedimentation or MBR in a full-scale waste water treatment plant. Hermes et al. (2019) reported high removal (70–99%) of saccharine, gabapentin-lactam, valsartan and caffeine in a laboratory-scale sequential biofiltration system. This is in contradiction to Foolad et al. (2015) who reported limited removal (12–15%) of saccharine and cyclamate in laboratory-scale soil columns. These discrepancies are most likely caused by differences in the experiment set-up (e.g. water quality, filter media).

Other OMPs such as metformin, tri-*n*-butyl-phosphate and metazachlor-OXA showed considerable removal at one of the locations, but persistent behaviour at other locations. It is possible that only the microbial population in the filters at this specific location was capable of expressing the appropriate enzymes, but further research is required to confirm this hypothesis. While the biological removal of metformin in waste water treatment plants has been reported in several studies (Briones et al., 2018; Poursat et al., 2019; Zeng et al., 2015), studies investigating metformin removal in drinking water treatment plants are limited. Scheurer et al. (2012) demonstrated with laboratory-scale batch tests that, in contrast to chlorination, flocculation and activated carbon filtration (bacteria inactivated with sodium azide) were ineffective for metformin removal. By monitoring full-scale waterworks they showed that riverbank filtration and artificial recharge could completely remove metformin. This contradicts with other studies reporting effective metformin removal in batch experiments representative of GAC filtration in a drinking water treatment plant (Piai et al., 2020). The differences in metformin removal with activated carbon can be attributed to the use of sodium azide in the study of Scheurer et al. (2012) which created abiotic conditions in the filter.

Nakamura et al. (1991) reported some removal of tri-*n*-butyl-phosphate in a conventional waste water treatment plant and effective removal with powdered activated carbon, but no removal with dune infiltration or standard drinking water treatment techniques such as settling/coagulation/flocculation/rapid sand filtration (Sheldon and Hites, 1979).

To the best of the authors' knowledge this is the first study that demonstrates metformin and tri-*n*-butyl-phosphate removal in a full-scale RSF of a drinking water treatment plant.

A number of OMPs were placed in the second category: acesulfame-K, 1-*H*-benzotriazole, 4-methyl-1*H*-benzotriazole, 5-methyl-1*H*-benzotriazole, valsartan acid, metformin and HMMM. These OMPs were detected in the influent of four or more of the RSFs but did not show considerable removal in these filters. Acesulfame-K, 1-*H*-benzotriazole, 4-methyl-1*H*-benzotriazole, 5-methyl-1*H*-benzotriazole and HMMM did not show removal in any of the investigated filters. The persistence of acesulfame-K is in line with its use as anthropogenic marker (Kahl et al., 2018). This suggests that some OMPs cannot be biologically degraded in RSFs. However, there are also studies demonstrating acesulfame-K can be biodegraded (Castronovo et al., 2017; Hellauer et al., 2018; Kahl et al., 2018). This shows that OMPs that are not removed in a RSF (or in a biological process in general) are not necessarily persistent, but cannot be degraded under the prevailing conditions.

Besides variations in OMP removal capacity between different RSFs, there were also large differences in the type of OMPs removed within the RSFs. However, these differences could not be explained by the molecular structure of the OMP, expressed as extended molecular fingerprints. No clear trends could be observed between

removal and OMP structure, hydrophobicity and predicted biodegradability, see Fig. 2. This suggests that filter-specific conditions such as influent water quality, filter layout, operational conditions and microbial communities present in the filter lead to differences in OMP removal efficiencies.

#### 4.2. Monitoring of changes in water quality in full-scale rapid sand filters in The Netherlands and Belgium based on NTS data

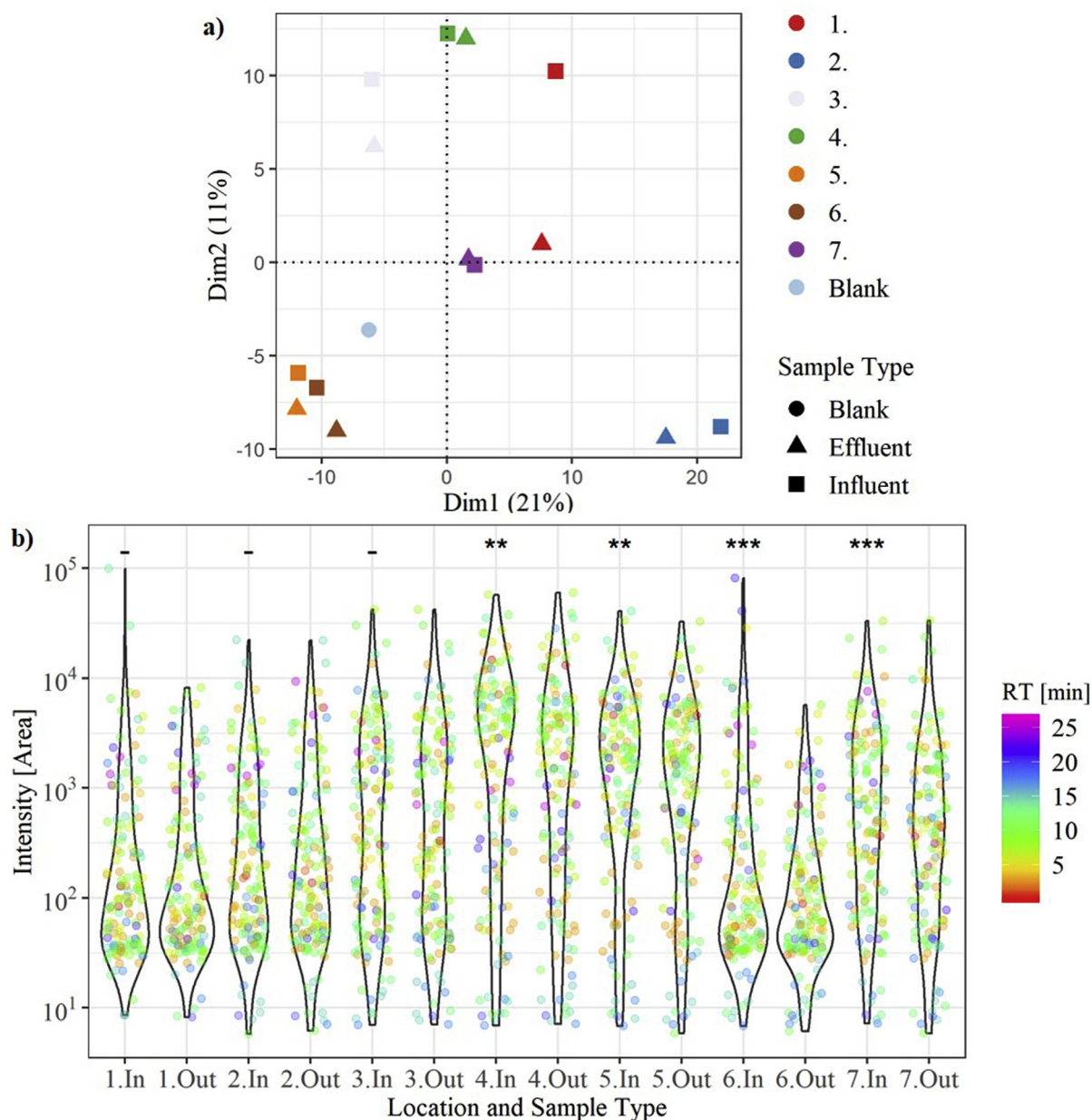
In total, 534 features were detected in the NTS data across all samples. For most RSFs, differences in features between influent and effluent samples were smaller than those between the production locations, as revealed by the PCA visualized in Fig. 3a. This is in agreement with the microbial data from the same samples (section 3.4). Overall, features were characterized by low signal intensities, confirming the low contamination level of the samples detected with the target analyses (Fig. 3b). Both the highest (feature area  $\sim 1 \times 10^5$ ) and lowest feature intensities were detected at locations 1 and 6. The intensity of most features at these locations were below 100. Locations 4 and 5 showed many features with high signal intensities. At locations 1, 2 and 3, the distribution of the feature intensities between influent and effluent was not statistically different ( $p$ -value  $> 0.05$ ; Student's  $t$ -test), suggesting that these RSFs do not significantly change the OMP concentrations. This is in line with the quantitative data. In contrast to locations 1, 2 and 3, locations 4 to 7 showed a significant difference between influent and effluent samples ( $p$ -value  $< 0.01$ ). RSFs at locations 4, 5 and 7 are treating surface water that has not been extensively pre-treated. This water seems to contain OMPs that have a high biodegradation potential, as these are partially removed by the RSFs. In contrast, location 6 receives water from a protected area with low OMP concentrations, as illustrated in Fig. 2 for the quantified target OMPs. Correspondingly, the NTS feature intensities of this water were overall low, with most feature intensities ranging from  $10^1$  to  $10^2$  (Fig. 3b). However, while the concentrations of the target OMPs in the feed were too low to determine removal, the NTS data did reveal a significant decrease in feature intensities between influent and effluent water. This interesting finding stresses the importance of NTS for comprehensive monitoring of chemical water quality changes induced water treatment steps. An increase in the number of low intensity features in the effluent was also observed in locations 5 and 7, graphically represented by a downward shift of the effluent distribution (Fig. 3b). At all locations, the lowest intensities were found for hydrophobic features, i.e. at a RT of around 20 min (dark blue points). Interestingly, the most abundant intensities, i.e. the intensity range that most features exhibited in a given sample which differed by sample, were found at a RT of around 10 min (green points).

##### 4.2.1. Detection of parent compounds and transformation products

Of all 534 detected NTS features, 90 exceeded an IS-eq conc. of 10 ng/L in at least one influent sample, and at the same time showed 10% removal during the treatment. These features were classified as PC (as showed in Fig. 4b). Using the same criteria, 14 of the 127 OMPs that were quantified with the suspect screening were defined as PCs.

444 and 63 TPs were predicted from the NTS and suspect screening PCs, respectively, using BioTransformer. 140 NTS features showed an increasing intensity from influent to effluent in at least one location. 15 of these matched the suspect list of predicted TPs based on accurate mass. Only one of the NTS features matched the TP suspect list predicted from the quantitative PCs, emphasizing the importance of NTS to monitor TPs.

The list of detected TP features is reported in Table 1. The first



**Fig. 3.** a) Score plot of the two main PCA dimensions of the NTS features. Samples are colored according to their location and shaped according to the sample type; b) Distribution of feature intensities detected in influent and effluent samples of RSF per location, colored based on RT. The p-values between influent and effluent obtained with the Student's t-test are indicated by \* for <0.05 significance and \*\* for <0.01 \*\*\* < 0.0001. – indicates no significant difference.

row of the table contains the feature which matched TP suspect lists from both target and non-target screening (feature ID: 267.18,335/9.2).

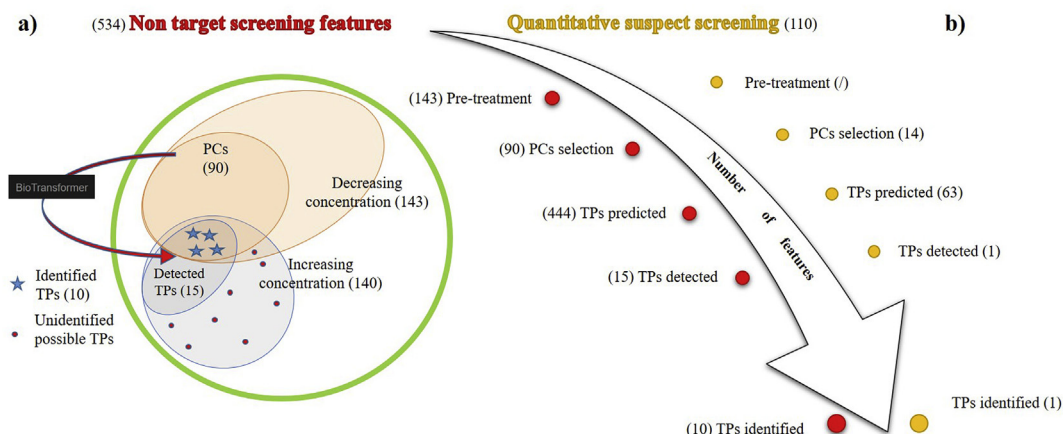
**4.2.2. Structural elucidation of transformation products and their parent compounds**

Through the identification step of the developed workflow, a CL, structure and name were assigned to both TPs and PCs. As highlighted in Table 1, ten out of fifteen features were identified with a confidence level range from 1 to 3, and then considered successfully identified: two features were identified with CL equal to 1, five with CL 2 and three with CL 3 (the other five features were identified with CL ≥ 4).

Eight of these features were known compounds; their structures were listed in one of the used databases, i.e. mzCloud, EAWAG

Biocatalysis/Biodegradation Database, EPA DSSTox, EPA Toxcast and/or PubChem. For the remaining two features, named 2372-82-9-BTM00001 and 120,013-45-8-BTM00001, the experimental spectra matched the *in silico* predicted structures proposed by BMPT (CL = 2). However, these compounds were missing from all databases and no information could be found in the literature. Details on the identification parameters for confidence level determination for TPs and PCs are provided in SI (Tables SI 4 and SI 5).

Five out of the ten identified TPs could be linked to their PCs. For the other five, the fragmentation spectrum of the TP feature achieved a better match with the spectral library or *in silico* predicted spectrum of another compound than that proposed by BMPT. For instance, feature 245.11631/7.09 was identified as N-Acetylaminopyrine with CL1, based on the comparison of its mass and



**Fig. 4.** a) Venn diagram: logical relations between the steps of the proposed workflow. b) Application of the proposed workflow to the experimental dataset obtained in wide-scope and quantitative suspect screening, reported in the left and right side of the figure respectively. The number of features or compounds selected in each step are given in brackets.

**Table 1**

List of the proposed elemental formulas and structures of the detected TP features derived from the prediction with Biotransformer, and their corresponding parent compounds (if detected). The asterisk indicates the feature was predicted from both quantitative suspect screening and NTS. CL = confidence level; RT = retention time; MW = molecular weight.

Transformation Products					Parent Compounds				
FeatureID (MW / RT)	Formula	CL	Structure	Proposed name	FeatureID (MW / RT)	Formula	CL	Structure	Proposed name
267.18335 / 9.2*	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	1		Metoprolol	/	/	/	/	/
245.11631 / 7.09	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1		N-Acetylaminoantipyrene	/	/	/	/	/
298.29815 / 12.61	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O	2		2372-82-9-BTM00001	299.33003 / 12.619	C <sub>18</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub>	2		Laurylamine dipropylenediamine
139.09953 / 13.041	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO	2		Tropinone	141.11517 / 11.724	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO	2		Tropine
236.116 / 5.091	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2		Phe-Ala	/	/	/	/	/
349.20439 / 17.402	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>	2		120013-45-8-BTM00001	363.22002 / 18.529	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>2</sub>	2		Dehydrodeoxy donepezil
169.11015 / 8.457	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	2		(2S,3aR,7aS)-Octahydro-1H-indole-2-carboxylic acid3	/	/	/	/	/
267.147 / 6.96	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	3		Atenolol acid or Metoprolol acid	/	/	/	/	/
192.12621 / 5.094	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	3		(S)-2-amino-N-ethyl-3-phenylpropionamide	236.116 / 5.091	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2		Phe-Ala
141.11517 / 11.724	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO	3		Tropine	289.16775 / 10.108	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	2		Atropine
139.09953 / 7.441	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO	4		1-cyclopropyl-4-piperidone	/	/	/	/	/
662.19414 / 14.693	C <sub>34</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S	4	/	/	/	/	/	/	/
201.1729 / 10.52	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>	4	/	/	/	/	/	/	/
187.15703 / 7.586	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	4	/	/	/	/	/	/	/
265.18892 / 10.44	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	4	/	/	/	/	/	/	/

retention time to those of a reference standard, and the high spectral similarity with the corresponding mzCloud entry. The assignment of structures of the three unknown metabolites predicted by Biotransformer, i.e. 14761-40-1-BTM00002, 4875-49-4-BTM00003, and 4875-49-4-BTM00002, to this feature was less

confident (CL  $\geq$  2). Consequently, no link between TP and PC could be established. Moreover, most of the TPs were also selected as PCs. While this may seem like a paradox, it could be due to the varied water sources and water pre-treatments applied resulting in a change of behaviour between the studied RSFs. Alternatively, this

could be related to the interaction of the (mixture of) contaminant and bacterial community.

Lastly, the spectral similarity between PC and respective TP was assessed for the five features that could be linked, expressed as a similarity score and visualized in a head-to-tail plot (Fig. SI 1). The pairs Dehydrodeoxy donepezil - 120,013-45-8-BTM00001, Phe-Ala - (S)-2-amino-N-ethyl-3-phenylpropionamide, and Laurylamine dipropylenediamine - 2372-82-9-BTM00001 showed the highest similarities, with scores of 0.89, 0.48, 0.26, respectively.

For the five features with  $CL \geq 4$ , the *in silico* predicted spectra based on the structure of the predicted TP and the experimental fragmentation spectra did not match. As the structure could not be confirmed, the structures of the predicted TPs were thus rejected, and only an elemental formula could be assigned to the features. Based on the feature intensity trend that is increasing from influent to effluent, these features are assumed to be TPs, however, the associated parent compounds remain unknown.

#### 4.3. Evaluation of the proposed workflow

The feature intensity profiles between influent and effluent samples from full-scale RSFs show that for some features the intensity decreases and increases depending on the treatment facility, which causes an overlap between the PC and TP sets (Fig. 4a). The same compound can thus behave in opposite ways in different filters, as was for instance observed for metoprolol. PCs are expected to be transformed into TPs through a specific process, nevertheless this study showed that the same compound can behave as PC (decreasing intensity during the treatment) or TP (increasing intensity) depending on the RSF. Moreover, the feature intensities and the differences between influent and effluent were overall very low (IS-eq conc. below 0.35  $\mu\text{g/L}$ ) which complicated the identification of TPs and the respective transformation process.

In order to validate the developed workflow, we applied it to the well-studied biotic TP Gabapentin-lactam (Henning et al., 2018). Gabapentin-lactam is a derivative of the anti-convulsant agent Gabapentin which was also present in the PC list. In the NTS data, Gabapentin-lactam was defined as PC because it was detected in the influent sample of location 4 and was removed with 46%. In contrast, at locations 2 and 3 the intensity of Gabapentin-lactam increased in the effluent samples (31% and 19%, respectively). However, the compound was not identified as a TP with the developed workflow as it was not predicted by BMPT as a TP of Gabapentin. This example showed that while BioTransformer is a useful tool, as 10 of the 464 TPs it predicted could be identified in the RSF samples, it cannot be considered comprehensive. Consequently, the performance of the developed workflow is limited by the prediction capacity of BioTransformer; TPs that are not predicted cannot be identified. In Fig. 4a unidentified TPs are represented by red dots.

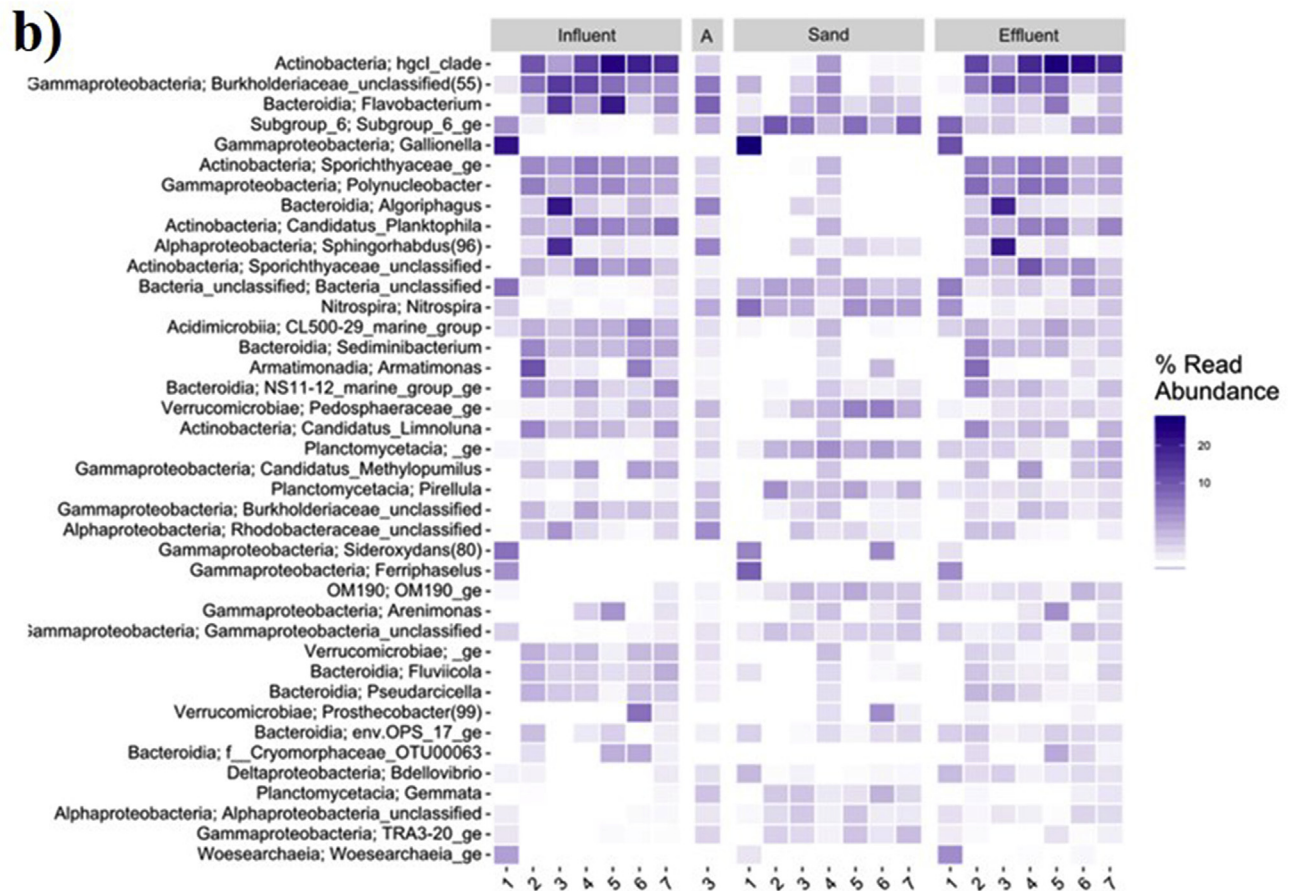
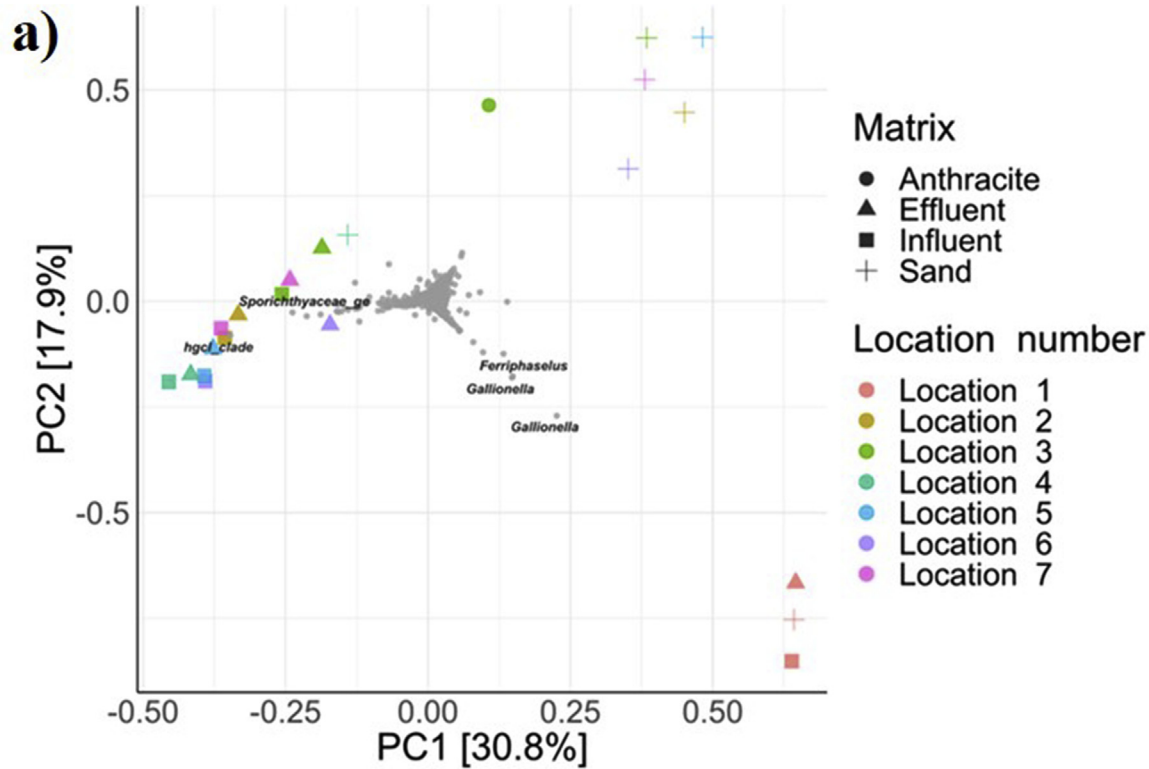
The data-driven workflow presented here, based on the combination of feature intensity profiles between influent and effluent samples and the prediction of biotic TPs, allowed to identify TPs in LC-HRMS based NTS data in full-scale drinking water treatment plants. The structures of 10 of the 15 TPs detected were elucidated with confidence levels ranging from 1 to 3. Among them, 8 TPs were identified as known compounds based on the match of several databases (mzCloud, ChemSpider, Norman network SusDat, PubChem); two of them were novel. The concentration of detected TPs was low, however, an (eco)toxicological assessment is necessary to determine whether these compounds present a risk at these contamination levels. While the developed approach was effective for TP identification in the seven full-scale drinking water treatments, it requires improvement to reduce the manual work for assigning confidence levels based on structural similarity. This is

particularly important when studies include more treatment trains, locations and/or samples with higher levels of contamination, such as samples from wastewater treatment. Moreover, BioTransformer proved to be useful, but not comprehensive for the prediction of possible TPs resulting from a list of PCs.

#### 4.4. Characterization of microbial communities in rapid sand filters

The microbial communities of influent waters, filtration medium materials and effluent waters of all RSFs were analysed using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Results showed that microbial communities of influent and effluent waters were different from the microbial communities in the sand and anthracite filter material at five of the seven locations (Fig. 5). The material of the filter medium selected for a different community composition, probably due to attachment and growth of other microorganisms than those that are dominant in the water phase. Location 1 showed a different microbial community compared to the other locations, possibly because the RSF is preceded by river bank filtration. In this step the RSF is fed with anoxic river bank filtrate. Location 1 also showed a similar microbial community on the filter material and in the influent and effluent of the RSF. This could indicate that the filter material of location 1, that consists of anthracite, is not selecting for a different microbial community due to lack of growth and attachment, as contrary to sand as carrier material.

The dominant OTUs of the microbial communities in most influent water samples from the RSFs were different from the filter media materials in the sand filters and consisted of OTUs that relate, amongst others, to *Actinobacteria* hgcl-clade, *Burkholderiaceae*, *Sporichthyaceae*, *Polynucleobacter*, *Flavobacterium*, "*Candidatus* Planktophilia", *Sediminibacterium*. Bacterial species belonging to most of these groups have been detected in freshwater habitats (Jezbera et al., 2011, 2009; Kang et al., 2014; Lliorós et al., 2014; Newton et al., 2011), which explains their presence in the intake surface waters of the sampled locations. The dominant microbial community on the sand and anthracite materials contained some of the OTUs that were present in the influent, but also OTUs that seemed specific for the media materials, especially for sand as carrier material. These microorganisms were in most cases also present in the effluent of the RSFs, which implied that they were growing on the carrier material and continuously flushed out of the RSF with the water. This has also been observed in other studies on the microbial communities of rapid sand filters (Lautenschlager et al., 2014; Oh et al., 2018; Pinto et al., 2012). The dominant OTUs on these filter media materials entailed bacterial groups that were probably performing nitrification processes such as *Nitrospira* (ammonia/nitrite oxidizer), *Gemmata* (anaerobic ammonium oxidizer; anammox) and other *Planctomycetacia* (class that contains species that perform anammox) such as *Pirellula*. The aerobic ammonium oxidizer *Nitrosomonas*, was only present in the RSFs at locations 1 and 6, suggesting that at most other locations the *Nitrospira* performed complete nitrification alone and belonged to the Comammox bacteria (Daims et al., 2015). This was also found in another study on RSF microbial communities where *Nitrospira* were more overrepresented than *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* (Oh et al., 2018). Previous studies have shown that these Comammox bacteria can be present in RSFs that are used in drinking water treatment of groundwater (Fowler et al., 2018; Tatari et al., 2017). The presence of the anaerobic anammox bacteria seems surprising in fully oxygenated RSFs, but anaerobic microorganisms have been found more often in these systems, suggesting the presence of anoxic microniches (Gülay et al., 2016). For most of the other groups that were dominantly present in the media material of the RSFs, little is known on their occurrence and metabolism. The limited information available suggests that the abundance of *Acidobacteria*



**Fig. 5.** a) Principal component analysis (PCA) that shows Bray-Curtis distance ordination of 16S rRNA gene amplicon sequencing data of all samples of RSF material (sand or anthracite) and influent and effluent waters. The PCA was constructed after removing low abundance OTUs (relative abundance <0.01% in any sample) and Hellinger transformation on the absolute abundances. Data point shapes represent matrix type (sand, anthracite, effluent, influent) and colours represent the location number (see Table SI 1). b) Heatmap of 16S rRNA gene amplicon sequencing data from samples of all locations of the RSFs. Shown are the average relative abundances (%) of the top 40 most abundant OTUs in influent, anthracite (A), sand, and effluent samples from the different locations. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Subgroup 6 appears to be correlated to changes in pH, nutrient and ion concentrations (Kielak et al., 2016). Furthermore, some members of the *Planctomycetes* clade OM190 seem to be distantly related to anammox bacteria and were found to be correlated to dissolved organic carbon (DOC), leading to the speculation that these are major contributors to autotrophic dissolved organic carbon production (Ye et al., 2016) and are possibly associated to macroalgae (Lage and Bondoso, 2014). However, OTUs observed in our study might belong to other bacterial species within these groups and could behave differently than observed in these studies. The media material of the RSF of location 1 did not contain the specific microorganisms that were present in the media materials of other RSFs. *Gallionella*, *Sideroxydans* and *Ferriphaselus* were dominantly present in the samples from location 1. The dominance of these genera was the main difference to all other locations (Fig. 5). These three genera consist of species mostly involved in iron oxidation. The presence of these genera in the RSF at location 1 is not surprising, since these filters are fed with anoxic river bank filtrate which is rich in Fe(II).

Overall, the microbial community composition on sand and anthracite in RSFs differed in most cases from the community composition observed in influent waters, indicating that distinct clades of microorganisms grow on the sand and/or anthracite grains of RSFs. Bacteria were identified that are known to be involved in iron oxidation or nitrification. However, the metabolism of most of the other microorganisms identified in the RSFs remains unknown.

OMP removal efficiencies (Fig. 2) and formation of transformation products (Fig. 3) did not seem to be related to the differences in microbial community composition of the locations (Fig. 5a). This could imply that OMP removal occurred via co-metabolism of the dominant microorganisms present in all RSFs or by members of the microbial communities that were present in low relative abundance. Since OMP concentrations in surface water are generally much lower (ng - µg/L) than the concentration of organic matter (mg/L), several studies suggested co-metabolic degradation of OMPs to be more likely than metabolic degradation (Alidina et al., 2014a; Maeng et al., 2011a; Rauch-Williams et al., 2010). Some studies demonstrated that ammonia oxidizing bacteria (AOB) were involved in co-metabolic degradation of OMPs in wastewater treatment processes (e.g. nitrifying activated sludge, membrane bioreactor, granular activated carbon) (Men et al., 2017; Park et al., 2017; Rattier et al., 2014; Xu et al., 2016). The presence of AOB in RSFs of the current study could indicate their involvement in OMP biodegradation in RSFs. Alternatively, OMP removal by physico-chemical processes such as adsorption to the filter sand or NOM present in the surface water (Delgado-Moreno et al., 2010) cannot be excluded. Future research in controlled laboratory-scale experiments is required to test the aforementioned hypotheses.

Due to the large number of variables in the full-scale RSFs such as influent water quality and process conditions, and the varying numbers and concentrations of OMPs present in the influents, it was not feasible to identify bacterial genera that could be correlated to (specific) OMP removal. Future research with controlled laboratory-scale experiments is required to reveal the microorganisms involved in OMP degradation. Once the responsible micro-organism(s) is/are identified, their presence in full-scale RSFs can be investigated to confirm the results obtained with the laboratory-scale experiments.

#### 4.4.1. Correlating microbial communities, OMPs and TPs

Information on biological degradation of OMPs, in particular on the involved microorganisms in RSFs is scarce. This is largely due to the fact that the potential of RSFs to remove OMPs has only been recognized in recent years. This study indicates that RSFs at some

drinking water treatment plants treating surface water are capable of removing a number of OMPs to a significant extent (location 7 and 4), while RSFs at other treatment plants show no removal (location 1, 2, 3 and 6). OMP removal in RSFs is thus specific for each drinking water treatment plant. As the microbial populations of the RSFs are comparable on genus level, the removal seems to be correlated to, amongst others, the amount and type of OMPs present in the feed water. Correspondingly, the NTS data reflected this finding, with the same compounds behaving as TPs or as PCs according to the location.

OTUs correlating with feature decrease or increase in RSF locations are possible candidates involved in OMP removal through transformation processes. To further the understanding of biological OMP degradation in RSFs, correlations between the abundance of individual OTUs and decrease or increase of individual features were analysed.

The correlation analysis between the OTUs and features resulted in six correlating validated features and OTUs (Fig. SI 3). There were negative correlations, implying the OTU in the pair is involved in degrading the feature in the pair, and one positive correlation, implying the OTU is involved in the formation of the feature as a transformation product. Negative correlations were found between 169.11015/8.457 with OTU00391 (uncultured *Microscillaceae*), between 169.11015/8.457 with OTU00172 (*Planctomycetes* clade OM190), between 267.147/6.96 and 398.24355/21.503 with OTU00723 (*Pedosphaeraceae*), and between 662.19414/14.693 with OTU00129 (*Acidobacteria* Subgroup 17). A positive correlation was found between 255.00778/9.113 with OTU00341 (Phylum "*Candidatus* *Eremiobacterota*" WPS-2). The five OTUs related to these pairs of interest could not be classified further than the phylum or family level. Literature on these clades is scarce, especially concerning their role in OMP removal. The paired OTUs were most abundant in the filter material of the RSFs (Fig. SI 2), and less abundant in the influent. When the correlation between the feature and the OTU is an indication that these OTUs are involved in degradation of OMPs, the degradation mostly occurs within the biofilm that is attached to the media material, and not by bacteria present in the water. OTU00129 with 662.19414/14.693 was of specific interest, because the OTU in this specific pair increases with increasing influent concentration of the feature and feature intensity declines more between influent and effluent with high abundance of this OTU. This makes OTU00129 a likely candidate that is involved in degradation of this feature and is, thus, worthwhile pursuing in isolation studies. OTU00129 belongs to *Acidobacteria* Subgroup 17. Little is known about this clade of *Acidobacteria*; it occurs in many different types of pasture soils and is negatively correlated to soil acidity (Navarrete et al., 2015). In addition, it showed negative correlations with many carbon degrading gene families in a microarray study (Chaves et al., 2019).

The little information available on the metabolism and ecology of the detected microorganisms rendered it difficult to assess the validity of OTU-feature pairs. The OTUs that correlated with an increase or decrease of a feature in RSF locations can be considered candidate pairs, and their relationship will have to be confirmed in controlled experiments. Afterwards, these microorganisms could be specifically enriched during controlled cultivation in order to test their capacity to degrade certain OMPs. Together these methods would then not only provide more insight into RSF based OMP removal but could also be used as starting points for bio-augmentation/bio-stimulation applications in drinking water treatment.

## 5. Conclusions

Here, we combined data from quantitative suspect screening,

NTS and NGS analyses from seven full-scale RSFs in a proof-of-principle study to show that we can: (1) assess OMP removal capacity, (2) identify TPs, (3) provide insight in differences/similarities between microbial community composition in different RSFs, and (4) correlate TP formation to specific OTUs with this combination of methods. The approach proved successful and should be seen as an important first step towards a better understanding of OMP removal in full-scale drinking water treatment filters, specifically RSFs.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgements

This work was funded by the Joint Research Program of the Dutch and Belgian drinking water companies. The authors would like to thank the Dutch and Belgian drinking water companies, in particular Luk van Lokeren, Ruud Kolpa, René van der Aa and Sander Nugteren for critical reading, and the KWR Laboratory of Microbiology and the KWR Chemical Laboratory for their contribution.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127630>.

### References

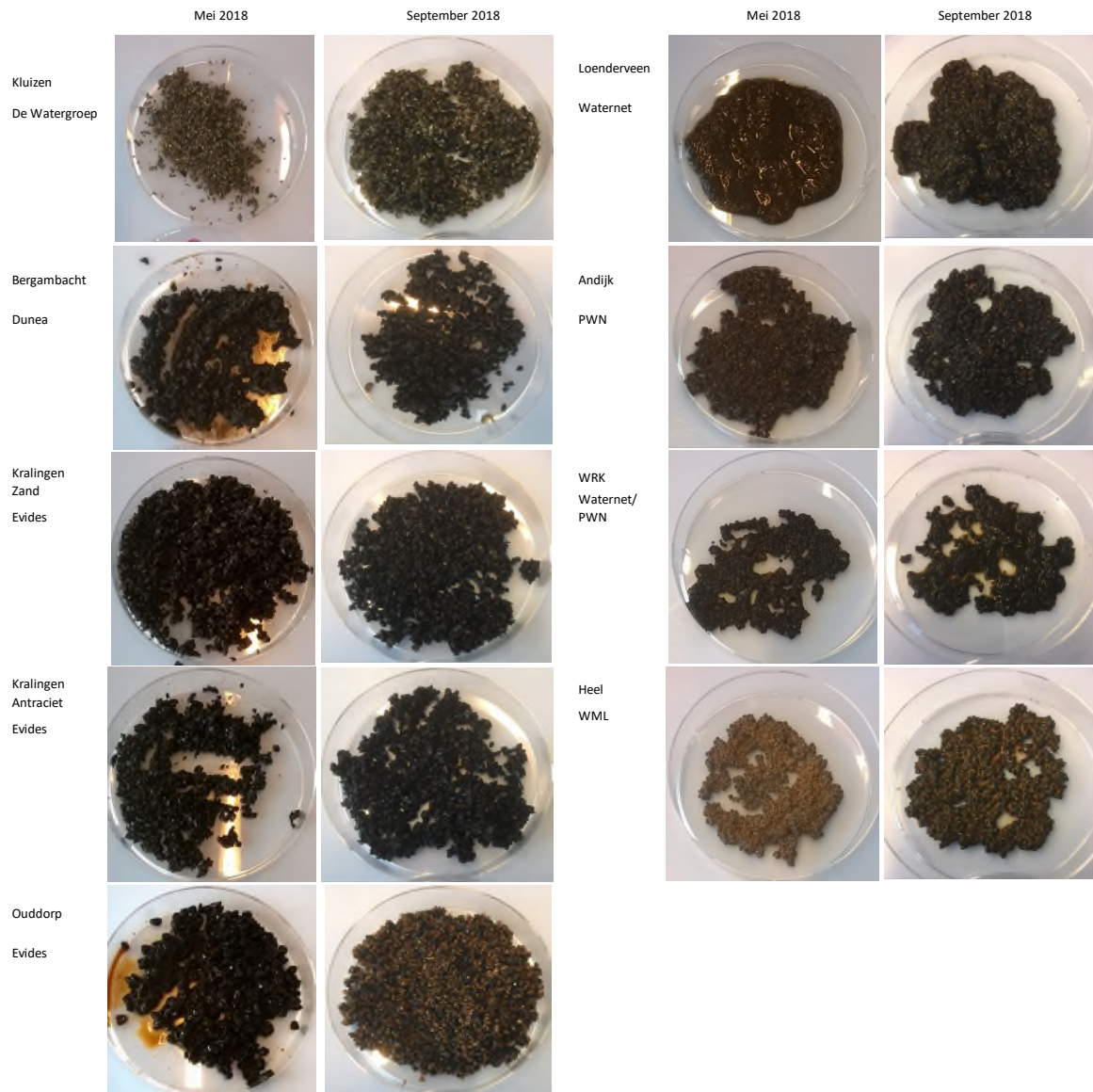
- Abu Hasan, H., Muhammad, M.H., Ismail, N.I., 2020. A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources. *J. Water Process Eng.* 33, 101035. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101035>.
- Alidina, M., Li, D., 2014. Investigating the role for adaptation of the microbial community to transform trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Res.* 6, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.046>.
- Alidina, M., Li, D., Drewes, J.E., 2014a. Investigating the role for adaptation of the microbial community to transform trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Res.* 56, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.046>.
- Alidina, M., Li, D., Ouf, M., Drewes, J.E., 2014b. Role of primary substrate composition and concentration on attenuation of trace organic chemicals in managed aquifer recharge systems. *J. Environ. Manag.* 144, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.032>.
- Andersen, K.S., Kirkegaard, R.H., Karst, S.M., Albertsen, M., 2018. ampvis2: an R Package to Analyse and Visualise 16S rRNA Amplicon Data. <https://doi.org/10.1101/299537> bioRxiv (preprint) 299537.
- Benner, J., Helbling, D.E., Kohler, H.P.E., Wittebol, J., Kaiser, E., Prasse, C., Ternes, T.A., Albers, C.N., Aamand, J., Horemans, B., Springael, D., Walravens, E., Boon, N., 2013. Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes? *Water Res.* 47, 5955–5976. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.015>.
- Bertelkamp, C., Hofman-Caris, R., Siegers, W.G., Beerendonk, E.F., Nugteren, S., 2017. Biodegradation of pyrazole in rapid sand filters. *Conf. Proc. 10th Micropol Ecol Hazard Conf. IWA* 17–20.
- Bertelkamp, C., Reungoat, J., Cornelissen, E.R., Singhal, N., Reynisson, J., Cabo, A.J., van der Hoek, J.P., Verliefe, A.R.D., 2014. Sorption and biodegradation of organic micropollutants during river bank filtration: a laboratory column study. *Water Res.* 52, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.068>.
- Bletsou, A.A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., Thomaidis, N.S., 2015. Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 66, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.009>.
- Bogunovic, M., Knezevic, V., Simeunovic, J., Teodorovic, I., Ivancev-Tumbas, I., 2017. Biodegradation of a mixture of benzophenone, benzophenone-3, caffeine and carbamazepine in a laboratory test filter. *J. Serb. Chem. Soc.* 82, 1445–1459. <https://doi.org/10.2298/JSC170717105B>.
- Briones, R.M., Zhuang, W.Q., Sarmah, A.K., 2018. Biodegradation of metformin and guanlyurea by aerobic cultures enriched from sludge. *Environ. Pollut.* 243, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.075>.
- Brunner, A.M., Bertelkamp, C., Dingemans, M.M.L., Kolkman, A., Wols, B., Harmsen, D., Siegers, W., Martijn, B.J., Oorthuizen, W.A., ter Laak, T.L., 2020. Integration of target analyses, non-target screening and effect-based monitoring to assess OMP related water quality changes in drinking water treatment. *Sci. Total Environ.* 705, 135779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135779>.
- Brunner, A.M., Vughs, D., Siegers, W., Bertelkamp, C., Hofman-Caris, R., Kolkman, A., ter Laak, T., 2019. Monitoring transformation product formation in the drinking water treatments rapid sand filtration and ozonation. *Chemosphere* 214, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.140>.
- Cakmakci, M., Koyuncu, I., Kinaci, C., 2008. Effects of iron concentrations, filter hydraulic loading rates, and porosities on iron removal by rapid sand filtration. *Environ. Eng. Sci.* 25, 669–676. <https://doi.org/10.1089/ees.2007.0060>.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Gonzalez-Pena, A., Goodrich, J.K., Gordon, J.L., Huttley, G.A., Scott, T.K., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, A.C., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303.QIIME>.
- Castronovo, S., Wick, A., Scheurer, M., Nödler, K., Schulz, M., Ternes, T.A., 2017. Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters. *Water Res.* 110, 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.041>.
- Chaves, M.G., Silva, G.G., Rossetto, R., Edwards, R.A., Tsai, S.M., Navarrete, A.A., 2019. Acidobacteria subgroups and their metabolic potential for carbon degradation in sugarcane soil amended with vinasse and nitrogen fertilizers. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01680>.
- Clasen, J., 1998. Efficiency control of particle removal by rapid sand filters in treatment plants fed with reservoir water: a survey of different methods. *Water Sci. Technol.* 37, 19–26. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00005-5).
- D'Alessio, M., Yoneyama, B., Kirs, M., Kisand, V., Ray, C., 2015. Pharmaceutically active compounds: their removal during slow sand filtration and their impact on slow sand filtration bacterial removal. *Sci. Total Environ.* 524 (525), 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.014>.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendiger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M., 2015. Complete nitrification by a Nitrospira bacteria. *Nature* 528, 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16459.Complete>.
- de Jongh, C.M., Kooij, P.J.F., de Voogt, P., ter Laak, T.L., 2012. Screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water. *Sci. Total Environ.* 427, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.010>. –428.
- Delgado-Moreno, L., Wu, L., Gan, J., 2010. Effect of dissolved organic carbon on sorption of pyrethroids to sediments. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8473–8478. <https://doi.org/10.1021/es102277h>.
- Djombou-Feunang, Y., Fiamoncini, J., Gil-de-la-Fuente, A., Greiner, R., Manach, C., Wishart, D.S., 2019. BioTransformer: a comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. *J. Cheminf.* 11, 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0324-5>.
- Ellis, L.B.M., Gao, J., Fenner, K., Wackett, L.P., 2008. The University of Minnesota pathway prediction system: predicting metabolic logic. *Nucleic Acids Res.* 36, 427–432. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn315>.
- European Commission, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances, vol. 337. <https://doi.org/10.1002/mp.12308>. Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the Europ. Off. Publ. Eur. Communities, Luxemb.
- Foolad, M., Ong, S.L., Hu, J., 2015. Transport of sewage molecular markers through saturated soil column and effect of easily biodegradable primary substrate on their removal. *Chemosphere* 138, 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.008>.
- Fowler, S.J., Palomo, A., Dechesne, A., Mines, P.D., Smets, B.F., 2018. Comammox Nitrospira are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities. *Environ. Microbiol.* 20, 1002–1015. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14033>.
- Gude, J.C.J., Joris, K., Huysman, K., Rietveld, L.C., van Halem, D., 2018. Effect of supernatant water level on as removal in biological rapid sand filters. *Water Res.* X 1, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2018.100013>.
- Güluy, A., Musovic, S., Albrechtsen, H.J., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., Smets, B.F., 2016. Ecological patterns, diversity and core taxa of microbial communities in groundwater-fed rapid gravity filters. *ISME J.* 10, 2209–2222. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.16>.
- Hamann, E., Stuyfzand, P.J., Greskowiak, J., Timmer, H., Massmann, G., 2016. The fate of organic micropollutants during long-term/long-distance river bank filtration. *Sci. Total Environ.* 545 (546), 629–640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.057>.
- Hedegaard, M.J., Albrechtsen, H.J., 2014. Microbial pesticide removal in rapid sand filters for drinking water treatment - potential and kinetics. *Water Res.* 48, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.024>.
- Hellauer, K., Karakurt, S., Sperlich, A., Burke, V., Massmann, G., Hübner, U., Drewes, J.E., 2018. Establishing sequential managed aquifer recharge technology (SMART) for enhanced removal of trace organic chemicals: experiences from field studies in Berlin, Germany. *J. Hydrol.* 563, 1161–1168. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2017.09.044>.

- Henning, N., Kunkel, U., Wick, A., Ternes, T.A., 2018. Biotransformation of gabapentin in surface water matrices under different redox conditions and the occurrence of one major TP in the aquatic environment. *Water Res.* 137, 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.027>.
- Hermes, N., Jewell, K.S., Schulz, M., Müller, J., Hübner, U., Wick, A., Drewes, J.E., Ternes, T.A., 2019. Elucidation of removal processes in sequential biofiltration (SBF) and soil aquifer treatment (SAT) by analysis of a broad range of trace organic chemicals (TOCs) and their transformation products (TPs). *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114857>, 114857.
- Hollender, J., Schymanski, E.L., Singer, H.P., Ferguson, P.L., 2017. Nontarget screening with high resolution mass spectrometry in the environment: ready to go? *Environ. Sci. Technol.* 51, 11505–11512. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02184>.
- Hübner, U., von Gunten, U., Jekel, M., 2015. Evaluation of the persistence of transformation products from ozonation of trace organic compounds - a critical review. *Water Res.* 68, 150–170. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.051>.
- Jabeen, H., Iqbal, S., Anwar, S., 2015. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN3. *Water Environ. J.* 29, 151–160. <https://doi.org/10.1111/wej.12081>.
- Jezbera, J., Jezberová, J., Brandt, U., Hahn, M.W., 2011. Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* subspecies *asymbioticus* results from ecological diversification. *Environ. Microbiol.* 13, 922–931. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02396.x>.
- Jezbera, J., Sharma, A.K., Brandt, U., Doolittle, W.F., Hahn, M.W., 2009. "Candidatus *Planktophilia limnetica*", an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2864–2869. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010199-0>.
- Kahl, S., Kleinstaub, S., Nivala, J., Van Afferden, M., Reemtsma, T., 2018. Emerging biodegradation of the previously artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 52, 2717–2725. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05619>.
- Kaiser, E., Prasse, C., Wagner, M., Bröder, K., Ternes, T.A., 2014. Transformation of oxcarbazepine and human metabolites of carbamazepine and oxcarbazepine in wastewater treatment and sand filters. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10208–10216. <https://doi.org/10.1021/es502449g>.
- Kang, H., Kim, H., Lee, B. II, Joung, Y., Joh, K., 2014. *Sediminibacterium goheungense* sp. nov., isolated from a freshwater reservoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1328–1333. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.055137-0>.
- Keum, Y.S., Seo, J.S., Hu, Y., Li, Q.X., 2006. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 935–941. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0219-z>.
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., Kuramae, E.E., 2016. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Front. Microbiol.* 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>.
- Kumar, R., Singh, B., Gupta, V.K., 2012. Biodegradation of fipronil by *paracoccus* sp. in different types of soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 781–787. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0578-y>.
- Lage, O.M., Bondoso, J., 2014. Planctomycetes and macroalgae, a striking association. *Front. Microbiol.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00267>.
- Lautenschlager, K., Hwang, C., Ling, F., Egli, T., Liu, W., Boon, N., Oliver, K., Hammes, F., 2014. Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant. *Water Res.* 2, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.035>.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Software* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>.
- Li, Z., Kaserzon, S.L., Plassmann, M.M., Sobek, A., Gómez Ramos, M.J., Radke, M., 2017. A strategic screening approach to identify transformation products of organic micropollutants formed in natural waters. *Environ. Sci. Process. Impacts* 19, 488–498. <https://doi.org/10.1039/c6em00635c>.
- Little, J.L., Williams, A.J., Pshenichnov, A., Tkachenko, V., 2012. Identification of "known unknowns" utilizing accurate mass data and chemspider. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 179–185. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0265-y>.
- Llirós, M., Inceoğlu, Ö., García-Armisen, T., Anzil, A., Leporcq, B., Pigneur, L.M., Viroux, L., Darchambeau, F., Descy, J.P., Servais, P., 2014. Bacterial community composition in three freshwater reservoirs of different alkalinity and trophic status. *PLoS One* 9, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116145>.
- Maeng, S.K., Sharma, S.K., Abel, C.D.T., Magic-Knezev, A., Amy, G.L., 2011a. Role of biodegradation in the removal of pharmaceutically active compounds with different bulk organic matter characteristics through managed aquifer recharge: batch and column studies. *Water Res.* 45, 4722–4736. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.043>.
- Maeng, S.K., Sharma, S.K., Lekkerkerker-Teunissen, K., Amy, G.L., 2011b. Occurrence and fate of bulk organic matter and pharmaceutically active compounds in managed aquifer recharge: a review. *Water Res.* 45, 3015–3033. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.017>.
- Magic-Knezev, A., van der Kooij, D., 2004. Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Res.* 38, 3971–3979. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.017>.
- Mandal, K., Singh, B., Jariyal, M., Gupta, V.K., 2013. Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.001>.
- Margot, J., Lochmatter, S., Barry, D.A., Holliger, C., 2016. Role of ammonia-oxidizing bacteria in micropollutant removal from wastewater with aerobic granular sludge. *Water Sci. Technol.* 73, 564–575. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.514>.
- Men, Y., Achermann, S., Helbling, D.E., Johnson, D.R., Fenner, K., 2017. Relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and other members of nitrifying activated sludge communities to micropollutant biotransformation. *Water Res.* 109, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.048>.
- Nakamura, A., 1991. Tri-n-butyl phosphate. *Environ. Health Crit.* 112, 1–80. WHO, Geneva.
- Navarrete, A.A., Venturini, A.M., Meyer, K.M., Klein, A.M., Tiedje, J.M., Brendan, B.J., Nüsslein, K., Tsai, S.M., Rodrigues, J.L.M., 2015. Differential response of Acidobacteria subgroups to forest-to-pasture conversion and their biogeographic patterns in the western Brazilian Amazon. *Front. Microbiol.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01443>.
- Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D., Bertilsson, S., 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 14–49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>.
- Ning, J., Bai, Z., Gang, G., Jiang, D., Hu, Q., He, J., Zhang, H., Zhuang, G., 2010. Functional assembly of bacterial communities with activity for the biodegradation of organophosphorus pesticide in the rape phyllosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 306, 135–143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01946.x>.
- Oh, S., Hammes, F., Liu, W.-T., 2018. Metagenomic characterization of biofilter microbial communities in a full-scale drinking water treatment plant. *Water Res.* 128, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.054>.
- Ohtsubo, Y., Goto, H., Nagata, Y., Kudo, T., Tsuda, M., 2006. Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading  $\beta$ -proteobacteria. *Acidovorax* sp. KKS102. *Mol. Microbiol.* 60, 1563–1575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05197.x>.
- Park, J., Yamashita, N., Wu, G., Tanaka, H., 2017. Removal of pharmaceuticals and personal care products by ammonia oxidizing bacteria acclimated in a membrane bioreactor: contributions of cometabolism and endogenous respiration. *Sci. Total Environ.* 605–606, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.155>.
- Piai, L., Blokland, M., van der Wal, A., Langenhoff, A., 2020. Biodegradation and adsorption of micropollutants by biological activated carbon from a drinking water production plant. *J. Hazard Mater.* 388. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122028>.
- Pinto, A.J., Xi, C., Raskin, L., 2012. Bacterial community structure in the drinking water microbiome is governed by filtration processes. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8851–8859. <https://doi.org/10.1021/es302042t>.
- Poonthirigun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripiat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., Pinphanichakarn, P., 2006. Novel intermediates of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. strain CU-A1: evidence for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6034–6039. <https://doi.org/10.1128/AEM.00897-06>.
- Postigo, C., Richardson, S.D., 2014. Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment. *J. Hazard Mater.* 279, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.029>.
- Poursat, B.A.J., van Spanning, R.J.M., Braster, M., Helmus, R., de Voogt, P., Parsons, J.R., 2019. Biodegradation of metformin and its transformation product, guanilyurea, by natural and exposed microbial communities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 182, 109414. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109414>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Rattier, M., Reungoat, J., Keller, J., Gernjak, W., 2014. Removal of micropollutants during tertiary wastewater treatment by biofiltration: role of nitrifiers and removal mechanisms. *Water Res.* 54, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.030>.
- Rauch-Williams, T., Hoppe-Jones, C., Drewes, J.E., 2010. The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Res.* 44, 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.027>.
- Regnery, J., Barringer, J., Wing, A.D., Hoppe-Jones, C., Teerlink, J., Drewes, J.E., 2015. Start-up performance of a full-scale riverbank filtration site regarding removal of DOC, nutrients, and trace organic chemicals. *Chemosphere* 127, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.076>.
- Ruttkies, C., Schymanski, E.L., Wolf, S., Hollender, J., Neumann, S., 2016. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J. Cheminf.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9>.
- Scheurer, M., Michel, A., Brauch, H.J., Ruck, W., Sacher, F., 2012. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanilyurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Res.* 46, 4790–4802. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.019>.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.C., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- Schollée, J.E., Bourgin, M., von Gunten, U., McARDell, C.S., Hollender, J., 2018. Nontarget screening to trace ozonation transformation products in a wastewater treatment train including different post-treatments. *Water Res.* 142, 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.045>.
- Schollée, J.E., Schymanski, E.L., Hollender, J., 2016. Statistical approaches for LC-MS/MS data to characterize, prioritize, and identify transformation products from water treatment processes. *ACS (Am. Chem. Soc.) Symp. Ser.* 45–65. <https://doi.org/10.1021/bk-2016-1241.ch004>.
- Schymanski, E.L., Avak, S.E., Loos, M., Hollender, J., 2015. Prioritizing unknown



- transformation products from biologically- treated wastewater using high-resolution mass spectrometry, multivariate statistics, and metabolic logic. *Anal. Chem.* 87, 12121–12129. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02905>.
- Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
- Sheldon, L.S., Hites, R.A., 1979. Sources and movement of organic chemicals in the Delaware River. *Environ. Sci. Technol.* 13, 574–579. <https://doi.org/10.1021/es60153a018>.
- Shimabuku, K.K., Zearley, T.L., Dowdell, K.S., Summers, R.S., 2019. Biodegradation and attenuation of MIB and 2,4-D in drinking water biologically active sand and activated carbon filters. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 5, 849–860. <https://doi.org/10.1039/C9EW00054B>.
- Tatari, K., Musovic, S., Gülay, A., Dechesne, A., Albrechtsen, H.-J., Smets, B.F., 2017. Density and distribution of nitrifying guilds in rapid sand filters for drinking water production: dominance of *Nitrospira* spp. *Water Res.* 127, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.023>.
- Tran, N.H., Gan, J., Nguyen, V.T., Chen, H., You, L., Duarah, A., Zhang, L., Gin, K.Y.H., 2015. Sorption and biodegradation of artificial sweeteners in activated sludge processes. *Bioresour. Technol.* 197, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.083>.
- Tu, C., Teng, Y., Luo, Y., Li, X., Sun, X., Li, Z., Liu, W., Christie, P., 2011. Potential for biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Hazard Mater.* 186, 1438–1444. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.008>.
- Vandermaesen, J., Horemans, B., Degryse, J., Boonen, J., Walravens, E., Springael, D., 2016. Mineralization of the common groundwater pollutant 2,6-dichlorobenzamide (BAM) and its metabolite 2,6-dichlorobenzoic acid (2,6-DCBA) in sand filter units of drinking water treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 50, 10114–10122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01352>.
- Wilkinson, J., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: an overarching review of the field. *Environ. Pollut.* 231, 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>.
- Xu, Y., Yuan, Z., Ni, B.J., 2016. Biotransformation of pharmaceuticals by ammonia oxidizing bacteria in wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 566 (567), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.118>.
- Yam, K., van der Geize, R., Eltis, L., 2010. *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12937-7>.
- Ye, Q., Wu, Y., Zhu, Z., Wang, X., Li, Z., Zhang, J., 2016. Bacterial diversity in the surface sediments of the hypoxic zone near the Changjiang Estuary and in the East China Sea. *Microbiol.* 5, 323–339. <https://doi.org/10.1002/mbo3.330>.
- Zearley, Thomas L., Summers, R.S., 2012. Removal of trace organic micropollutants by drinking water biological filters. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9412–9419. <https://doi.org/10.1021/es301428e>.
- Zeng, X., Liu, Z., He, L., Cao, S., Song, H., Yu, Z., Sheng, G., Fu, J., 2015. The occurrence and removal of organophosphate ester flame retardants/plasticizers in a municipal wastewater treatment plant in the Pearl River Delta, China. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 50, 1291–1297. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1055158>.
- Zhang, S.Y., Wang, Q.F., Wan, R., Xie, S.G., 2011. Changes in bacterial community of anthracene bioremediation in municipal solid waste composting soil. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 12, 760–768. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000440>.

## II Foto's van filtermateriaal van bemonsterde snelfilters



Figuur 31. Foto's van filtergrind bemonsterd in mei en september 2018

### III Monstername en procesomstandigheden snelfilters tijdens meetcampagne

Tabel 12. Monsternamerondes in mei en september 2018. Gegeven zijn de monsternamepunten waar het influent en effluent zijn bemonsterd en op welke dag de bemonstering is uitgevoerd. In mei zijn het influent en effluent van Ouddorp, Kralingen en Bergambacht bemonsterd in niet-XAD gespoelde flessen. Hiervoor is gecorrigeerd tijdens het interpreteren van de resultaten.

Productielocatie	Bedrijf	Monsternamepunten 24/25 mei 2018	Monsternamepunten 19/24/26 september 2018
Ouddorp	Evides	Influent: Poud00Dra1 en -Dra2* <sup>#</sup> Effluent: Poud35VF01* <sup>#</sup> Zand: Voorfilter 1* <sup>#</sup>	Influent: POUD13INNA Effluent: POUD18UITG Zand: niet duidelijk
Kralingen	Evides	Influent: PKRL34NSD2* <sup>&amp;</sup> Effluent: PKRL45DF08* <sup>&amp;</sup> Zand en antraciet: Dubbellaagsfilter 208 (0,7 – 1,10 m)* <sup>&amp;</sup>	Influent: PKRL34NSD1 <sup>‡</sup> <sup>&amp;</sup> Effluent: PKRL45DF10 <sup>‡</sup> <sup>&amp;</sup> Zand en antraciet: Dubbellaagsfilter 210 <sup>&amp;</sup>
Bergambacht	Dunea	Influent: PBA-SF-INF-ND* Effluent: Filter 17* Zand: Filter 17*	Influent: PBA-SF-INF-ND Effluent: Filter 12 Zand: Filter 12
Andijk (zuivering WPJ)	PWN	Influent: PPJ-ZF33-INF Effluent: PPJ-ZF33-EFF Zand: PPJ-ZF33-Zand	Influent: PPJ-ZF33-INF Effluent: PPJ-ZF33-EFF Zand: PPJ-ZF33-Zand
Loenderveen	Waternet	Influent: Filter 1 Effluent: Filter 1 Zand: Filter 1	Influent: Filter 1 Effluent: Filter 1 Zand: Snelfilter 1
WRK Nieuwegein	Waternet	Influent: Filter 21 Effluent: Filter 21 Zand: Filter 21	Influent: Filter 22 Effluent: Filter 22 Zand: Filter 22
Heel <sup>@</sup>	WML	Influent: VF-1 Effluent: VF-1 Zand: VF-1	Influent: VF-1 Effluent: VF-1 Zand: VF-1
Kluzen <sup>@</sup>	De Watergroep	Influent: Dubbellaagsfilter 3 Effluent: Dubbellaagsfilter 3 Zand: Dubbellaagsfilter 3	Influent: Dubbellaagsfilter 3 Effluent: Dubbellaagsfilter 3 Zand: Dubbellaagsfilter 3

\* Bemonsterd in niet-XAD gespoelde flessen.

<sup>@</sup> Bemonstering zelf uitgevoerd, zelfde dag bij KWR bezorgd

<sup>#</sup> Het filter uit de nazuivering (na duinpassage) is bemonsterd, en niet het filter in de voorzuivering.

<sup>&</sup> Het filter bevat antraciet (toplaag) als zand, beide materialen zijn bemonsterd.

<sup>‡</sup> Het influent en effluent zijn niet van hetzelfde filter afkomstig

Tabel 13. Heersende procescondities in filters ten tijde van monsternamen in mei (meetronde 1) en september (meetronde 2) 2018. EBCT: empty bed contact time

	Loenderveen (Waternet)	WRK (Waternet)	Ouddorp (Evides)	Kralingen (Evides)
Aantal filters [-]	24	80	5	12
Debiet meetronde 1 [m <sup>3</sup> /uur]	145	150	650 (130?)	367
Debiet meetronde 2 [m <sup>3</sup> /uur]	-	-	-	XXX
Ontwerpdebiet [m <sup>3</sup> /uur]	-	-	920	600
Gemiddeld debiet [m <sup>3</sup> /uur]	120	155	625	354
EBCT [min], meetronde 1	23,8	24	16,6	12,9
EBCT [min], meetronde 2	-	-	-	-
EBCT gemiddeld [min]	-	-	17,3	8,5
EBCT bij max debiet [min]	-	-	9,4	4,5
Afmetingen filter [m]	4 x 12	4 x 12	4 x 4,5 (A <sub>filter</sub> = 18 m <sup>2</sup> )	5,50 x 9,00 (A <sub>filter</sub> = 36 m <sup>2</sup> )
Bedhoogte [m]	1,20	1,25	2,0 1,2 m antraciet, 0,8 m zand	2,2 0,70m grind, 0,70m zand, 0,80m antraciet
Korrelgrootte [mm]	0,8-1,25	0,70 – 1,40	Antraciet: 1,4 – 2,5 Zand: 0,7 – 1,25	Zand: 0,8 -1,25 Antraciet: 1,6 – 2,5
Gemiddelde looptijd [d]	ca. 10	minimaal ca. 2 dagen	ca. 24 uur bij Q = 625 m <sup>3</sup> /h	Ca. 32 uur bij Q = 4250 m <sup>3</sup> /h
Terugspoelcriterium [-]	druk	druk	weerstand, tijd	Weerstand, tijd
Terugspoelprogramma [-]	Lucht/water	Lucht/water	Lucht/water	Lucht/water
Jaar van ingebruikname [-]	2005-2008	Onbekend	1996	1976
Bijzonderheden	Spoelsnelheden bij 20°C temperatuur gecorrigeerd	Spoelsnelheden bij 20°C temperatuur gecorrigeerd	In mei 2018 zijn snelfilters <b>na</b> duinpassage bemonsterd. In september de snelfilters <b>voor</b> duinpassage.	-

	Heel (WML)	Kluizen (De Watergroep)	Bergambacht (Dunea)	Andijk (PWN)
Aantal filters [-]	12	4	24	18
Debiet meetronde 1 [m <sup>3</sup> /uur]	183	210	420	544
Debiet meetronde 2 [m <sup>3</sup> /uur]	164	-	440	378
Ontwerpdebiet [m <sup>3</sup> /uur]	266	250	-	800
Gemiddeld debiet [m <sup>3</sup> /uur]	190	-	-	-
EBCT [min], meetronde 1	18	-	9,6	7,5
EBCT [min], meetronde 2	-	-	-	10,8
EBCT gemiddeld [min]	-	-	-	-
EBCT bij max debiet [min]	-	-	-	-
Afmetingen filter [m]	7,9 x 5,1	9 x 4	6 x 12	15 x 2,6
Bedhoogte [m]	2,0	1,20	0,85 25 cm antraciet, 60 cm zand	1,75
Korrelgrootte [mm]	1,0 – 1,6	Zand: 0,71 – 1,25 mm Hydroantraciet: 1,4 – 2,5 mm	Zand: 0,8 - 1,25 mm Antraciet: 1,6 - 2,5	1,0 – 2,5
Gemiddelde looptijd [d]	55 uur	900 minuten	8 dagen (max. 10 dagen)	60 – 80 uur (64 uur ten tijde van monsternamen)
Terugspoelcriterium [-]	XXX	0,4 NTU, ladingsverlies = 1,00 mwk, looptijd = 7200 min, BV = 300 m <sup>3</sup> of manueel, Q <sub>lucht</sub> = 1800 m <sup>3</sup> /u, Q <sub>water</sub> = 1800 m <sup>3</sup> /u	-	Start terugspoelen na max. 80 uur of bereiken max. weerstand.
Terugspoelprogramma [-]	1 keer per 55 uur, duur = 28 minuten	-	Lucht/water	Erg uitgebreid programma
Jaar ingebruikname [-]	2000	2017	1980	2010
Bijzonderheden	Alleen totaal debiet gemeten, niet de afzonderlijke filters		-	Upflow snelfilter



## IV Resultaten meetcampagne

*Tabel 14. Concentratie OMV's ( $\mu\text{g/l}$ ) in influent en effluent van full-scale snelfilters in mei en september 2018. Als de waarde onder de detectielimiet is, is het vakje grijs gekleurd. Rood: geen verwijdering, oranje: beperkte verwijdering, groen: aanzienlijke verwijdering van de OMV volgens criteria in hoofdstuk 3.1.2. De rapportagegrens is éénmalig bepaald aan de hand van piekoppervlak. Getallen zijn gecorrigeerd voor een eventuele blanco zoals beschreven in hoofdstuk 3. Indien de concentratie onder de detectielimiet is, is de waarde van de detectielimiet gebruikt om het verwijderingspercentage te berekenen. # = mogelijk alleen te bepalen als Na-adduct, extra onderzoek nodig. n.t.b.= niet te bepalen.*

Mei 2018

Table with 24 columns (CAS-nummer, Heel, Kruis, Kralingen, WK, Andijk, Landerveen, Bergambacht, Oudorp) and multiple rows of chemical compounds and their degradation efficiency values.

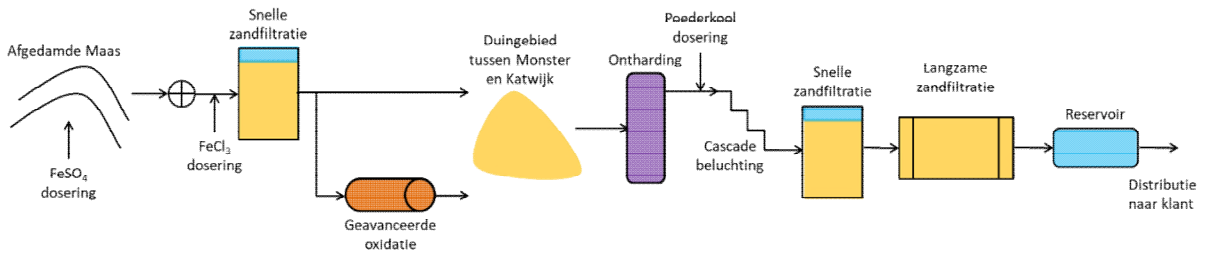


September 2018

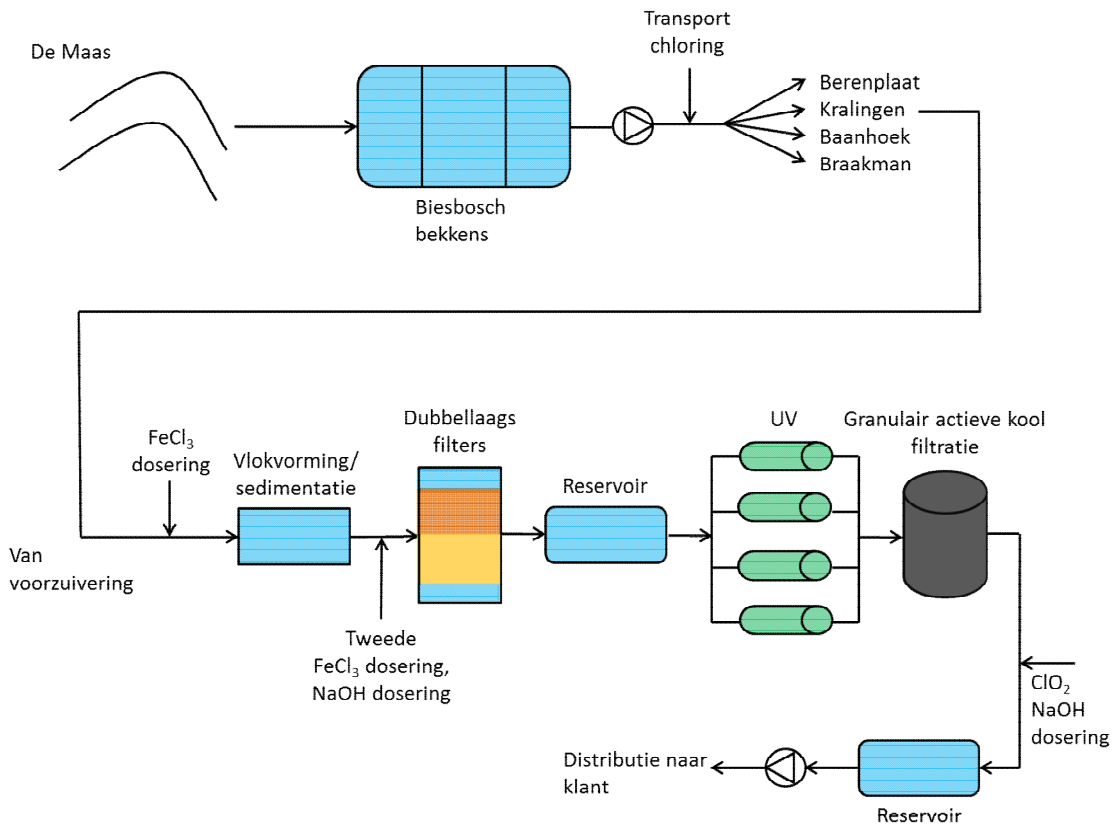
Table with columns: Datum monstername, Cas-nummer, Heel, Kluisen, Kwallen, WRK, and various monitoring points (Inlaant, Effluent, etc.) for numerous chemical compounds.

# V Zuiveringsstappen van bemonsterde drinkwaterproductielocaties

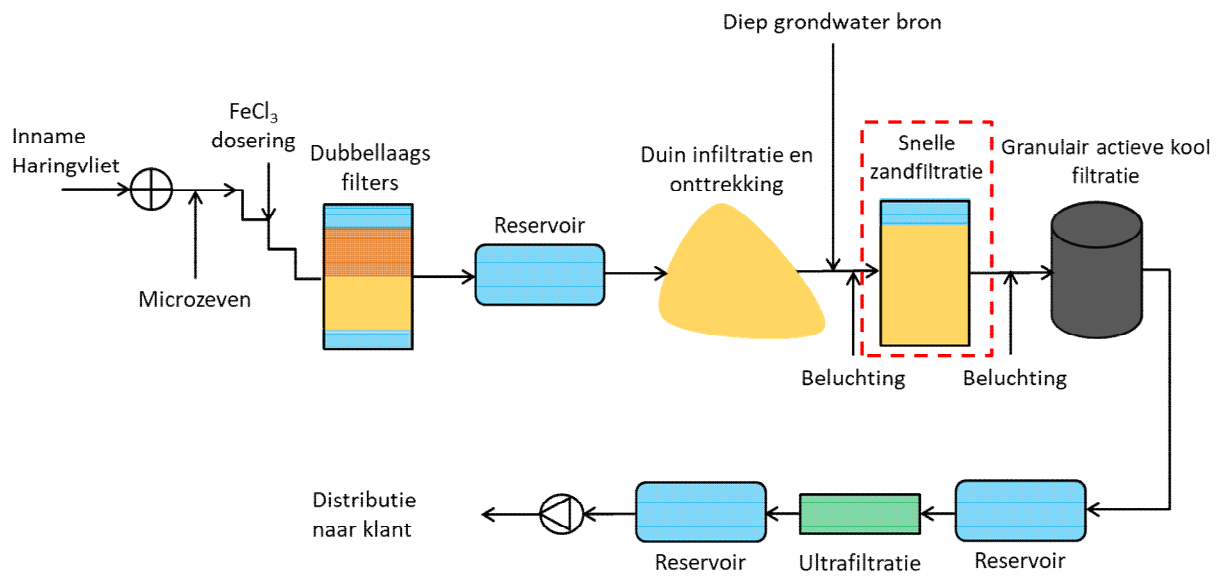
## Dunea, Bergambacht



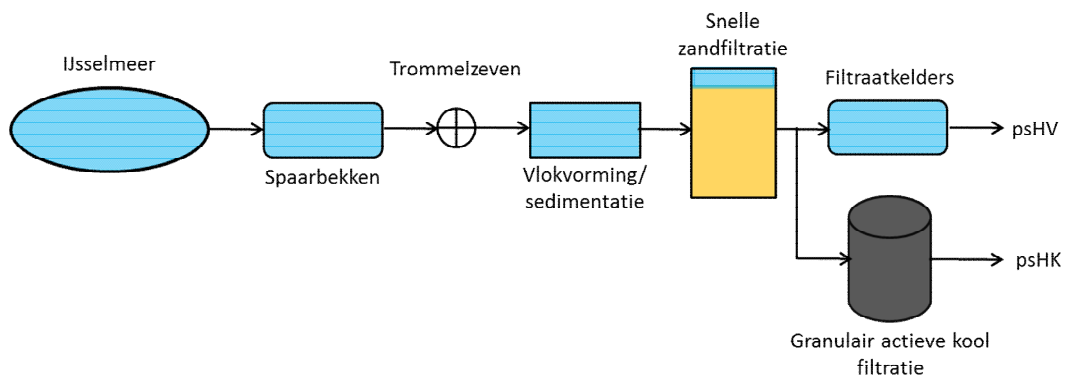
## Evides, Kralingen



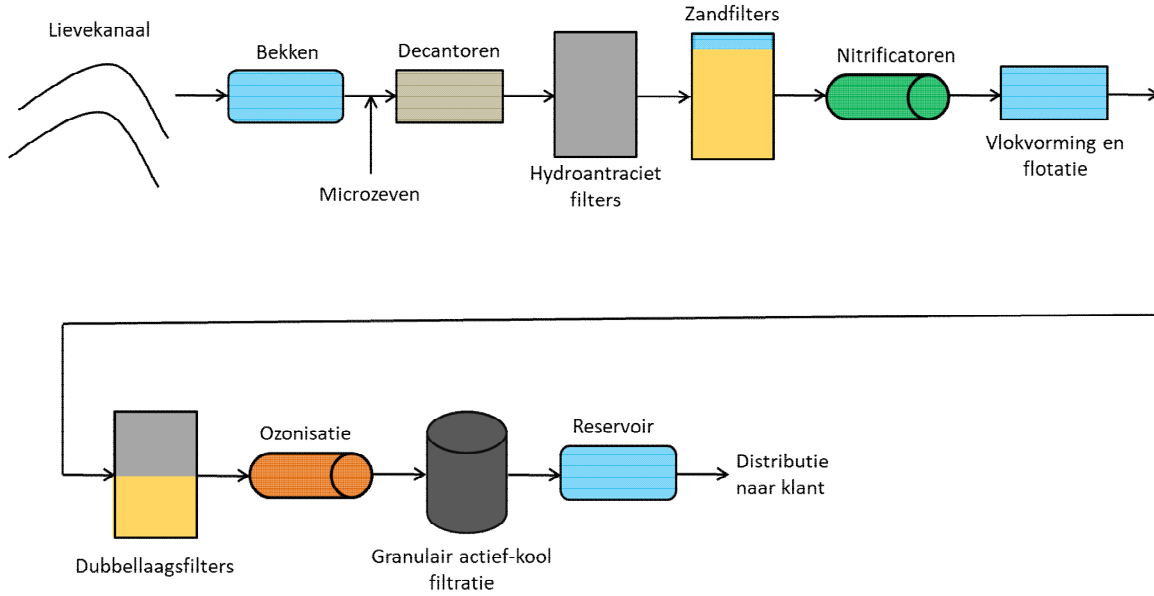
Evides, Ouddorp



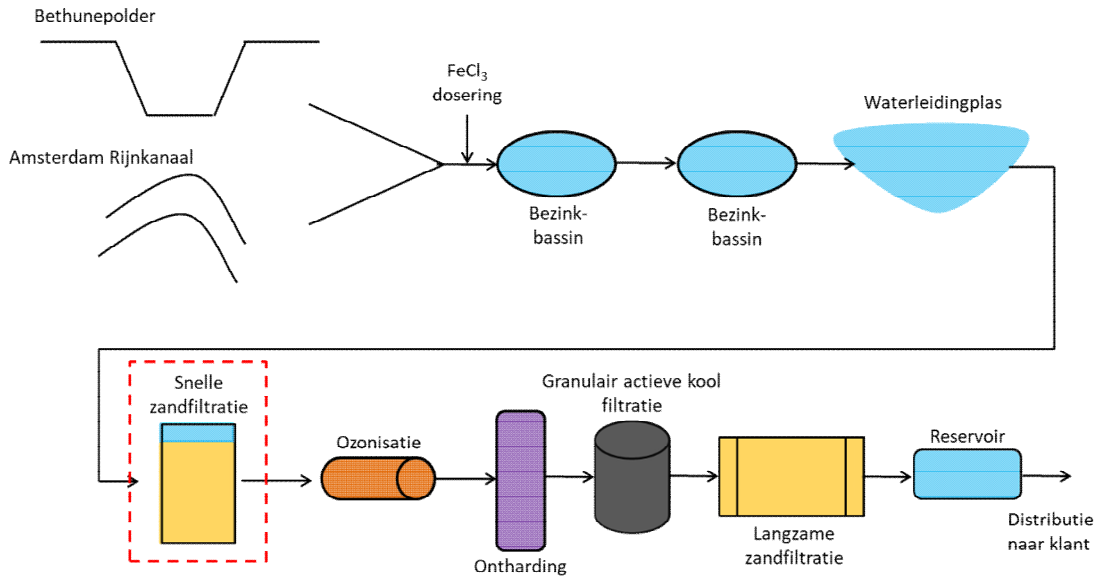
PWN, Andijk



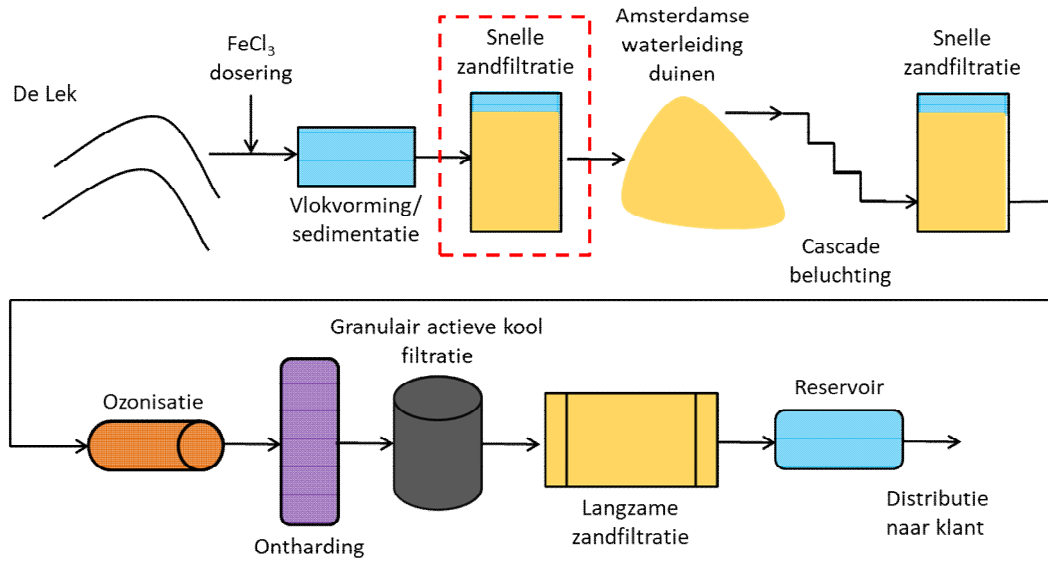
### De Watergroep, Kluzen



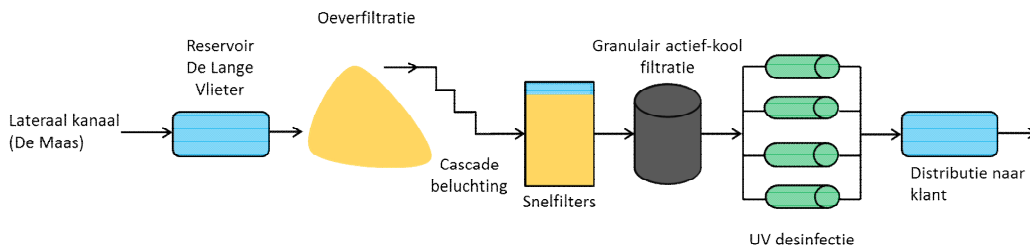
### Waternet, Loenderveen



Waternet, WRK

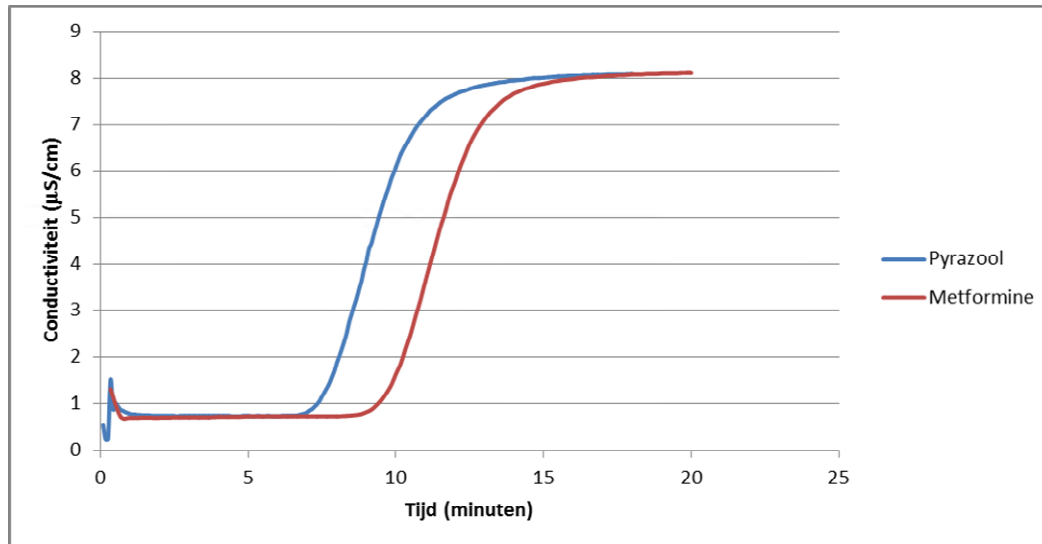


WML, Heel



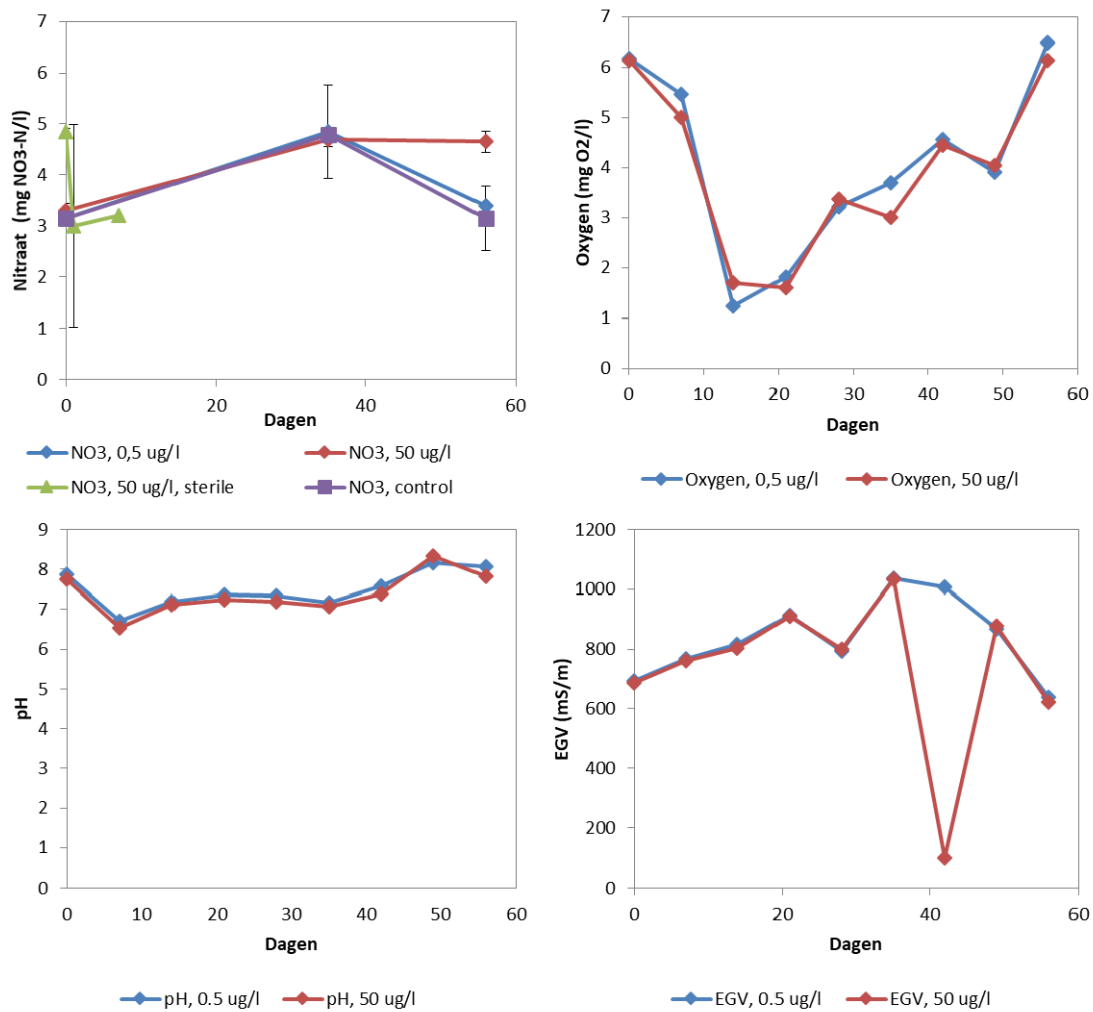
## VI Aanvullende resultaten afbraakexperimenten

### VI.1 Opzet kolomexperimenten

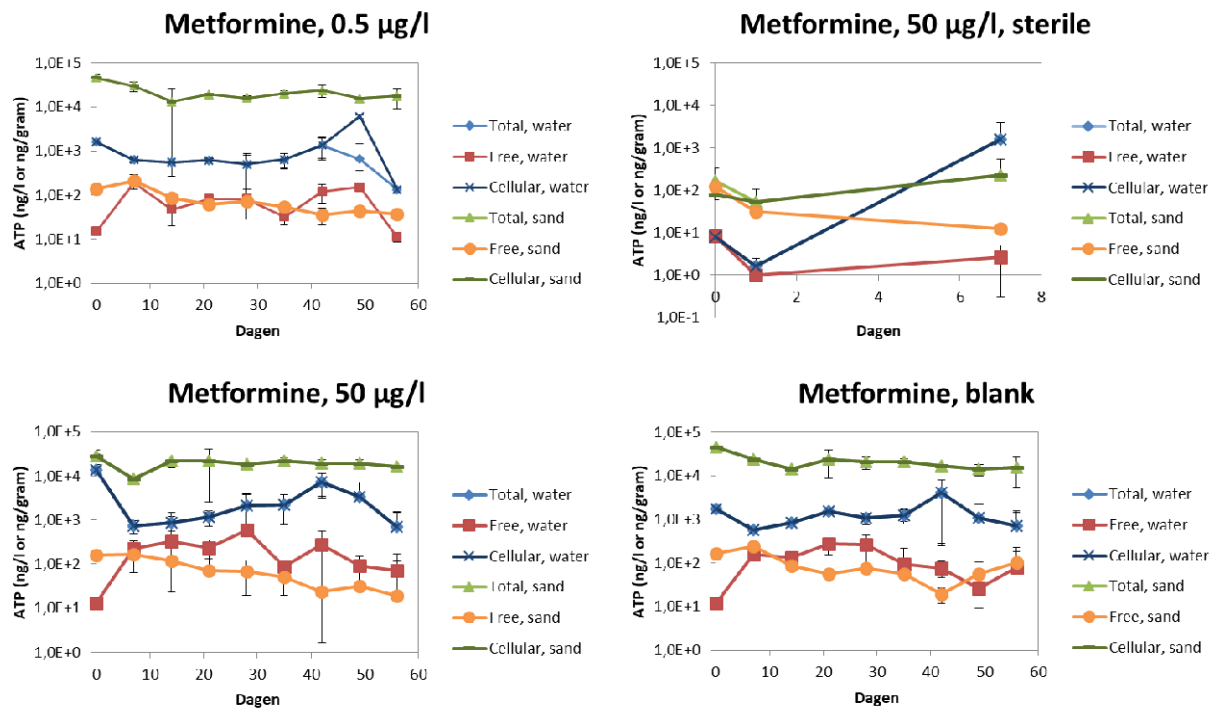


Figuur 32. Tracertest van beide kolommen (5 gram/l NaCl-oplossing).

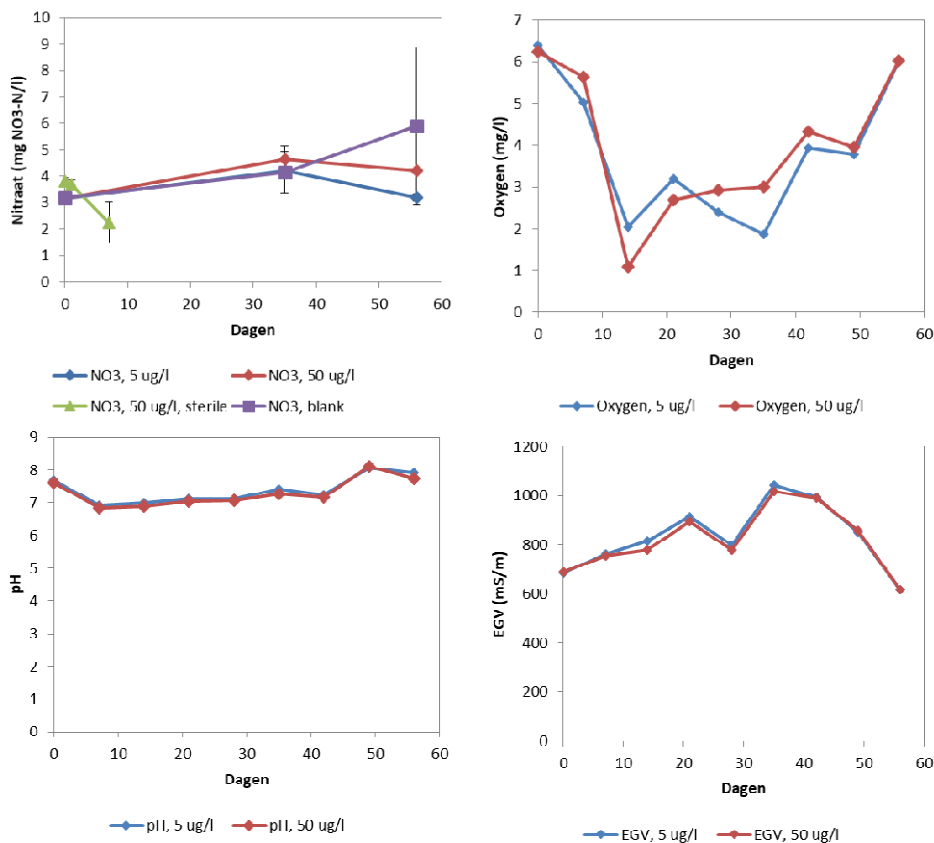
## VI.II Batchexperimenten metformine en pyrazool (hoofdstuk 5.1.1)



Figuur 33. Nitraatconcentratie (NO<sub>3</sub>), zuurstofgehalte (oxygen), pH en elektrische geleidbaarheid (EGV) in de metformine batchproeven met 0,5 µg/l of 50 µg/l metformine. Voor de nitraatconcentratie is het gemiddelde van twee flessen met SD-waarde gegeven. De overige parameters zijn in enkelvoud bepaald.

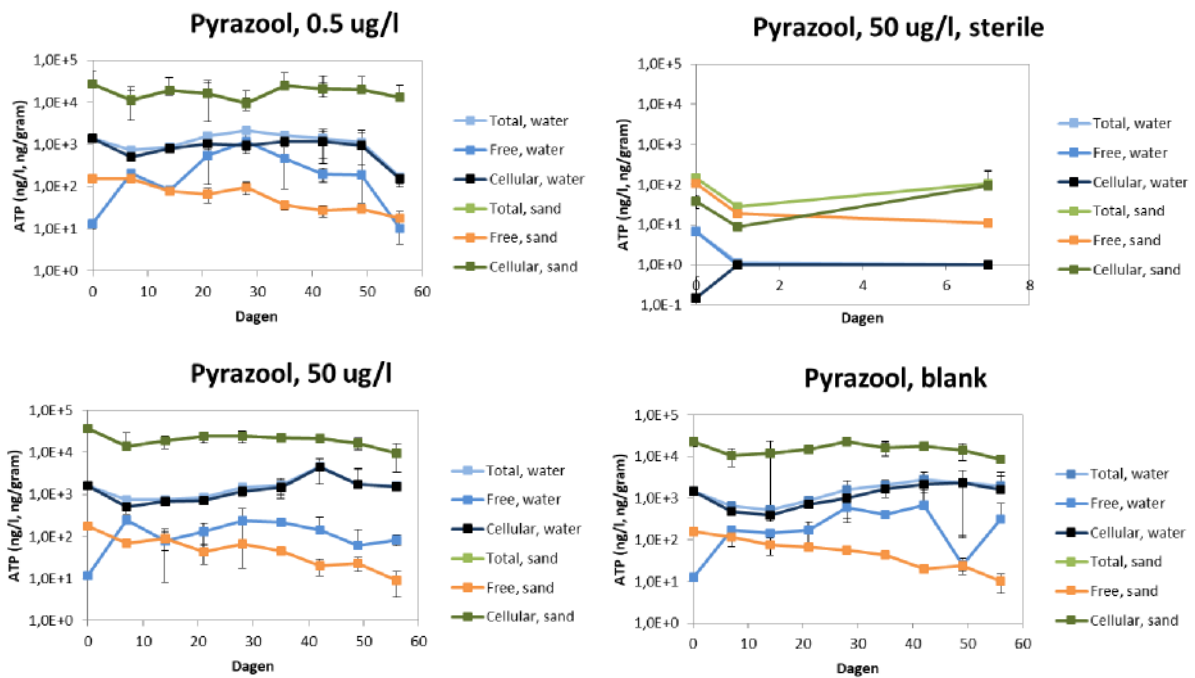


Figuur 34. ATP concentraties in water en filtermateriaal (sand) in de metformine batchproeven. Gegeven is het gemiddelde (n=2) met SD.



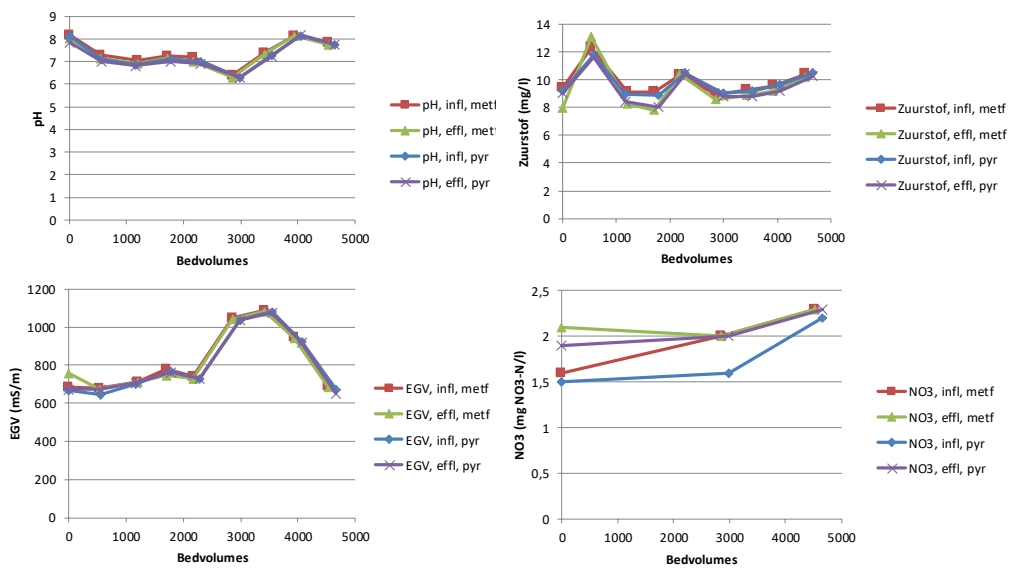
Figuur 35. Nitraatconcentratie (NO<sub>3</sub>), zuurstofgehalte (oxygen), pH en elektrische geleidbaarheid (EGV) in de pyrazool batchproeven met 5 µg/l of 50 µg/l pyrazool.



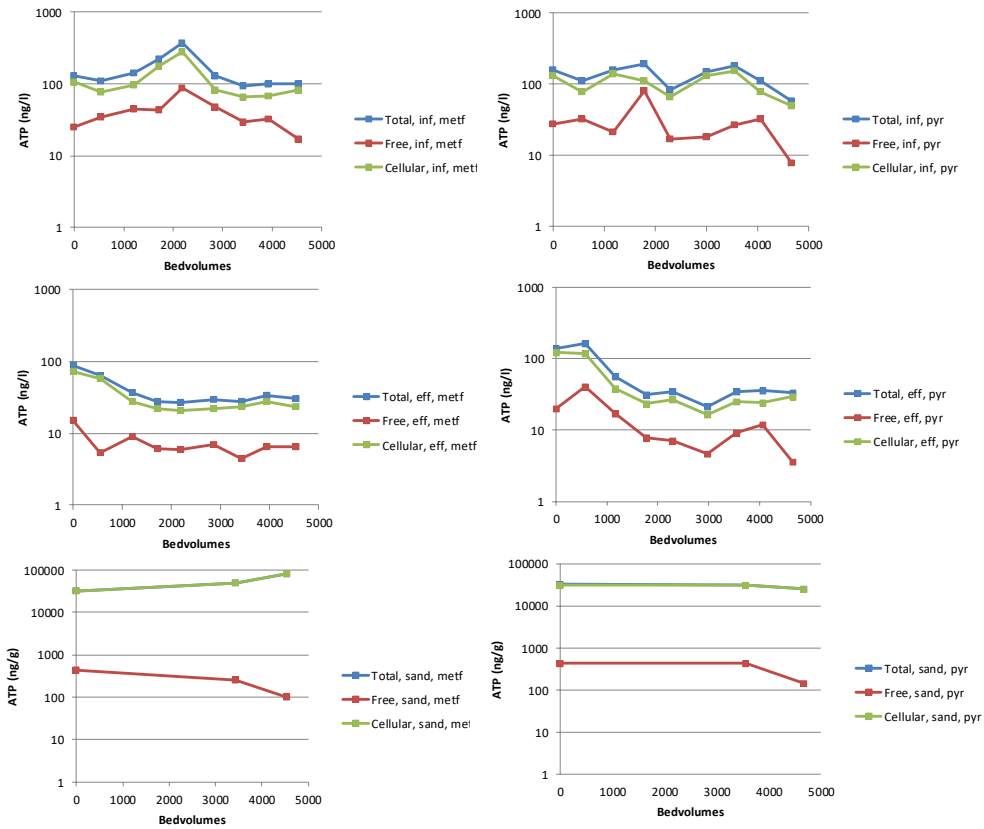


Figuur 36. ATP concentraties in water en filtermateriaal (sand) in de pyrazool batchproeven.

### VI.III Kolomexperimenten metformine en pyrazool (hoofdstuk 5.1.2)

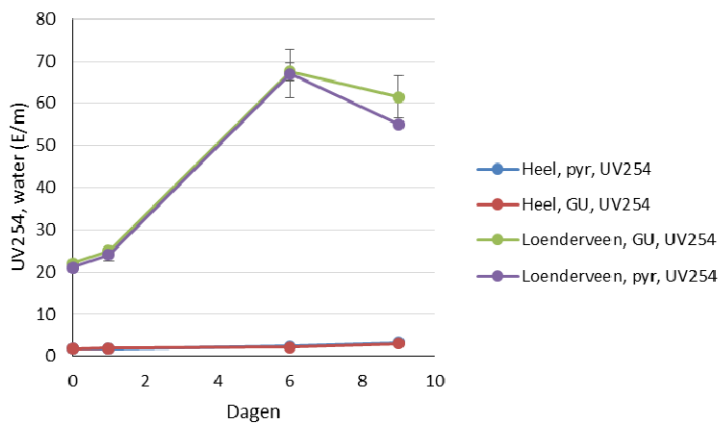


Figuur 37. Nitraatconcentratie (NO<sub>3</sub>), zuurstofgehalte, pH en elektrische geleidbaarheid (EGV) in de kolomproeven met 50 µg/l pyrazool (pyr) of 50 µg/l metformine (metf).

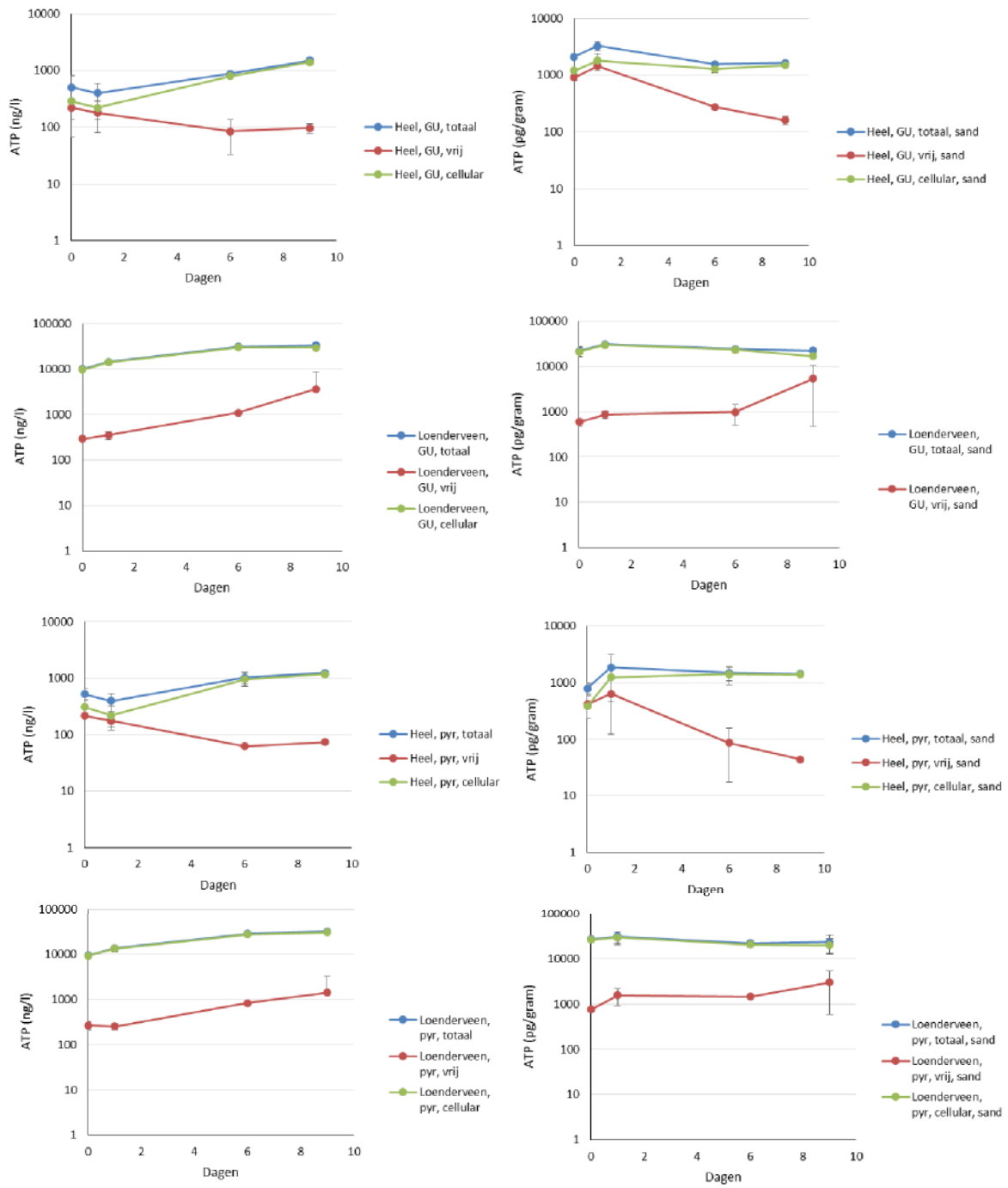


Figuur 38. ATP-gehalte (totaal, vrij, cellulair) in het influent (boven), effluent (midden) en zand (onder) van de kolomproeven met 50 µg/l pyrazool (pyr) of 50 µg/l metformine (metf).

## VI.IV Testexperiment Heel en Loenderveen (hoofdstuk 5.2.1)

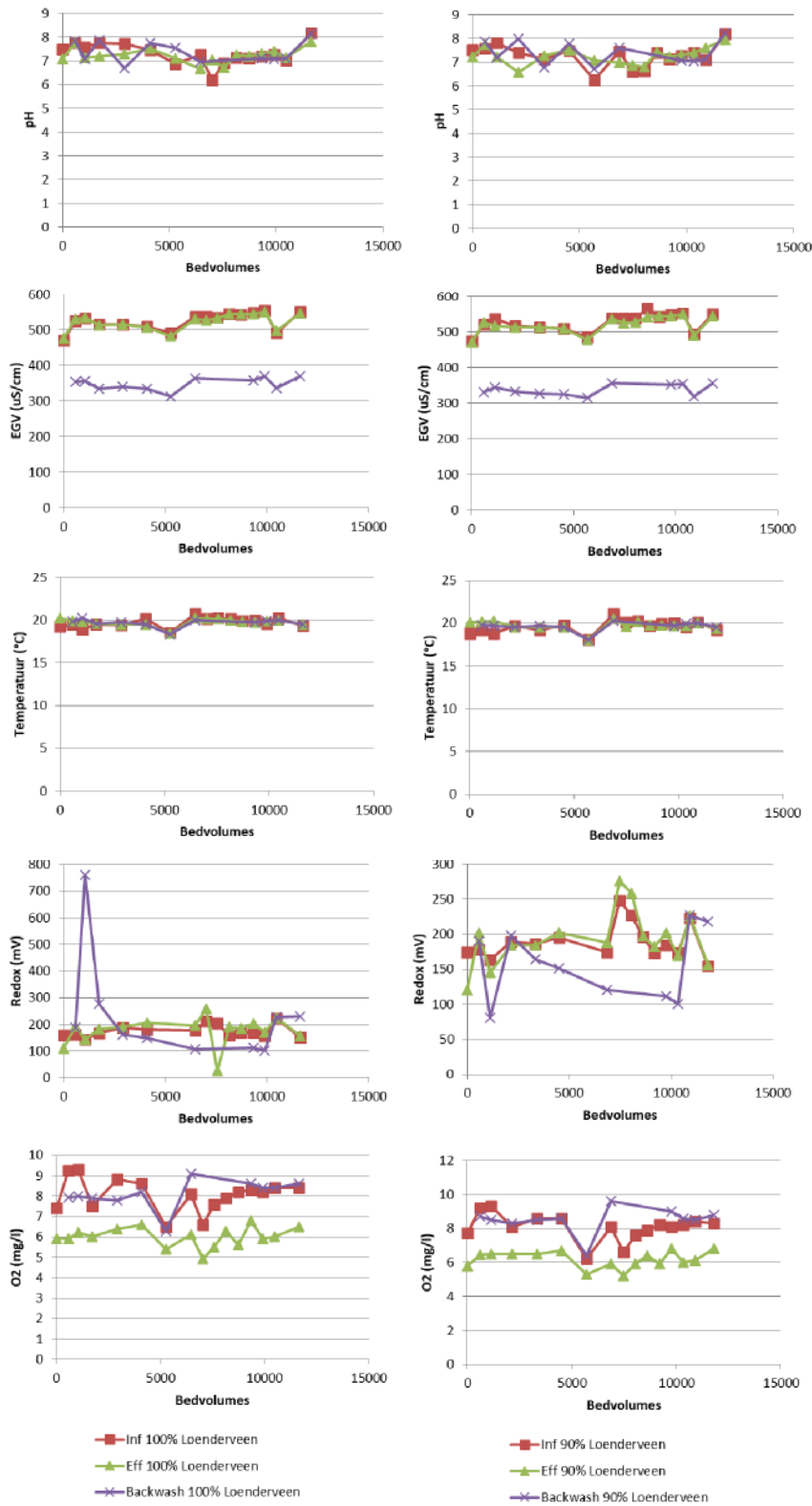


Figuur 39. UV<sub>254</sub> gehalten in water van de testexperimenten met filtermateriaal van Heel en Loenderveen. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD.

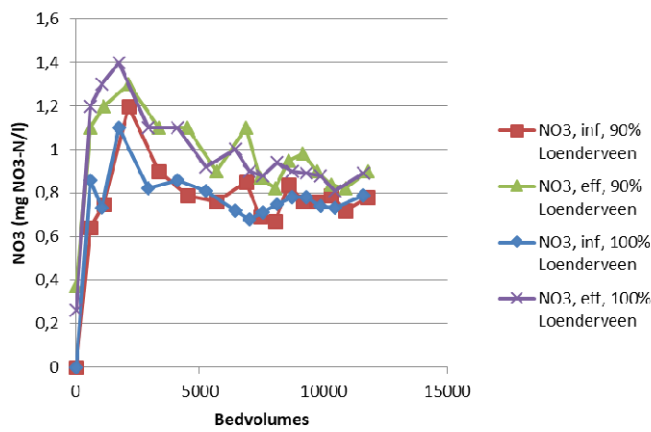


Figuur 40. ATP concentraties in filtermateriaal in de testexperimenten met filtermateriaal van Heel en Loenderveen waaraan 50 µg/l pyrazool of guanyureum is gedoseerd. Gegeven is het gemiddelde (N=2) met SD.

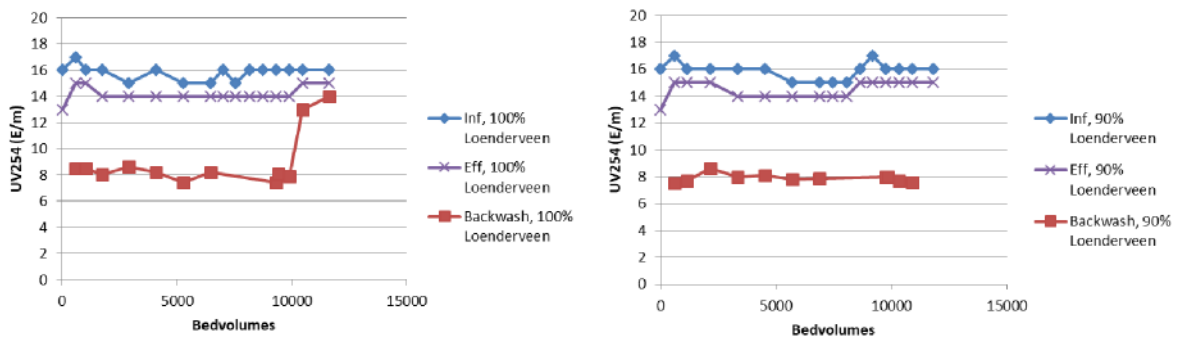
### VI.V Inoculatie-experiment Loenderveen + pyrazool (hoofdstuk 5.2.2)



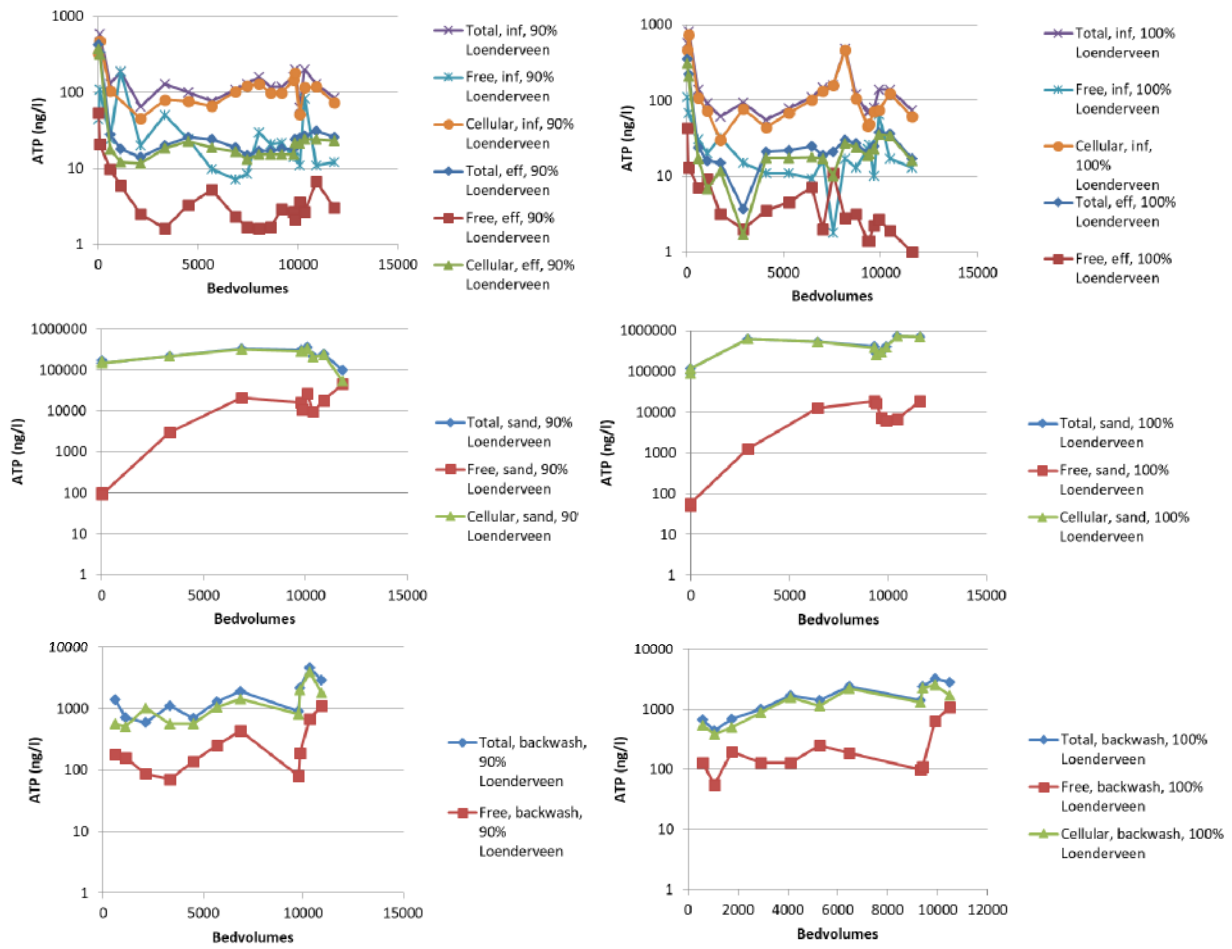
Figuur 41. pH, O<sub>2</sub>, EGV, redox en in het influent en effluent van de kolom met 100% Loenderveen filtermateriaal en in de kolom met 90% Loenderveen filtermateriaal en 10% filtermateriaal van de kolom die pyrazool kan verwijderen (zie hoofdstuk 5.1.2).



Figuur 42. NO<sub>3</sub>-concentraties in het influent en effluent van de kolom met 100% Loenderveen filtermateriaal en in de kolom met 90% Loenderveen filtermateriaal en 10% filtermateriaal van de kolom die pyrazool kan verwijderen (zie hoofdstuk 5.1.2).



Figuur 43. UV<sub>254</sub> gehalten in het influent en effluent van de kolom met 100% Loenderveen filtermateriaal (links) en in de kolom met 90% Loenderveen filtermateriaal en 10% filtermateriaal (rechts) van de kolom die pyrazool kan verwijderen (zie hoofdstuk 5.1.2).



Figuur 44. ATP-gehalten in het influent en effluent van de kolom met 100% Loenderveen filtermateriaal (rechts) en in de kolom met 90% Loenderveen filtermateriaal en 10% filtermateriaal (links) van de kolom die pyrazool kan verwijderen (zie hoofdstuk 5.1.2).

## VII Logboek kolomexperimenten

### VII.I Biologische verwijdering van metformine en pyrazool in kolom en batchexperimenten (hoofdstuk 5.1.1 en 5.1.2)

	Bedvolumes					Debiet				
	Dag	Pyr	Metf	Pyr/metf meting	Zand bemonsteren	Terugspoelen	Verversen tank	Pyr	Metf	Opmerkingen
16-okt-18	0	0	0	X (batch en 1 uur na doseren in kolom)	X (batch+kolom)			3,2	2,7	start
19-okt-18	3	237	239			X				
25-okt-18	9	733	697			X		3,2	3,2	
26-okt-18	10	820	782				X			
29-okt-18	13	1081	1036					3,2	3,2	
1-nov-18	16	1342	1291			X				
2-nov-18	17	1429	1376				X			
5-nov-18	20	1690	1630			X				
7-nov-18	22	1864	1800			X				
8-nov-18	23	1950	1885				X			
12-nov-18	27	2291	2176			X				
15-nov-18	30	2552	2431			X	X			
19-nov-18	34	2900	2770			X				
20-nov-18	35	2987	2855	X (batch+kolom)	X (batch)					
22-nov-18	37	3088	2956			X		1	1	
23-nov-18	38	3089	2983				X	3,3	3,2	
26-nov-18	41	3368	3255			X				
27-nov-18	42	3455	3340		X (kolom)					
29-nov-18	44	3629	3510			X				
30-nov-18	45	3696	3582			X	X			
3-dec-18	48	3971	3851			X				
6-dec-18	51	4232	4105			X				
7-dec-18	52	4295	4173				X			
9-dec-18	54	4481	4356			X				
11-dec-18	56	4655	4526	X (batch+kolom)	X (batch+kolom)	X				
13-dec-18	58	4829	4695			X				
14-dec-18	59	4891	4763				X			
17-dec-18	62	5166	5019			X				

21-dec-18	66	5489	5355			X	X	1	1	
3-jan-19	79	5823	5693			X				kolommen voor 1/4 droog
4-jan-19	80	5942	5795				X			
7-jan-19	83	6203	6049			X				
10-jan-19	86	6464	6304						5	nieuw soort kolom, minder hard terugspoelen
11-jan-19	87	6533	6385				X			
14-jan-19	90	6809	6783			X				
17-jan-19	93	7070	7180					3,2	1,7	metforminekolom droog (pomp te hoog: 5 ipv 3 l/h)
18-jan-19	94	7129	7225				X	3,2	3,2	
21-jan-19	97	7298	7482			X				pyrazookolom gebroken. Zand met water uit tank in koelkast gezet
24-jan-19	100	7298	7736	X (in tank)		X				pyrazookolom hersteld; Bemonsteren tank (voor verversen)
25-jan-19	101	7385	7803	X (in tank+kolom)	X (slib tank)		X			Bemonsteren tank (dag 1)
28-jan-19	104	7630	8060	X (in tank+batch)		X				Bemonsteren tank (dag 3); Herdosering batch (dag 0)
31-jan-19	107	7823	8250	X (in tank+batch)				0,75	1	Bemonsteren tank (dag 6); Herdosering batch (dag 3)
4-feb-19	111	7902	8356			X	X	3,1	3,1	
7-feb-19	114	8144	8588	X (in tank+batch)		X				Herdosering batch (dag 10)
8-feb-19	115	8241	8668	X			X			
11-feb-19	118	8468	8913			X				
14-feb-19	121	8713	9159			X				
15-feb-19	122	8810	9240				X			
18-feb-19	125	9055	9485			X				
21-feb-19	128	9300	9731			X				
22-feb-19	129	9378	9812				X			
25-feb-19	132	9623	10056			X				
28-feb-19	135	9868	10303			X				Vanaf nu terugspoelen met drinkwater
1-mrt-19	136	9947	10383				X	3,1	3,2	
4-mrt-19	139	10192	10636			X				
7-mrt-19	142	10437	10891			X				
8-mrt-19	143	10515	10974				X			
11-mrt-19	146	10760	11226			X				
14-mrt-19	149	11006	11481			X				
15-mrt-19	150	11084	11564				X			
18-mrt-19	153	11329	11816			X				
21-mrt-19	156	11574	12071			X				
22-mrt-19	157	11652	12154				X			
25-mrt-19	160	11898	12407			X				



28-mrt-19	163	12143	12661			X				
29-mrt-19	164	12221	12744				X			
1-apr-19	167	12466	12997			X				
4-apr-19	170	12711	13251			X				
5-apr-19	171	12790	13334				X			
8-apr-19	174	13035	13587			X				
11-apr-19	177	13280	13842			X				
12-apr-19	178	13358	13925				X			
15-apr-19	181	13603	14177			X				
18-apr-19	184	13848	14432			X				
19-apr-19	185	13927	14515				X			
22-apr-19	188	14172	14768			X				
25-apr-19	191	14417	15022			X				
26-apr-19	192	14495	15105				X			
29-apr-19	195	14740	15358			X				
2-mei-19	197									kolommen geleegd, zand in koelkast. Tanks, slangetjes, kolommen goed schoongemaakt

## VII.II Inoculatie-experiment (hoofdstuk 5.2)

	Bedvolumes					Debiet				Opmerkingen
	Dag	100% LV	90% LV	Pyr/metf meting	Zand bemonsteren	Terug-spoelen	Verversen tank	90% LV	100% LV	
3-mei-19							X	2	2	Vullen kolommen met LV-filtermateriaal (nog niet gemengd met WRK-filtermateriaal). Water uit proefplas bij Loenderveen gehaald, niet de waterleidingplas. Nog geen pyrazool gedoseerd
6-mei-19	0	0	0	X (na 1 uur)	X		X	3,2	3,2	Start inoculatie-experiment: WRK-filtermateriaal toegevoegd, 10% op basis van nat zand
7-mei-19	1	84	84	X						
9-mei-19	3	253	253			X				Pomp voert lucht aan in 90% kolom
10-mei-19	4	337	337				X			
13-mei-19	7	580	590	X						
14-mei-19	8	588	759			X	X	2,5	2,5	100% kolom kapot, vervangen door nieuwe kolom
16-mei-19	10	774	928			X				
17-mei-19	11	925	1012			X	X			
20-mei-19	14	1044	1131	X		X				90% kolom staat droog
24-mei-19	18	1202	1289				X	1,5	1,5	Pomp van 90% kolom gemaakt, geen lucht meer in kolom

3-jun-19	28	1774	2132	X		X			
6-jun-19	31	1867	2385			X			
7-jun-19	32	2069	2470				X	3,2	3,2
14-jun-19	39	2660	3060				X		
17-jun-19	42	2913	3337	X	X	X			
21-jun-19	46	3250	3674				X		
24-jun-19	49	3503	3927			X			
28-jun-19	53	3841	4265				X		Pomp 100% kolom vervangen
1-jul-19	56	4094	4510	X		X			
5-jul-19	60	4769	4932				X		
12-jul-19	67	5696	5522				X		
15-jul-19	70	5275	5691	X					
19-jul-19	74	6273	6028				X		
29-jul-19	84	6455	6872	X	X	X			
2-aug-19	88	6793	7209				X		
5-aug-19	91	7022	7462						
9-aug-19	95	7328	7799				X		
12-aug-19	98	7557	8044			X			
16-aug-19	102	7895	8371				X		
19-aug-19	105	8148	8616			X			
23-aug-19	109	8485	8943				X		
26-aug-19	112	8738	9188	X		X			
30-aug-19	116	9075	9515	X	X	X			
2-sep-19	119	9328	9760	X (na 1 uur)	X	X	X		
3-sep-19	120	9410	9842	X	X				
6-sep-19	123	9655	10087	X	X		X		
9-sep-19	126	9902	10332	X	X	X			
13-sep-19	130	10230	10659				X		
16-sep-19	133	10476	10904	X	X	X			
20-sep-19	137	10805	11231				X		
23-sep-19	140	11051	11149			X			
27-sep-19	144	11379	11803				X		
30-sep-19	147	11632	11803	X	X	X			Laatste dag experiment