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 2022.042 | augustus 2022

Bioremediatie van snelfilters voor verwijdering van organische microverontreinigingen

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Bioremediatie van snelfilters voor verwijdering van organische microverontreinigingen

BTO 2022.042 | augustus 2022

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

Opdrachtnummer

402045/264

Projectmanager

Erwin Beerendonk

Opdrachtgever

BTO – Thematisch onderzoek - Zuivering

Auteur(s)

Peer Timmers, Maria Lousada Ferreira, Wolter Siegers

Kwaliteitsborger(s)

Paul van der Wielen

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Biologische verwijdering, OMV, microverontreinigingen, snelle zandfiltratie, bioremediatie, bioaugmentatie, biostimulatie

Jaar van publicatie
2022

Meer informatie

Dr. Peer H.A. Timmers
T +31 30 606 9636
E peer.timmers@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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



augustus 2022 ©

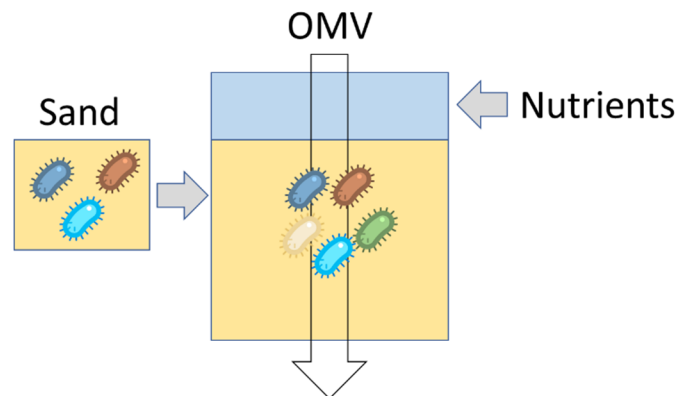
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Bioremediatie van snelfilters voor verwijdering van organische microverontreinigingen

Auteur(s) Peer Timmers, Maria Lousada Ferreira, Wolter Siegers

Snelle zandfiltratie wordt al decennia gebruikt tijdens drinkwaterproductie voor de verwijdering van o.a. zwevende stof, organisch en anorganisch materiaal, maar kan ook ingezet worden voor verwijdering van organische microverontreinigingen (OMV). In dit project is onderzocht of OMV-verwijdering gestimuleerd kan worden in snelle zandfilters door bio-augmentatie (i.e. enten van snelle zandfilters met materiaal van een ander zandfilter) of biostimulatie (i.e. toevoegen van nutriënten die groei van micro-organismen stimuleren). Resultaten van kolomexperimenten met snelle zandfiltermateriaal tonen dat van de 10 gedoseerde OMV, acesulfaam, gabapentine, en metoprolol biologisch verwijderd werden en dat bio-augmentatie en biostimulatie effectief kunnen zijn voor een snellere en/of verbeterde verwijdering van deze stoffen. Toepassing hiervan op grote schaal is mogelijk, maar meer onderzoek is nodig naar met name een breder scala aan OMV, langetermijneffecten en seizoenschommelingen in het te zuiveren water en de kweek en het enten van verantwoordelijke micro-organismen.



Schematische weergave van de snel-zandfilter-experimenten waarbij OMV werden gedoseerd. Vooraf werd in een deel van de experimenten geënt met zandfiltermateriaal uit een ander snel zandfilter (bio-augmentatie) en tijdens werden in een deel van de experimenten nutriënten toegevoegd (biostimulatie)

Belang: Verwijdering van OMV

Met organische microverontreinigingen (OMV) wordt een breed scala stoffen bedoeld met verschillende fysisch/chemische eigenschappen, die in lage concentraties in oppervlaktewater en grondwater voorkomen. Deze stoffen moeten worden verwijderd met aanvullingen en/of aanpassingen in het huidige zuiveringsproces voor drinkwaterproductie. Het is daarom belangrijk om te onderzoeken of aanpassingen aan het huidige proces een verbeterde verwijdering van OMV kunnen opleveren.

Biologische processen zoals snelle zandfiltratie worden toegepast in de zuivering om specifieke componenten te verwijderen en chemisch stabiel en veilig water te produceren. Snelle zandfiltratie kan mogelijk ook ingezet worden voor verwijdering van OMV en zo complementair aan of zelfs een alternatief zijn voor de huidige technieken om OMV te verwijderen, die vaak veel energie- of chemicaliën vergen. Er zijn steeds meer indicaties dat snelle zandfilters een breed scala aan OMV (deels) biologisch kunnen verwijderen. Mits operationeel

mogelijk, is er waarschijnlijk geen grote extra investering nodig om snelle zandfilters te optimaliseren voor OMV-verwijdering. Hierdoor kunnen snelle zandfilters een duurzame en milieuvriendelijke oplossing zijn voor de verwijdering van OMV.

Aanpak: biologische verwijdering van OMV tijdens snelle zandfiltratie

In dit project is onderzocht of OMV-verwijdering gestimuleerd kan worden in snelle zandfilters door bio-augmentatie (enten van snelle zandfilters met materiaal van een ander filter) of biostimulatie (toevoegen van stoffen die groei van micro-organismen stimuleren). De proefopzet is omschreven in de Figuur hierboven en er zijn tijdens de experimenten 10 verschillende OMV gedoseerd.

Resultaten: Verbeterde verwijdering van OMV na bio-augmentatie en biostimulatie

De resultaten van de kolomexperimenten met snelle-zandfiltermateriaal tonen dat van de 10 gedoseerde OMV, acesulfaam, gabapentine, en metoprolol biologisch verwijderd werden en dat bio-augmentatie en biostimulatie effectief kunnen zijn voor een snellere en/of verbeterde verwijdering van deze stoffen. Gabapentine en metoprolol werden bijvoorbeeld voor 0% en maximaal 40% verwijderd (resp.) in een niet-geënte kolom en voor 99% verwijderd in geënte kolommen. Daarnaast zijn er indicaties dat de biologische verwijdering metabolisch van aard is, waarbij microorganismen de

OMV gebruiken als energie -en koolstofbron, met behulp van zuurstof of nitraat. Er was een negatieve relatie tussen OMV verwijdering en nitrificatie. Voor sommige stoffen leek verwijdering vooral via adsorptie te verlopen, zoals voor propranolol. Andere stoffen werden adsorptief en/of biologische verwijderd zoals diclofenac, en voor sommige was dit van zeer geringe aard zoals voor PFOA, carbamazepine, benzotriazol, amidotrizoïne zuur en iopamidol.

Toepassing: bioremediatie van snelle zandfilters

Voordat biostimulatie en/of bio-augmentatie full-scale toegepast kunnen worden, wordt aangeraden nog een aantal aspecten te onderzoeken, zoals de wijze en tijdstip van enten. De lange termijn-effecten en schommelingen in aanwezigheid en concentraties van OMV, nutriënten en omgevingsfactoren zoals temperatuur zijn ook nog niet onderzocht. Ook wordt aangeraden om de verwijdering van een groter scala aan OMV te onderzoeken en mogelijk te variëren met contacttijden van het filter. Als laatste wordt aangeraden om de OMV-verwijderende micro-organismen te kweken, zodat gericht geënt kan worden en de aanwezigheid en groei gemakkelijker te monitoren is zodat optimale omstandigheden beter onderzocht kunnen worden.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Bioremediatie van snelfilters voor verwijdering van organische microverontreinigingen* (BTO-xxxx.xxx).

Meer informatie

Dr. Peer H.A. Timmers
T +31 30 609 9636
E peer.timmers@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands



Samenvatting

Biologische processen zoals biologisch actief kool, snelle zandfiltratie en langzame zandfiltratie worden momenteel niet specifiek ingezet voor het verwijderen van OMV, maar uit recente studies is gebleken dat zij dit potentieel of deze capaciteit wel bezitten. Er zijn namelijk steeds meer indicaties dat snelle zandfilters een breed scala aan OMV biologisch kunnen verwijderen. Er is voor het gebruik van snelfilters waarschijnlijk geen grote extra investering nodig om het proces te optimaliseren voor OMV-verwijdering. Hierdoor kunnen ze mogelijk complementair of zelfs een duurzaam en milieuvriendelijk alternatief zijn voor de huidige energie- of chemicaliën-intensieve technieken voor OMV-verwijdering.

Het hier beschreven onderzoek is een vervolg op “Biologische verwijdering van pyrazool, metformine, guanylureum, melamine en urotropine in snelle zandfilters” (Bertelkamp et al. 2017) en “Biologische afbraak van organische microverontreinigingen in snelfilters van de drinkwaterzuivering” (van Bel, Bertelkamp et al. 2020). In vorig onderzoek is inzicht verkregen in de biologische verwijdering van een breed scala aan OMV in full-scale zandfilters van de Nederlandse drinkwaterbedrijven en De Watergroep en de verwijderingsmechanismen van pyrazool en metformine in verschillende laboratorium- en proefhalinstallatie experimenten. Een veelbelovend aspect uit die studies was het bioaugmentatie-experiment waarbij een snelfilter dat minder goed OMV verwijderde (uit Loenderveen) was geënt met filtermateriaal dat beter OMV verwijderde (uit Nieuwegein, hierna WRK) en waarvan de resultaten lieten zien dat de OMV-verwijdering van het geënte filter hoger was dan van het niet-geënte filter.

In dit vervolgonderzoek is ingegaan op de openstaande punten die uit het voorgaande onderzoek zijn gekomen, zoals 1) het effect van bioaugmentatie op de verwijdering van een andere selectie OMV dan melamine, urotropine, metformine, guanylurea en pyrazool; 2) de limiterende factoren voor OMV-verwijdering en bioaugmentatie; en 3) de nutriënten die verwijdering stimuleren om zo te achterhalen of de verwijdering metabolisch of co-metabolisch is.

Er zijn daarom nieuwe kolomexperimenten uitgevoerd met snelfiltermateriaal van dezelfde locatie als het vorige onderzoek (Loenderveen). Deze kolommen ontvingen allen water van de Waterleidingplas met een OMV-mix bestaande uit acesulfaam, amidotrizoïnezuur, benzotriazool, carbamazepine, diclofenac, iopamidol, metoprolol, propranolol, gabapentine en perfluorooctaanzuur (PFOA). Daarnaast zijn de volgende condities onderzocht, zoals 1) biostimulatie met een nutriëntenoplossing van ammonium, nitraat en fosfaat en 2) met een oplossing van vitamines en sporenelementen, en 3) bioaugmentatie door wel of niet te enten met 10% filtermateriaal van WRK.

De resultaten toonden dat bioremediatie (bioaugmentatie en biostimulatie) effectief bleek om de afbraak van acesulfaam, gabapentine en metoprolol door snelle zandfiltratie te versnellen en te verbeteren. Het toevoegen van WRK-zandfiltermateriaal (bioaugmentatie), samen met nutriënten die de groei van deze micro-organismen versnellen (biostimulatie), zorgde voor verwijdering van deze drie OMV die het Loenderveen-filter normaal minder goed of minder snel zou verwijderen. Bioaugmentatie en biostimulatie met nutriënten en vitamine/sporenelementen resulteerden in 99% verwijdering van **gabapentine** en **metoprolol** na 38 dagen, en van **acesulfaam** na 52 dagen. De bioaugmenteerde kolom die geen nutriënten kreeg liet pas na 52 dagen 99% verwijdering van gabapentine en metoprolol zien, en pas na 80 dagen van acesulfaam. De kolom die niet gebioaugmenteerd was toonde geen verwijdering van gabapentine, minder dan 40% verwijdering van metoprolol en 99% verwijdering van acesulfaam na 80 dagen incubatie. OMV verwijdering vertoonde een negatieve relatie met nitrificatie en microbiële gemeenschapsanalyse toonde een negatieve relatie met nitrificerende micro-organismen. Daarnaast was voornamelijk de relatieve aanwezigheid van micro-organismen met een aerob (met zuurstof) of denitrificerend (met nitraat) en heterotroof (OMV als koolstof- en energiebron) metabolisme gecorreleerd aan de

verwijdering van acesulfaam, gabapentine en/of metoprolol. Voor sommige stoffen leek verwijdering vooral via adsorptie te verlopen, zoals voor **propranolol**, met 30-55% verwijdering. Andere stoffen lieten wel adsorptie en/of biologische verwijdering zien, zoals **diclofenac** met 40-60% verwijdering. Verwijdering van **PFOA**, **carbamazepine**, **benzotriazool**, **amidotrizoïne zuur** en **iopamidol** trad nauwelijks (< 20%) op in de bestudeerde zandfilterkolommen.

Deze resultaten tonen dus aan dat bioaugmentatie, met of zonder biostimulatie, de biologische verwijdering van acesulfaam, gabapentine en metoprolol kan verhogen en/of versnellen. Omdat verschillende full-scale snelfilters variëren in de capaciteit om OMV te verwijderen, kan bioaugmentatie mogelijk een goedkope en duurzame manier zijn om OMV-verwijdering te verbeteren in snelfilters, mits het een robuust proces blijkt te zijn. Daarbij versnelt biostimulatie ook nog eens de biologische verwijdering van deze drie OMV. Voordat biostimulatie en/of bioaugmentatie kan worden toegepast in full-scale snelfilters, wordt aangeraden om de volgende aspecten te onderzoeken: 1) implementatietechnieken van bioaugmentatie van minder dan 10% snelfiltermateriaal bovenop een full-scale snelfilter, 2) de langetermijneffecten van bioaugmentatie en biostimulatie op OMV-verwijdering, 3) invloed van seizoenvariëaties van bepaalde condities (temperatuur, nutriënten, OMV concentraties etc.), 4) invloed van variaties in contacttijd, 5) de verwijderingscapaciteit van een breder spectrum van OMV na bioaugmentatie, en 6) het kweken van de OMV verwijderende micro-organismen zodat bioaugmentatie gericht en gestuurd toegepast kan worden.

Inhoud

1	Inleiding	8
1.1	Verwijdering van organische microverontreinigingen tijdens snelle zandfiltratie	8
1.2	Aanleiding	9
1.3	Leeswijzer en opzet onderzoek	10
2	Vooronderzoek	11
2.1	Keuze en motivatie selectie OMV	11
2.2	Bepalende en limiterende factoren voor biologische verwijdering	13
2.2.1	Energie- en koolstofbron (substraat) en nutriënten	13
2.2.2	Temperatuur	14
2.2.3	Biologische verwijderingsmechanismen (metabool vs co-metabool)	16
2.2.4	Limiterende factoren tijdens biologische verwijdering van selectie van OMVs	17
3	Materiaal en methoden	23
3.1	Experimentele opzet	23
3.1.1	Limiterende factoren en influent water voor kolom experimenten	23
3.1.2	Kolom experimenten	25
3.2	Analyse operationele parameters en microverontreinigingen	30
3.3	Microbiële populatieanalyse	32
4	Resultaten	32
4.1	Analyse OMV in doseeroplossingen	32
4.2	EGV, pH, O ₂ , temperatuur	33
4.3	Ammonium en nitraat	34
4.4	Adsorptie OMV aan zandmateriaal	36
4.5	Verwijdering OMV in filtraat	37
4.6	Microbiële populatieanalyse	48
4.6.1	Microbiële compositie	48
4.6.2	Correlaties met ammoniumverwijdering	52
4.6.3	Correlaties met OMV-verwijdering	53
5	Discussie	59
5.1	OMV verwijdering	59
5.2	Microbiële populatieanalyse	63
5.3	Bioremediatie	63
5.3.1	Bioaugmentatie met zandfiltermateriaal	63
5.3.2	Biostimulatie	65

5.3.3	Bioaugmentatie met ophopingsculturen en reinculturen	65
6	Conclusies en aanbevelingen	67
6.1	Conclusies	67
6.2	Aanbevelingen	68
7	Referenties	71

1 Inleiding

1.1 Verwijdering van organische microverontreinigingen tijdens snelle zandfiltratie

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

Veel gebruikte zuiveringsprocessen voor het verwijderen van OMV zijn membraanfiltratie, actieve-koolfiltratie, en (geavanceerde) oxidatieprocessen. Deze zuiveringsprocessen zijn allen in staat om een groot deel aan OMV te verwijderen, maar hebben ook het nadeel dat ze vaak energie-intensief zijn en gebruik maken van chemicaliën. Biologische processen, zoals ze plaatsvinden in (zand en/of multimedia) snelfilters, oeverfiltratie, biologisch actieve-koolfiltratie, duinpassage en langzame-zandfiltratie zijn aanwezig in de meeste Nederlandse drinkwaterzuiveringen om microbiologisch en chemisch stabiel en veilig drinkwater 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 door fysisch-chemische zuiveringsprocessen.

Diverse wetenschappelijke studies hebben aangetoond dat deze biologische processen een verscheidenheid aan OMV kunnen verwijderen (Rattier, Reungoat et al. 2012, Zearley and Summers 2012, Bertelkamp, Reungoat et al. 2014, D'Alessio, Yoneyama et al. 2015, Hijnen 2016, Hollender, Rothardt et al. 2018). Doordat biologische processen in veel Nederlandse drinkwaterzuiveringen al aanwezig zijn, is dus (vaak) geen grote extra investering nodig om een nieuw proces te implementeren. Hierdoor zouden biologische zuiveringsprocessen een relatief goedkope, duurzame en milieuvriendelijke oplossing kunnen zijn voor de verwijdering van OMV, mits het toepasbaar is in full-scale.

Momenteel is het nog grotendeels onbekend welke typen OMV en in welke mate deze afgebroken kunnen worden in biologische zuiveringsprocessen van drinkwaterzuiveringen in Nederland en België (De Watergroep). Daarnaast is er nog weinig kennis over de microbiële processen 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 snelle-zandfiltratie. Snelle zandfilters 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 granulair actieve-koolfiltratie en langzame-zandfiltratie.

Snelle-zandfiltratie is een proces dat al vele jaren wordt toegepast bij de productie van drinkwater uit diverse bronnen (Hofman-Caris, 2019). Hoofdzakelijk wordt snelle-zandfiltratie toegepast om gesuspendeerde deeltjes, metaaloxiden en ammonium te verwijderen uit de waterstroom in het filterbed. Metaaloxiden ontstaan na beluchting van anaeroob (grond)water of dosering van een coagulant aan zuurstofrijk water met neutrale pH. Het ammonium wordt biologisch omgezet naar nitraat (nitrificatie) in aanwezigheid van zuurstof. Naast deze processen, spelen andere biologische processen ook een rol. Zo kan methaan biologisch geoxideerd worden (tot kooldioxide en water), opgelost mangaan en ijzer (deels) biologisch geoxideerd worden naar mangaan- of ijzeroxiden in aanwezigheid van zuurstof.

Er zijn steeds meer indicaties dat snelle-zandfilters een breed scala aan OMV kunnen verwijderen. Het is nog niet duidelijk in hoeverre OMV-verwijdering in snelfilters vooral biologische omzetting betreft of ook fysisch/chemische processen zoals sorptie. De omzetting van OMV in zandfilters kan namelijk verlopen via sorptie aan het filtermateriaal, maar ook door sorptie aan de gevormde metaaloxides, waarbij de vorming van die metaaloxides deels door biologische activiteit komt. De biologisch gevormde metaaloxides hebben een andere structuur dan de fysisch/chemisch gevormde metaaloxides, wat ook een effect kan hebben op sorptie en afbraak van OMV (Wang, de Ridder et al. 2021). Tevens treedt verwijdering van OMV op tijdens andere, dominante biologische processen, zoals nitrificatie en methaanoxidatie (Wang, de Ridder et al. 2021). Er zijn indicaties dat een aantal medicijnresten en pesticiden biologisch worden omgezet in snelle-zandfilters (Benner, Helbling et al. 2013). Zearley and Summers (2012) hebben het lot van 34 OMV, waaronder pesticiden en medicijnresten, in zandfilters onder laboratoriumcondities onderzocht, waarbij sommige OMV niet verwijderd werden (atrazine, carbamazepine, en diuron) en andere OMV bijna compleet verwijderd werden (ibuprofen, 2-methylisoborneol en triclosan (Zearley and Summers 2012). Ander onderzoek heeft aangetoond dat cafeïne en atenolol zeer gemakkelijk verwijderd worden in snelle-zandfilters, waarbij adsorptie en biologische omzetting beide een rol spelen. Daarnaast zijn er indicaties dat methyltert-butyl ether (MTBE), methylchlor-o-phenoxypropionic acid (MCP), 2-methylisoborneol (MIB), geosmine en 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) worden verwijderd in zandfilters (Benner, Helbling et al. 2013, Shimabuku, Zearley et al. 2019). De OMV MCP, bentazon, glyfosfaat en *p*-nitrofenol werden verwijderd in batchexperimenten met zand uit full-scale snelfilters die werden gevoed met grondwater (Hedegaard and Albrechtsen 2014). De OMV naproxen, carbamazepine, atrazine, trimethoprim, sulfamethoxazol, en sulfadiazine werden alleen goed omgezet bij een langere contacttijd (4 uur), dat aantoont dat biologische omzetting een dominante rol speelt voor de omzetting van deze OMV (Zhou, Wang et al. 2022).

1.2 Aanleiding

Het onderzoek dat in dit rapport beschreven is, betreft een vervolgonderzoek op 1) “Biologische verwijdering van pyrazool, metformine, guanylureum, melamine en urotropine in snelle zandfilters” (Bertelkamp et al. 2017) en 2) “Biologische afbraak van organische microverontreinigingen in snelfilters van de drinkwaterzuivering” (van Bel, Bertelkamp et al. 2020). Deze BTO-onderzoeken hadden als doel om inzicht te krijgen in de biologische verwijderingsprocessen van OMV in snelfilters tijdens drinkwaterproductie. In het eerstgenoemde onderzoek zijn experimenten met enten van filterzand op laboratorium- en pilot-schaal uitgevoerd. Afhankelijk van de duur van de experimenten en de hoogte van de dosering werden metformine, guanylurea en pyrazool al dan niet beter verwijderd na enten.

Het tweede onderzoek bestond uit meetcampagnes en verwijderingsexperimenten onder laboratoriumcondities. In de meetcampagne zijn acht full-scale snelle-zandfilters van de Nederlandse drinkwaterbedrijven en De Watergroep bemonsterd om vast te kunnen stellen welke OMV deze filters konden verwijderen en ook in welke mate. Het bleek dat snelfilters in staat zijn om een groot aantal OMV effectief te verwijderen en dat bepaalde snelfilters, zoals het WRK-snelfilter, OMV beter verwijderde dan andere snelfilters, zoals het Loenderveen-snelfilter (Di Marcantonio, Bertelkamp et al. 2020), (van Bel, Bertelkamp et al. 2020). Het doel van de meetcampagne was ook om één of meerdere OMV te vinden die goed verwijderd werden in de snelfilters. Metformine werd aangetroffen in het influent van de meeste snelfilters en bleek goed te worden verwijderd in de snelfilters van de WRK in Nieuwegein, maar slecht te worden verwijderd in de snelfilters van Loenderveen. Pyrazool werd gekozen om te onderzoeken 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.

De verwijderingsexperimenten zijn in het tweede onderzoek uitgevoerd met een dosering van metformine en pyrazool en WRK-zandfiltermateriaal in kolommen en flessen. Beide stoffen lieten goede verwijdering zien in deze experimenten. Daarom werd gekozen om op laboratoriumschaal te onderzoeken of enten van een snelfilter, dat

minder goed OMV verwijderde (Loenderveen-materiaal), met filtermateriaal dat beter OMV verwijderde (WRK-materiaal) effectief was om pyrazoolverwijdering op te starten. Uit dit bioaugmentatie-experiment bleek dat een ent van 10% filtermateriaal na ongeveer vier weken resulteerde in 20 – 40% biologische afbraak van pyrazool. Een verdere toename in verwijdering leek niet mogelijk in de gebruikte experimentele opzet. Een controlekolom die niet geënt was, vertoonde geen afbraak van pyrazool na vier weken. Ook tijdens tiendaagse batchverwijderingsexperimenten met Loenderveen-materiaal trad geen verwijdering op. Dit resultaat toont aan dat bioaugmentatie van pyrazool-verwijderend filtermateriaal op filtermateriaal dat pyrazool niet verwijderd, de verwijdering van pyrazool stimuleert (van Bel, Bertelkamp et al. 2020). Deze resultaten zijn een duidelijke aanwijzing dat het hier om een biologisch-gedreven proces gaat en dat bioaugmentatie effectief kan zijn.

De reden waarom de verwijdering tijdens het bioaugmentatie-experiment niet verder toenam is niet achterhaald. Voordat bioaugmentatie van snelle-zandfilters kan worden toegepast in de praktijk, dient daarom onderzocht te worden wat de limiterende factoren zijn die een verregaande verwijdering van OMV hinderen. In een workshop met de projectbegeleidingsgroep kwam ook naar voren dat de meeste leden behoefte hadden naar dit type onderzoek.

Uit vorig onderzoek werd ook geconcludeerd dat het effect van bioaugmentatie voor verwijdering van andere OMV (bijv. toxicologisch relevante OMV die moeilijk te verwijderen zijn in de drinkwaterzuivering) ook onderzocht moet worden, apart gedoseerd of in mengsels. Als laatste werd aanbevolen dat onderzoek gedaan dient te worden naar metabole/co-metabole afbraak van OMV en of bepaalde categorieën OMV onderscheiden kunnen worden (metabool afgebroken OMV, co-metabool afgebroken OMV, of een combinatie van beide). Hierbij kan onderzocht worden welke nutriënten de co-metabolische afbraak stimuleren (bijv. ammonium en/of verschillende koolstofbronnen) en hoe de bacteriepopulaties zich ontwikkelen en welke enzymen geproduceerd worden om zo onderscheid te kunnen maken tussen actief betrokken micro-organismen en niet betrokken micro-organismen. Deze informatie zal ook inzicht bieden voor welke OMV een tijdelijke afwezigheid in het influent problematisch kan zijn voor de verwijdering (i.e. tijdens metabole verwijdering) en voor welke OMV een tijdelijke afwezigheid in het influent geen effect zal hebben (i.e. tijdens co-metabole verwijdering).

1.3 Leeswijzer en opzet onderzoek

In het onderzoek dat hier beschreven wordt, is specifiek gekeken naar bioaugmentatie van snelfilters waarbij een antwoord is gezocht op de volgende onderzoeksvragen:

- 1 Wat is het effect van bioaugmentatie en/of biostimulatie op verwijdering van een andere selectie OMV dan metformine en pyrazool?
- 2 Wat zijn de limiterende factoren voor OMV-verwijdering en voor bioaugmentatie of biostimulatie?
- 3 Wat zijn de nutriënten die verwijdering stimuleren en gebeurd verwijdering metabolisch of co-metabolisch?

In dit onderzoek zijn kolomstudies uitgevoerd met snelle-zandfiltermateriaal van Loenderveen, dat wel of niet geënt werd met 10% WRK-zandfiltermateriaal. Het influent van deze kolommen bevatte een mix van een selectie van OMV en wel of geen limiterende factoren die aan het Loenderveen-influentwater werden gedoseerd. Om een goede afweging te maken voor deze experimentele opzet is een vooronderzoek gedaan, dat in hoofdstuk 2 beschreven wordt.

In paragraaf 2.1 wordt ingegaan op de selectie van deze gedoseerde OMV. In paragraaf 2.2 wordt ingegaan op de limiterende factoren die in de literatuur beschreven zijn voor de biologische verwijdering van de selectie van OMV. In hoofdstuk 3 wordt aan de hand van deze belangrijkste limiterende factoren de experimentele opzet beschreven

en verklaard. In hoofdstuk 4 worden de resultaten van de kolomstudies gegeven en in hoofdstuk 5 worden deze bediscussieerd, waarna de conclusies en aanbevelingen volgen in hoofdstuk 6.

2 Vooronderzoek

2.1 Keuze en motivatie selectie OMV

Het keuzetraject voor de OMV die in dit onderzoek zijn gedoseerd en gemeten, is zo zorgvuldig mogelijk uitgevoerd door, als onderdeel van dit project, te inventariseren van welke OMV het belangrijk is om te weten of en hoe deze verwijderd wordt in snelle-zandfilters. Daarvoor zijn de volgende hulpmiddelen gebruikt:

- Mentimeter resultaten workshop OMV
- “Roberta”-lijst (Hofman-Caris 2018)
- Stoffen QSPR (quantitative structure property relationship) (Hofman-Caris 2020)
- RIVM gidsstoffen
- Priority substances from water framework directive (KRW)
- Aanwezig in drinkwater (data uit verschillende projecten)
- Wat mogelijk verwijderd werd in full-scale snelfilters (van Bel, Bertelkamp et al. 2020)
- Biologische verwijderingspotentie (komt deels uit literatuurstudie)

Van de OMV die uit deze inventarisatie naar voren zijn komen, is daarna achterhaald wat de chemische eigenschappen zijn en de chemische detectiemethoden, waarbij gekozen is voor een set van OMV die geanalyseerd kunnen worden met zo min mogelijk methoden i.v.m. budget.

Aan de hand van deze selectieprocedure zijn 10 OMV gekozen die aan de kolomexperimenten gedoseerd worden (Tabel 1). 1,4-dioxaan zat ook in de laatste keuze, maar is zeer vluchtig en lastig te doseren aan kolommen en daarom niet meegenomen in de uiteindelijke selectie.

Tabel 1: Selectie van OMV die gedoseerd werden aan het influent voor de kolomexperimenten

OMV	Stofgroep	Stoffen QSPR *	RIVM gidsstoffen	“Roberta” lijst**	KRW	Drinkwater
Acesulfaam	Zoetstof	x		x		x
Amidotrizoïnezuur	Röntgencontrast	x		x		x
1-H Benzotriazool	Cheleermiddel	x	x			
Carbamazepine	Medicijn	x	x			
Diclofenac	Medicijn		x			
Iopamidol	Röntgencontrast	x				x

2.2 Bepalende en limiterende factoren voor biologische verwijdering

Om biologische processen te gebruiken voor de verwijdering van stoffen, is kennis nodig over de factoren die bepalend zijn voor biologische processen. Om te groeien hebben micro-organismen energie en nutriënten nodig, zodat ze nieuw celmateriaal kunnen synthetiseren. In onderstaande tekst wordt op de belangrijkste factoren ingegaan die de activiteit en groei van micro-organismen dicteren.

2.2.1 Energie- en koolstofbron (substraat) en nutriënten

Om te groeien hebben micro-organismen energie nodig. Micro-organismen kunnen daarom worden ingedeeld op grond van hun metabolische behoeften. De energie- en koolstofbronnen die nodig zijn voor de groei van micro-organismen, worden gewoonlijk substraten genoemd. Micro-organismen gebruiken als koolstofbron ofwel organische moleculen, ofwel anorganisch koolstofdioxide. Micro-organismen die organische stoffen gebruiken, worden heterotroof genoemd; terwijl micro-organismen die koolstofdioxide gebruiken, autotroof worden genoemd. De energie die nodig is voor de synthese van celmateriaal, kan worden verkregen uit licht of uit chemische reacties, zoals reductie/oxidatiereacties (redoxreacties). De micro-organismen die licht kunnen gebruiken, worden fototrofen genoemd. Micro-organismen die energie verkrijgen uit een chemische oxidatiereactie, worden chemotrofen genoemd. Redoxreacties zijn reacties waarbij elektronen worden overgedragen van een elektronendonor naar een elektronacceptor, d.w.z. dat de elektronendonor wordt geoxideerd en de elektronacceptor wordt gereduceerd. De elektronendonoren en -acceptoren kunnen zowel organisch als anorganisch zijn, afhankelijk van het metabolisme van het micro-organisme.

Als zuurstof door het micro-organisme wordt gebruikt als de elektronacceptor, wordt de reactie aeroob genoemd. Als andere elektronacceptoren door micro-organismen worden gebruikt, worden de reacties anaeroob genoemd. Wanneer nitriet of nitraat als elektronacceptor worden gebruikt, wordt de reactie door sommigen anoxisch of anaeroob genoemd, maar dat is terminologisch onjuist. De termen oxisch en anoxisch worden namelijk gebruikt voor de omstandigheden, terwijl de termen aeroob en anaeroob worden gebruikt voor het metabolisme van het micro-organisme. Onder anoxische omstandigheden (i.e. zonder zuurstof) kan nitriet en nitraat gereduceerd worden tot stikstofgas, wat biologische denitrificatie wordt genoemd.

Micro-organismen die altijd zuurstof nodig hebben om energie te produceren, worden obligaat aeroob of strikt aeroob genoemd. Bacteriën die zuurstof en een andere elektronenacceptor kunnen gebruiken wanneer er geen zuurstof beschikbaar is, worden facultatieve aerobe bacteriën genoemd. Evenzo worden micro-organismen die alleen in omgevingen zonder zuurstof kunnen leven, obligaat anaeroben of strikt anaeroben genoemd. Facultatief anaerobe micro-organismen kunnen zowel in aanwezigheid als in afwezigheid van zuurstof groeien.

Hoe meer bekend is over de metabolische behoeften van de micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de verwijdering van de in deze studie gekozen OMV, hoe gemakkelijker het zal zijn de omstandigheden na te bootsen die nodig zijn voor hun groei en vermeerdering.

Om te groeien moeten micro-organismen nieuw celmateriaal synthetiseren en daarvoor hebben ze ook andere nutriënten dan koolstof nodig. Deze bestaan uit:

- 1 Anorganische macronutriënten (N, S, P, K, Mg, Ca, Fe, Na en Cl)
- 2 Andere organische nutriënten, ook wel groeifactoren genoemd, zoals bijvoorbeeld vitamines
- 3 Sporenelementen (zeldzame metalen voor de cofactoren en enzymen)

Naast koolstof kunnen ook andere nutriënten de beperkende stof zijn voor celsynthese en groei.

De benodigde organische nutriënten, ook wel groeifactoren of vitamines genoemd, zijn precursoren of bestanddelen van organisch celmateriaal. De benodigde groeifactoren verschillen per micro-organisme, maar ze

kunnen in de volgende groepen worden ingedeeld: aminozuren, stikstofbasen (zoals purines en pyrimidines) en vitamines. Vitamines (bijv. biotine, nicotinamide, thiamin (vitamine B1), cyanocobalamine (vitamine B12), riboflavine) en sporenelementen (Zn, Mn, Mo, Se, Co, Cu en Ni) zijn van ondergeschikt, maar zeker cruciaal belang voor de synthese en activiteit van enzymen en cofactoren en kunnen ook beperkend zijn voor cel synthese en groei.

In stedelijk afvalwater zijn de meeste nutriënten en groeifactoren aanwezig, maar voor industrieel afvalwater kan het nodig zijn om nutriënten toe te voegen om biologische verwijdering mogelijk te maken. In een drinkwaterzuivering is de beschikbaarheid van nutriënten en groeifactoren veel beperkter. Het is mogelijk dat, bij aanwezigheid van energie en koolstofs substraten, het juist de nutriënten- en groeifactorsamenstelling van het water is die de groei van micro-organismen, en daarmee de verwijdering van OMV beperkt.

In een onderzoek waar micro-organismen zijn verrijkt uit RWZI effluent die 1,4-dioxaan verwijderen, werd gebruik gemaakt van een zoutmedium en een voorraadoplossing van sporenelementen. Het recept dat de auteurs gebruikt hadden voor het kweekmedium (mineraal medium en sporenoplossing) is redelijk gestandaardiseerd en wordt met enkele variaties meestal gebruikt voor het activeren/verrijken van micro-organismen. Het werd door Chen et al., 2021 als volgt gerapporteerd:

- Mineraal medium (1L): Na₂HPO₄-12 H₂O (4,5 g), K₂HPO₄ (1,0 g), NH₄Cl (1,5 g), MgSO₄-7 H₂O (0,2 g), CaCl₂-2H₂O (0,03 g),
- Stockoplossing sporenelementen (1 L): MnSO₄-H₂O (0,1 g), Na₂MoO₄-2H₂O (0,02 g), H₃BO₃ (0,014 g), FeSO₄-7H₂O (1,0 g), ZnSO₄-7H₂O (0,1 g), CuSO₄-5H₂O (0,02 g), en CoCl₂-6H₂O (0,02 g).

De auteurs Piai et al. (2020), die praktijkproeven uitvoerden met koolstofmateriaal van een RWZI, maken melding van een zeer vergelijkbare samenstelling, met een extra bufferoplossing van fosfaten om de pH constant te houden.

2.2.2 Temperatuur

De milieumomstandigheden zoals bijvoorbeeld temperatuur en pH, spelen een belangrijke rol bij de selectie, overleving en groei van micro-organismen. In het algemeen zijn de optimale groeiomstandigheden voor een bepaald micro-organisme binnen een relatief kort bereik van temperatuur en pH, ook al groeien de meeste micro-organismen binnen veel ruimere grenzen en overleven ze binnen nog ruimere grenzen.

De invloed van temperatuur op de verwijdering van OMV in RWZIs is al verscheidene jaren gedocumenteerd. Tabel 3 toont de invloed van temperatuur op de verwijdering van een bepaalde groep OMV in de RWZI.

Tabel 3: Invloed van temperatuur op de verwijdering van OMV in batchreactortests met afvalwater. Aangepast van Joss et al. (2006), verwijzend naar het ongepubliceerde werk van Zabczynski et al.

Group	Compound	Temperature 20°C vs. 10°C
Antibiotics	Sulfamethoxazole	comparable
Drugs	Bezafibrate	20°C > 10°C
	Diclofenac	comparable
	Ibuprofen	20°C > 10°C
	Ibuprofen-OH	20°C > 10°C
	Ketoprofen	20°C > 10°C
	Naproxen	20°C > 10°C
	Pentoxifyllin	20°C > 10°C

Biologische verwijdering van OMV is een temperatuurgevoelig mechanisme. Uit Tabel 3 blijkt dat voor de meeste geanalyseerde geneesmiddelen een verhoogde verwijdering wordt verkregen bij 20°C vergeleken met 10°C.

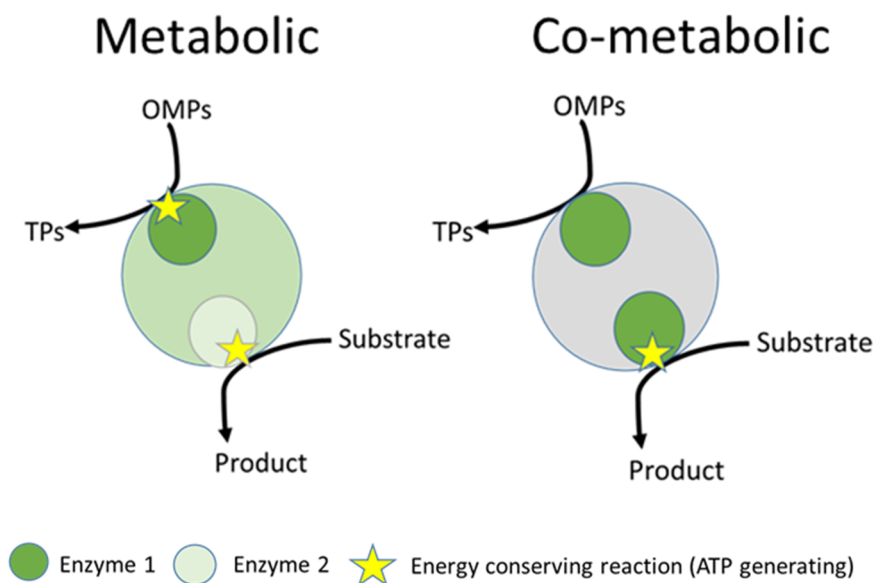
Een soortgelijke redenering wordt door Piai et al. (2020) toegepast om een onderscheid te maken tussen adsorptie- en biodegradatiemechanismen in actieve kool van een RWZI. De auteurs stelden twee mogelijke scenario's voor. In het eerste neemt de adsorptie van een OMV af met de temperatuur, d.w.z. een exotherm proces, zodat de temperatuur negatief gecorreleerd zou zijn met adsorptie, maar positief met biologische verwijdering. In het tweede scenario neemt de adsorptie van een OMV toe met de temperatuur, d.w.z. een endotherm proces, zodat de temperatuur positief gecorreleerd zou zijn met de adsorptie en de biologische verwijdering. Voor het tweede scenario hebben de auteurs extra experimenten uitgevoerd, waarbij de actieve kool geautoclaveerd is, om de adsorptie in afwezigheid van micro-organismen te evalueren. In beide scenario's werd gevonden dat de biodegradatie steeds positief correleerde met de temperatuur.

2.2.3 Biologische verwijderingsmechanismen (metabool vs co-metabool)

De literatuur over specifieke bacteriën die bepaalde OMV kunnen verwijderen neemt toe, waarbij sommige bacteriën in staat zijn om een breed scala aan OMV te verwijderen. In vorig onderzoek is er een uitgebreide literatuurstudie hiernaar uitgevoerd ((van Bel, Bertelkamp et al. 2020).

Door grote variabiliteit van gerapporteerde OMV-verwijdering is soms tegenstrijdig. Dit kan komen doordat 1) de OMV een breed scala aan stoffen met verschillende chemische eigenschappen en structuren omvat en 2) de stoffen ook nog eens in zeer lage concentraties voorkomen. De meeste microbiologische processen kunnen stoffen goed verwijderen die in de mg/L range voorkomen, maar er is minder bekend over de verwijdering in de ng/l tot µg/L range; de concentratie waarin OMV in water voorkomen. Micro-organismen kunnen namelijk moeilijker groeien op de afbraak van OMV die in zulke lage concentraties voorkomen. Voor de verwijdering van OMV is het daarom van belang om te weten of stoffen via metabolische of co-metabolische processen worden verwijderd. Het onderscheid hiertussen is eerder beschreven ((van Bel, Bertelkamp et al. 2020), maar wordt voor de leesbaarheid van dit rapport hier nogmaals m.b.v. Figuur 1 visueel gepresenteerd.

Metabolische verwijdering houdt in dat er energie geproduceerd wordt tijdens de omzetting van een OMV als substraat, waarbij specifieke enzymen het OMV omzetten en daarbij ATP genereren. Met deze energie kan het micro-organisme dus celmateriaal genereren en groeien (Figuur 1). Dit betekent dat deze micro-organismen dus zouden moeten kunnen groeien in afwezigheid van andere energiebronnen dan de OMV. Co-metabolische verwijdering houdt in dat er geen specifieke enzymen voor de omzetting van OMV gebruikt worden, maar dat enzymen die voor andere, primaire substraten bedoeld zijn ook OMV om kunnen zetten. Deze enzymen genereren wel energie tijdens omzetting van het primaire substraat, maar niet tijdens omzetting van het OMV. Dit betekent dat deze micro-organismen dus niet zouden kunnen groeien in afwezigheid van het andere substraat dan de OMV.



Figuur 1. Schematische illustratie van de verschillen tussen metabolische en co-metabole afbraak van OMV (OMP; organische microverontreinigingen). Cirkels stellen bacteriecellen voor met verschillende enzymen (enzym 1 en 2, verschillende kleuren) die in staat zijn OMV en/of het primaire substraat af te breken. Gele sterren stellen reacties voor waarbij energie (ATP) wordt gevormd en zo groei mede mogelijk maken.

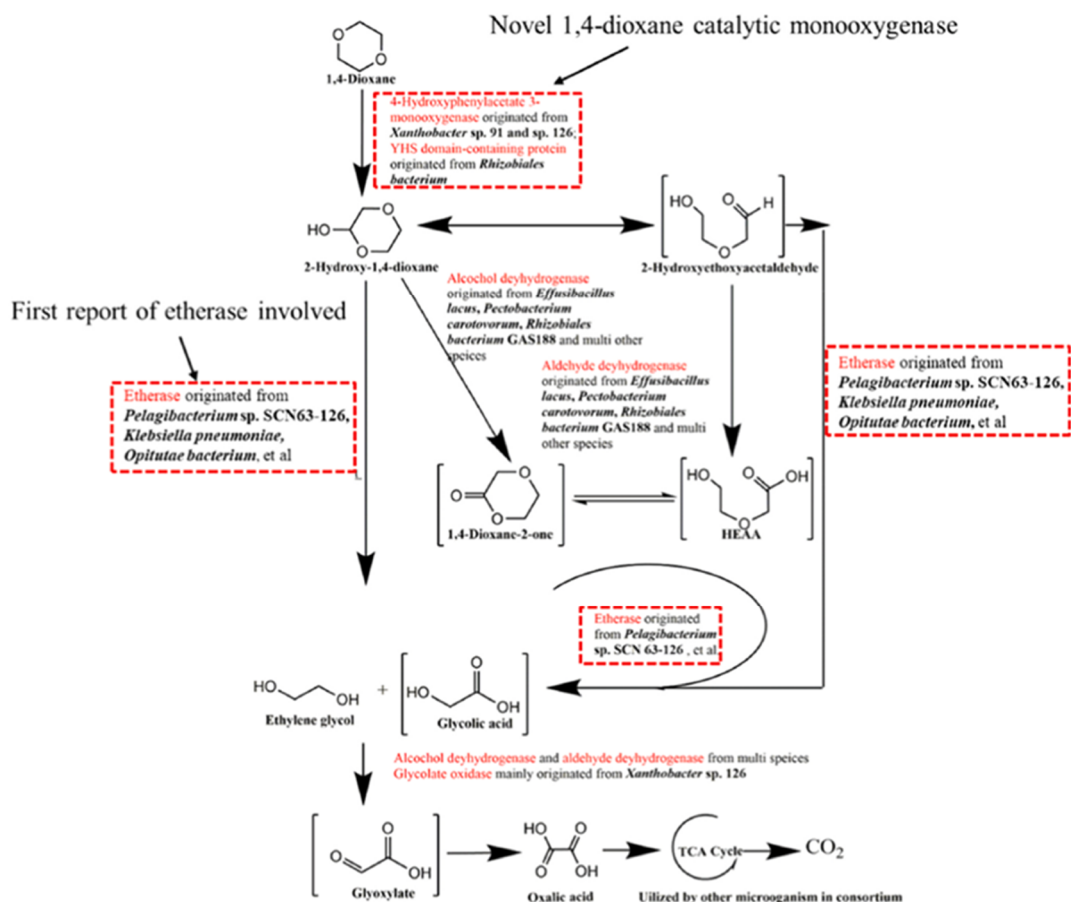
Er is aangetoond dat OMV goed verwijderd worden via co-metabole afbraak tijdens andere processen waar micro-organismen wel energie uit halen om op te groeien. Tijdens nitrificatie bijvoorbeeld kunnen bepaalde OMV biologisch omgezet kunnen worden. Er zijn indicaties dat ammoniumoxiderende bacteriën (AOB), en vooral het ammoniamonooxygenase (AMO) enzym, bepaalde OMV met specifieke functionele groepen (alkyl, aliphatische hydroxyl, ether, sulfide, aromatische ringen en aromatisch amines) kan omzetten tijdens co-metabole activiteit (Su,

Schittich et al. 2021). Ander onderzoek heeft aangetoond dat het AMO-enzym ook ibuprofen kan omzetten, en dat nitrificerende omstandigheden zorgen voor omzetting van naproxen en sulfamethoxazol (Fernandez-Fontaina, Gomes et al. 2016). Daarnaast is gerapporteerd dat AOB een belangrijke rol spelen in de verwijdering van OMV in afvalwaterzuiveringen (Margot, Lochmatter et al. 2016, Park, Yamashita et al. 2017).

2.2.4 Limiterende factoren tijdens biologische verwijdering van selectie van OMVs

In deze paragraaf wordt getracht de limiterende factoren te identificeren voor de verwijdering door micro-organismen van de in paragraaf 2.1 gekozen specifieke OMV.

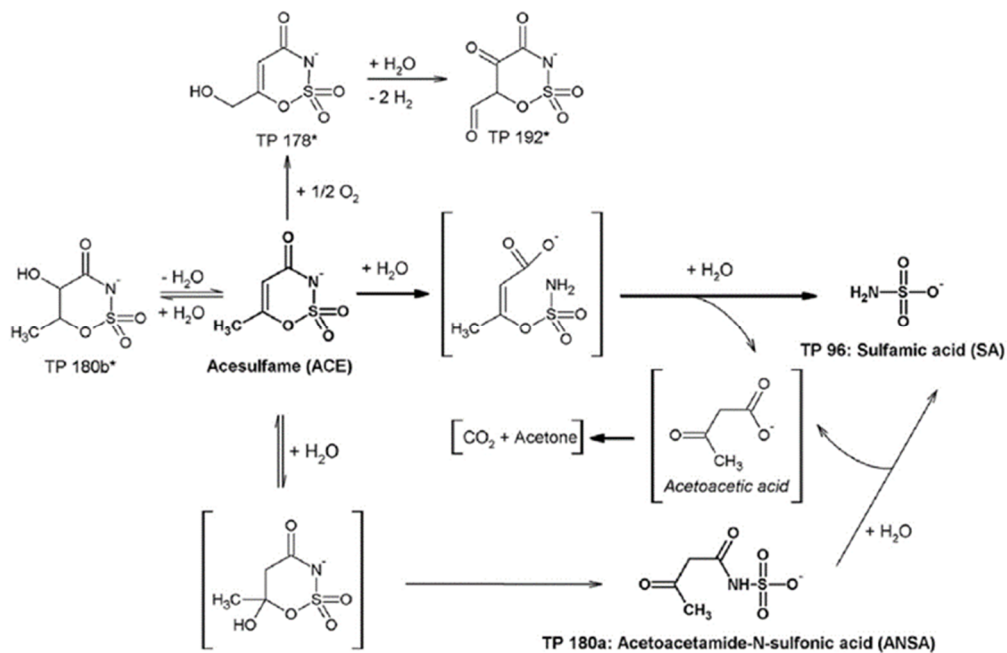
Chen et al. (2021) heeft getracht micro-organismen te verrijken die **1,4-dioxaan** verwijderen (Chen, Miao et al. 2021). Volgens de auteurs werd de biologische afbraak van 1,4-dioxaan niet toegeschreven aan één bacteriestam, maar aan een consortium van stammen, met synergetische effecten, waardoor de resultaten van andere onderzoekers werden bevestigd en de rol van nieuwe monooxygenase-enzymen werd toegevoegd. De voorgestelde metabole route is weergegeven in Figuur 2, wat een overzicht geeft van alle verschillende substraten die mogelijk betrokken zijn bij de afbraak van 1,4-dioxaan. De auteurs zijn erin geslaagd het oorspronkelijke monster te verrijken met 1,4-dioxaanverwijderende bacteriën. Het oorspronkelijke monster, afkomstig van een rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI), werd in flessen van 250 ml gedurende een periode van 90 dagen geacclimatiseerd voor aerobe biologische afbraak van 1,4-dioxaan. Er werd een medium met nutriënten en groeifactoren verstrekt en de temperatuur en het mengen werden constant gehouden, namelijk respectievelijk 30 °C en 130 rpm. Bacteriestammen die 1,4-dioxaan afbreken werden geïsoleerd met behulp van magnetische nanodeeltjes.



Figuur 2: Voorgesteld afbraaktraject van 1,4-dioxaan. Reproductie van Figuur 8 uit Chen et al. (2021). Substraten weergegeven tussen [] staan voor de niet-gedetectedeerde tussenproducten.

Acesulfaam is een zoetstof die kan worden aangetroffen in afvalwater en drinkwater. Castronovo et al. (2017), maten de verwijdering van acesulfaam in 13 waterzuiveringsinstallaties (RWZIs) en een zandfilter van een RWZI, gedurende een periode van twee jaar, en combineerden de monitoring met batchexperimenten met actief slib en filterzand. De auteurs concludeerden dat zowel actief slib als filterzand acesulfaam effectief kunnen verwijderen, en dat de verwijdering kon worden toegeschreven aan biologische afbraak. Acesulfaam bleek zowel in oxische als denitrificerende (anoxische) omstandigheden te worden verwijderd, terwijl het niet verwijderd werd in afwezigheid van zuurstof en nitraat. Denitrificerende micro-organismen zijn micro-organismen die nitriet en nitraat als elektronenacceptor gebruiken en dus energie produceren door middel van een redoxreactie (chemotrofen). Denitrificerende bacteriën in afvalwater zijn facultatieve heterotrofe micro-organismen, d.w.z. dat zij organisch materiaal als koolstofbron (substraat) gebruiken voor groei. Doorgaans zijn denitrificerende bacteriën facultatief aerobe bacteriën, wat betekent dat bij afwezigheid van zuurstof, nitraat en nitriet als elektronenreceptoren worden gebruikt. Castronovo et al. (2017) toonden een volledige verwijdering aan van het koolstof afkomstig van acesulfaam, waarmee werd bevestigd dat sulfaminezuur het enige relevante eindtransformatieproduct was, in de voorgestelde afbraakroute van acesulfaam. Het sulfaminezuur was stabiel in de batchexperimenten uitgevoerd met het filterzand van de RWZI. Variatie in acesulfaamverwijdering was hoogstwaarschijnlijk niet geassocieerd met nitrificatie omdat nitrificatiesnelheden, ammoniumbeschikbaarheid en remming van ammoniummonooxygenase geen effect op de verwijdering hadden (Castronovo, Wick et al. 2017).

Het full-scale zandfilter, gemonitord door Castronovo et al. (2017), is een langzame-zandfiltratie, toegepast als voorbehandeling van oppervlaktewater, voorafgaand aan kunstmatige grondwateraanvulling. Het water wordt onttrokken aan de rivier de Ruhr, in Duitsland. Na te zijn onderworpen aan langzame-zandfiltratie en een korte ondergrondse passage van twee tot vier dagen, wordt het water teruggewonnen en verder behandeld met ozonisatie, meerlaagse snelfiltratie en UV-desinfectie voordat het wordt geleverd als drinkwater. De auteurs hebben monsters genomen van het water uit het langzame-zandfilter, het oppervlaktewater en het geregenereerde water na de ondergrondse passage. Bovendien hebben Castronovo et al. (2017) batchexperimenten uitgevoerd met kolommen gevuld met puur zand uit de rivier de Rijn en een bovenlaag, waarin het zand werd gemengd met inheems sediment uit de rivier de Ruhr. Castronovo et al. (2017) toonden aan dat de passage door het RWZI's langzame-zandfilter en ondergrondse passage, ongeveer 70% van de acesulfaam-concentraties verwijderde, voornamelijk waarschijnlijk als gevolg van biologische afbraak. In de labkolommen toonden de auteurs aan dat acesulfaam biologisch werd afgebroken, met een afbraak, die na een lagfase van 20 uur, goed kon worden beschreven door een eerste-ordekinetiek met een snelheidsconstante van $1,62 \text{ d}^{-1}$. Het voorgestelde afbraaktraject voor acesulfaam is weergegeven in Figuur 3.



Figuur 3: Voorgesteld afbraaktraject van acesulfaam. Reproductie van Figuur 7 gepresenteerd in Castronovo et al. (2017). Substraten vertegenwoordigd tussen [] staan voor de niet-gedetectedeerde tussenproducten.

Acesulfaam lijkt daarnaast vooral verwijderd te worden tijdens de zomer en herfstperiodes en vertoont slechte verwijdering in januari-april in negen Duitse afvalwaterzuiveringen (Kahl, Kleinstüber et al. 2018), wat kan duiden op een afhankelijkheid van nutriënten of temperatuur. Ophopingsculturen met acesulfaam als enige koolstofbron hebben aangetoond dat de stof metabolisch (catabolisch) wordt verwijderd, waarbij sulfaminezuur als afbraakproduct gevormd wordt. Het biologisch proces om acesulfaam af te breken lijkt in de afvalwaterzuivering te zijn ontstaan rond 2010, en het lijkt hierdoor de eerste OMV waarbij de metabolische afbraak geëvolueerd is in een afvalwaterzuivering (Kahl, Kleinstüber et al. 2018).

Falás et al. (2016) onderzochten de verwijdering van OMV in afvalwaterzuivering, door middel van kortlopende batchtesten en langlopende monitoring in RWZIs in 15 bioreactoren (Falás, Wick et al. 2016). De onderzoekers werkten met synthetisch afvalwater in de batchtesten, en echt afvalwater in de RWZIs. Volgens de auteurs is **amidotrizoïnezuur (diatrizoaat)** onder oxische condities een persistente verontreiniging, die onder anoxische omstandigheden kan worden verwijderd. **Amidotrizoïnezuur** werd verwijderd met 90% in een anoxische nabehandeling, terwijl in een standalone anoxische reactor de verwijdering ongeveer 50% bedroeg. Een deel van het hoge verwijderingsrendement kan worden toegeschreven aan reductieve dejodinerende, waarbij twee geïsoleerde omzettingen worden gevormd: dejodo- en dideidodiatrizoaat, die overeenkomen met 10-20% van de concentratie van de oorspronkelijke verbinding. Verwijdering van **diclofenac** werd bereikt in een oxische biofilmreactor. Wat **metoprolol** betreft, stelden de auteurs de hypothese voorop dat de verwijdering waarschijnlijk werd veroorzaakt door heterotrofe organismen.

In actief slib is de biologische omzetting van **metoprolol** en de vorming van transformatieproducten ook onderzocht onder verschillende omstandigheden. Onder oxische condities trad volledige verwijdering op, met productie van de transformatieproducten metoprolol zuur, α -hydroxymetoprolol, O-desmethylmetoprolol (O-DMTP) en andere onbekende transformatieproducten (Rubirola, Llorca et al. 2014). Metoprolol werd niet verwijderd in nitrificerende ophopingsculturen (Sathyamoorthy, Chandran et al. 2013). In een andere studie werd nitrificatie zelfs geremd door aanwezigheid van metoprolol (Rutere, Posselt et al. 2021). Eerder onderzoek had aangetoond dat de aanwezigheid van de belangrijkste substraten voor microbiële groei, namelijk organische stoffen

en ammonium, een remmend effect had op de verwijdering van bepaalde antibiotica en oestrogenen. Falas et al. (2016) namen waar dat sterke remming van OMV-omzetting bij substraatbelastingen slechts bij een beperkt aantal OMV optrad. Er werd namelijk een gedeeltelijke remming waargenomen voor **metoprolol** en 10,11-dehydro-10-hydroxy-carbamazepine (**DHH-carbamazepine**), maar voor de overige OMV waren er geen andere meetbare effecten die statistisch reproduceerbaar waren. Typisch substraatbelastingen voor actiefslibprocessen tijdens afvalwaterbehandeling zijn $38 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ chemisch zuurstofverbruik (CZV) en $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ammonia-N. De auteurs concludeerden dat de aanwezigheid van hoofds substraten noch een belangrijke trigger, noch een sterke remmer is in biologische afvalwatersystemen, afgezien van de eerdergenoemde uitzonderingen. Verder concludeerden Falas et al. (2016) dat het combineren van oxische en anoxische omstandigheden de verwijdering kon verbeteren, echter beperkt tot een aantal OMV.

Gabapentine werd in laboratoriumexperimenten biologisch verwijderd onder oxische condities, maar niet onder anoxische condities (Henning, Kunkel et al. 2018). Ander onderzoek heeft aangetoond dat snelle-zandfiltratie gabapentine zeer slecht verwijderd, terwijl actieve-koolfiltratie gabapentine goed verwijderde (Nugroho, Reungoat et al. 2010). In andere kolomstudies met zand en afvalwatereffluent als inoculum werd maar 10% verwijdering van gabapentine gevonden (Onesios and Bouwer 2012).

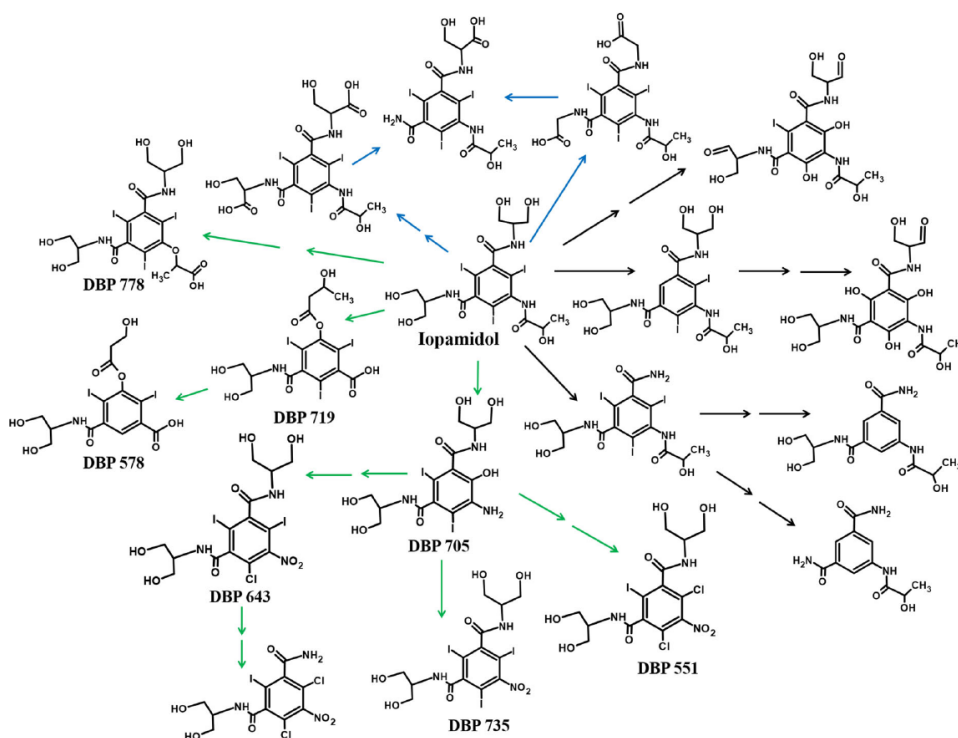
De auteurs Piai et al. (2020) onderzochten de biodegradatie en adsorptie van OMV in actieve-koolfilters van een RWZI. De bestudeerde verbindingen waren onder meer **benzotriazool**, desphenyl-chloridazon, **diclofenac**, **iopamidol**, metformine en pyrazool. Gerichte batchproeven werden uitgevoerd om de rol van elk verwijderingsmechanisme, geassocieerd met elk OMV, te beoordelen. Batchproeven met geautoclaveerde en niet-geautoclaveerde actieve kool, afkomstig van een full-scale RWZI, gecombineerd met de reactie van adsorptie en biologische afbraak bij verschillende temperaturen, werden toegepast om onderscheid te maken tussen de afbraak en adsorptie. De auteurs namen biologische afbraak van metformine waar, wat werd bevestigd door de productie van het omzettingsproduct guanyluureum. De resultaten werden echter niet in alle replica's verkregen. Variabiliteit in de biologische afbraak van metformine is ook door andere auteurs gerapporteerd, wat leidt tot de hypothese dat metformineafbraak in verband kan worden gebracht met specifieke micro-organismen. Ook Piai et al. (2020) verwijzen naar heterogeniteit van het inoculum als mogelijke verklaring voor de verschillende resultaten van de replica's. De auteurs verkregen ook resultaten die erop wijzen dat **iopamidol** biologisch wordt verwijderd, mede omdat iopamidolverwijdering hoger was bij 20°C dan bij 5°C en omdat het lager was in geautoclaveerd actief kool. Een andere mogelijkheid was dat door de biologische afbraak van andere verbindingen en metformine adsorptieplaatsen konden vrijkomen, waardoor de verwijdering via adsorptie van iopamidol toenam. De auteurs vonden geen trends die wezen op biologische afbraak van benzotriazool, desphenyl-chloridazon en pyrazool, en resultaten van verwijdering van diclofenac waren niet overtuigend.

Diclofenac verwijdering is meerdere malen gerapporteerd in de literatuur, waarbij de verwijdering zeer variabel is; van 0% tot 94% verwijdering in membraanbioreactoren (Kim, Rossmassler et al. 2017). Deze variatie lijkt te komen door de aan- of afwezigheid van micro-organismen in het inoculum die diclofenac kunnen verwijderen en de verschillen in retentietijden. In andere kolomstudies met steriel zand dat geënt werd met afvalwatereffluent werd maar 10% verwijdering gevonden (Onesios and Bouwer 2012). In kolomexperimenten met snelle-zandfiltermateriaal voor drinkwaterproductie werd 21-28% verwijdering (afhankelijk van de contacttijd) gevonden (Zearley and Summers 2012). Diclofenac is in het algemeen niet goed afbreekbaar, met aerobe afbraak tussen 20 en 84% in bioreactoren met RWZI-effluent als inoculum (González, Müller et al. 2006) of totaal geen verwijdering (Quintana, Weiss et al. 2005). Diclofenac lijkt beter verwijderd te worden tijdens oeverfiltratie (60-80%), omdat het naast biologische verwijdering, ook door sorptieprocessen verwijderd wordt (Petrovic, de Alda et al. 2009). Dit kan ook verklaren waarom slib met een hoger organisch koolstofgehalte beter is in het adsorberen van diclofenac (Petrovic, de Alda et al. 2009).

In een specifieke studie werd aangetoond dat nitrificerend slib beter in staat was om diclofenac te verwijderen dan conventioneel actief slib. Diclofenac werd voor 40% verwijderd waarbij verwijdering tot >75% omhoog ging

wanneer ammoniumconcentraties verhoogd werden. Daarnaast had acetaatadditie een positief effect op de verwijdering van diclofenac en had remming van nitrificatie (d.m.v. remming van het enzym ammoniamonooxygenase) maar deels effect op de verwijdering, wat aangeeft dat diclofenacverwijdering niet alleen afhankelijk was van ammoniumoxideerders maar ook van heterotrofe micro-organismen (Tran, Urase et al. 2009). Deze resultaten tonen echter ook aan dat diclofenac deels co-metabolisch wordt verwijderd tijdens ammoniumoxidatie, wat vaker is aangetoond voor meerdere medicijnresten en personal-care producten (Dawas-Massalha, Gur-Reznik et al. 2014, Park, Yamashita et al. 2017).

Nowak et al. (2020) verwijzen naar studies waarin de afbraak van **iopamidol** onder oxidische omstandigheden van actief slib wordt gerapporteerd, waarbij een totale verwijdering van 60-80% wordt bereikt. De auteurs stelden een transformatieroute voor iopamidol voor (Figuur 4), met aanduiding van de reacties waarvoor micro-organismen nodig zijn.



Figuur 4: Voorstel voor het afbraaktraject van iopamidol. Reproductie van Figuur 4, gepresenteerd in Nowak et al. (2020). Blauwe pijlen geven de reacties aan die plaatsvinden in aanwezigheid van micro-organismen, groene pijl tijdens de desinfectie van water en zwarte pijlen tijdens geavanceerde oxidatieprocessen.

In full-scale RWZIs worden verbindingen zoals **carbamazepine**, **metoprolol** en **propranolol** verwijderd met respectievelijk 20%, 40% en 20% (Radjenovic et al. 2009, Bourgin et al. 2018). **Carbamazepine** is een persistente verontreiniging waarbij metabolieten worden geproduceerd die opnieuw kunnen transformeren naar de moederverbinding. De concentraties van carbamazepine in RWZIs zijn beschreven door complexe modellen, waarbij rekening wordt gehouden met sorptie-desorptie en biotransformatie onder oxidische en anoxische omstandigheden (Plosz et al. 2012). Plosz et al. (2012) hebben voornoemde modellen, aangeduid als ASM-X-modellen, ook toegepast om de verwijdering van **diclofenac** te beschrijven. Net als voor carbamazepine werd rekening gehouden met vergelijkingen die de omzetting in oorspronkelijke verbindingen, sorptie-desorptie en biotransformatie onder oxidische en anoxische omstandigheden beschrijven. Bovendien is voor diclofenac het effect

van de slibretentietijd, d.w.z. de tijd gedurende welke het slib in het actiefslibstelsysteem wordt vastgehouden, een bijkomende factor waarmee rekening moet worden gehouden om de verwijdering van diclofenac in RWZIs naar behoren te modelleren. Metoprolol en propranolol hebben een verschillend verwijderingstraject in RWZIs. Terwijl **metoprolol** biologisch wordt afgebroken, wordt **propranolol** eerder verwijderd door adsorptie (Petrovic et al. 2009).

3 Materiaal en methoden

3.1 Experimentele opzet

3.1.1 Limiterende factoren en influent water voor kolom experimenten

In paragraaf 2.2.4 is dieper ingegaan op de meest belangrijke limiterende factoren voor de biologische verwijdering van de selectie van OMV. De volgende factoren zijn daarom in betrekking tot dit onderzoek geïnventariseerd, zodat een goede experimentele opzet gemaakt kan worden:

- 1 Anorganische nutriënten (voornamelijk N en P, waarvan N ook energiebron kan zijn)
- 2 Koolstofbronnen (energiebron)
- 3 Vitamines en sporenelementen (voor enzymen en cofactoren)
- 4 Temperatuur (optimale activiteit enzymen)

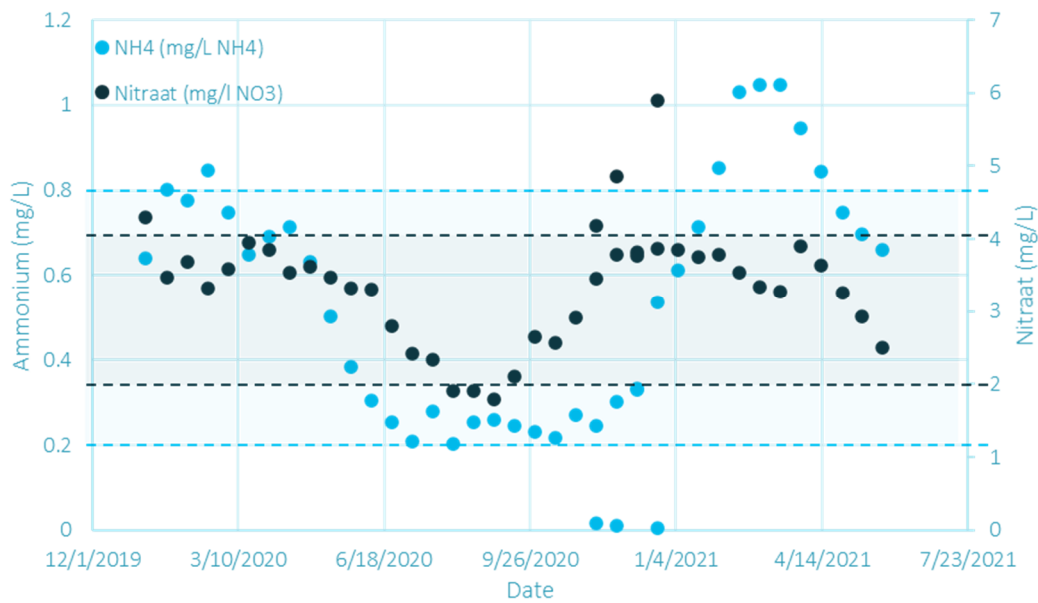
Influentwater voor kolomexperimenten

Omdat we voor kolomexperimenten in dit project de limiterende factoren wilden controleren, was in het ideale geval gebruik gemaakt van synthetisch oppervlaktewater (in het laboratorium samengesteld) waar nutriënten (stikstof, fosfor, vitamines, sporenelementen) en koolstofbronnen aan toegevoegd kunnen worden, zoals ook beschreven in paragraaf 2.2. Door de grote complexiteit van dit soort experimenten en omdat het de werkelijke situatie niet nabootst, is echter gekozen om het influentwater van de snelle-zandfilters van Loenderveen wekelijks te bemonsteren en als influentwater te gebruiken door daar de limiterende stoffen wel of niet aan toe te voegen. Dit water betreft monsterpunt "PLV-SB-001" in de waterleidingplas dat het directe influent is voor de snelfilters. Dit is water na coagulatie/bezinking en ca. drie maanden verblijftijd in de waterleidingplas. Er is gekozen om water na coagulatie te nemen zodat er minder organisch materiaal en andere zwevende deeltjes aanwezig zijn die de variabiliteit van de experimenten verhogen.

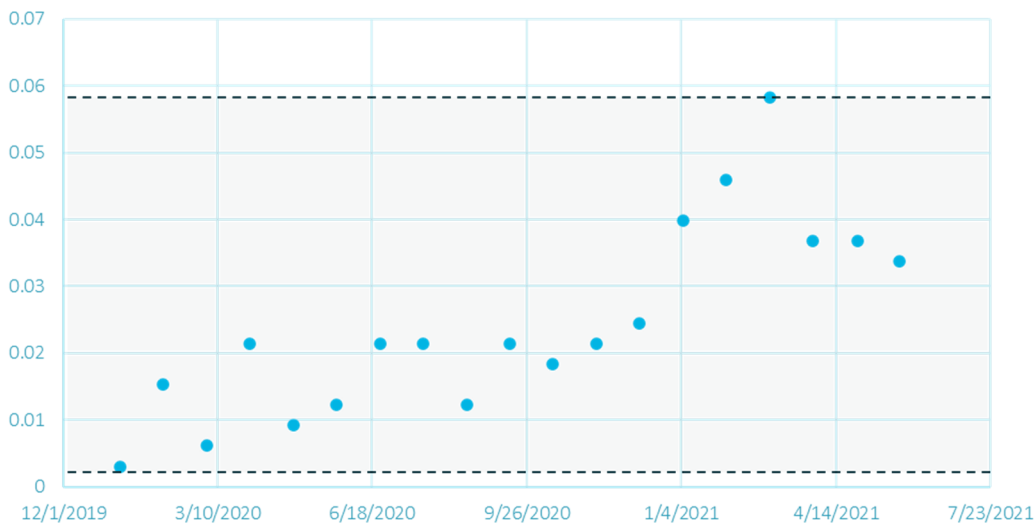
Anorganische nutriënten

Van de nutriënten nitraat, ammonium en fosfaat zijn de concentraties die van nature voorkomen in het Loenderveen-influent (Waterleidingplas) bekend, dus zullen addities worden gedaan naar de maximale concentraties die gevonden zijn om de werkelijke situatie onder optimale omstandigheden zoveel mogelijk na te bootsen. Data over concentraties van nutriënten in de Waterleidingplas was bij Waternet opgevraagd. Reguliere metingen worden daar gedaan aan o.a. nitraat, ammonium en fosfaat.

Voor nitraat en ammonium is te zien dat de concentraties sterk fluctueren gedurende het jaar. Tussen juni en september 2020 waren de concentraties van beide het laagst, waarna deze weer een piek vertoonden rond maart 2021 (Figuur 5). De minimumconcentraties ammonium lagen op 0.2 mg/L in juni-september 2020, de maximumconcentraties lagen rond 0.8-1 mg/L in maart-april 2021. Voor nitraat lag het minimum op 1.9 mg/L in augustus 2020 en het maximum tussen 4-6 mg/L in januari-april 2021. Fosfaatconcentraties in het innamewater vertoonden een minimum in januari 2019 van 0.006 mg/L en een maximum in maart 2021 van 0.06 mg/L (Figuur 6). In de hier uitgevoerde experimenten zal de gemeten maximumconcentratie van ammonium (0,8 mg/L), nitraat (4,0 mg/L) en fosfaat (0,06 mg/L) in het water worden toegevoegd aan het influent voor de kolommen.



Figuur 5: Nitraat- en ammoniumconcentraties in het innamewater van Loenderveen (2019-2021). De blauwe stippellijn geeft het minimum ammonium (juni-sep 2020 = 0.2 mg/L), en de ondergrens van het maximum ammonium (maart-april 2021: 0.8-1 mg/L). De zwarte stippellijn toont het minimum nitraat (augustus 2020: 1.9 mg/L) en de ondergrens van het maximum nitraat (januari-april 2021: 4-6 mg/L).



Figuur 6: Totaal fosfaatconcentraties (mg/L PO_4^{3-}) in het innamewater van Loenderveen (2019-2021) met stippellijnen die het minimum (0.006 mg/L) en maximum (0.06 mg/L) aangeven.

Koolstofbronnen

Organische koolstofconcentraties worden niet standaard bepaald van het influent bij Loenderveen. Als organisch koolstof bepaald wordt, zijn dit vaak totaal organische koolstof (TOC) concentraties, waarvan niet bekend is welke koolstofbronnen dit zijn. Er is grote variatie in koolstofbronnen die micro-organismen kunnen gebruiken als substraat, waarbij sommige bronnen zorgen voor zeer snelle groei (bijv. acetaat) en andere bronnen juist voor langzamere groei van andere micro-organismen (bv amylopectine).

Omdat het dus niet bekend is welke koolstofbron het meest voorkomt in het influent is besloten deze factor niet mee te nemen in de experimenten. De microbiële compositie van de zandfilters kan namelijk erg veranderen aan de hand van een type koolstofbron omdat koolstofbronnen ook dienen als substraat voor groei, wat groei van micro-organismen kan stimuleren die van nature niet dominant zijn in de snelfilters. De negatieve gevolgen van het drastisch veranderen van de microbiële gemeenschap door het doseren van een koolstofbron schatten we groter in dan de positieve gevolgen van het wegnemen van de koolstoflimitatie.

Vitamines en sporenelementen

Sporenelementen worden in zeer lage concentraties toegevoegd en dienen als bron voor cofactoren en enzymen die de micro-organismen nodig hebben voor hun metabolisme. Het toevoegen ervan zal de microbiële compositie daarom niet sterk beïnvloeden, maar optimale omstandigheden voor metabole en co-metabole afbraak creëren van de bestaande microbiële gemeenschap.

Temperatuur

Lage temperaturen (< 5 tot 15°C) werken ook limiterend op de microbiële activiteit (zie paragraaf 2.2.2). Optimale temperaturen voor veel micro-organismen die van nature in water voorkomen, liggen tussen de 15-30°C. Dat geldt ook voor micro-organismen die in oppervlaktewater leven. Er is daarom gekozen om de temperatuur te controleren op de temperatuur die heerst in de proefhal, wat tussen 19-20°C is. Wanneer er meer duidelijkheid is over de invloed van de verschillende factoren die in dit project gevarieerd zijn, kan in een vervolg gekozen worden om de temperatuur te variëren aan de hand van de natuurlijke fluctuaties.

3.1.2 Kolom experimenten

Aan de hand van eerdergenoemde motivatie, is gekozen voor de experimentele opstelling die gegeven is in Tabel 4.

Tabel 4: Experimentele opzet van de kolomproeven. +: toegevoegd, -: niet toegevoegd.

	Kolom 1	Kolom 2	Kolom 3	Kolom 4
OMV-mix	+	+	+	+
Waterleidingplas water	+	+	+	+
Nutriënten	+	-	+	+
Vitamines en sporenelementen	+	+	-	+
WRK-ent (10%)	+	+	+	-

Kolomopstelling

In Figuur 7 zijn foto's weergegeven van de gebruikte kolomopstelling, gesitueerd in de proefhal bij KWR.

a)



b)



Figuur 7: Foto's van de gebruikte kolom opstelling (b) en aanvoertanks(a).

De experimenten werden uitgevoerd onder gecontroleerde omstandigheden qua omgevingstemperatuur, deze was 19-20 °C, al was de temperatuur van het water bij de monsterneming uit de Waterleidingplas afhankelijk van het seizoen. Het experiment liep van 12/7/2021 tot en met 30/9/2021. Wekelijks (elke vrijdag) werd circa 2,4 m³ water gehaald van de Waterleidingplas na de coagulatie bij Loenderveen. Water is tijdens het experiment gehaald op 9,

16, 23, 30 juli, op 6, 13, 20, 27 augustus en op 3, 10, 17, 24 september. Dit water werd ter plaatse over een 100 µm kaarsenfilter geleid om deeltjes > 100 µm (bijvoorbeeld sediment en algen) te verwijderen. Na transport werd het water overgepompt naar vier RVS tanks in de proefhal van KWR. Hieraan werd volgens Tabel 4 de OMV, nutriënten en/of vitamines en sporenelementen gedoseerd, deze hoeveelheid was elke week hetzelfde (500 ml stockoplossing in 500 l water) omdat het debiet en moment van doseren constant werd gehouden.

De kolommen waren gemaakt van glas, met een lengte van 100 cm en een inwendige diameter van 3,5 cm. Het zandbed had een hoogte van circa 80 cm (volume 770 ml), het toegepaste debiet was 3,1 l/h waardoor er een snelheid werd toegepast van 3,2 m/h. Dit resulteerde samen in een vaste contacttijd van 15 minuten (Tabel 5). De kolommen werden met een speciaal afdek materiaal beschermd tegen daglicht om algengroei te minimaliseren. Het water uit de tanks werd van boven naar beneden door het zandbed verpompt door middel van een Danfos membraandoseerpomp, het debiet werd wekelijks gemeten en indien nodig bijgesteld. Het uitgaande water werd over een actieve-koolkolom geleid met verse actieve kool om zoveel mogelijk uitspoeling van de verschillende OMV naar het riool te voorkomen.

Tabel 5: Dimensies, debiet, zand volume en contacttijd van de kolomexperimenten.

Zand kolom		
Diameter	35	mm
Snelheid	3.2	m/h
Stroomsnelheid	3.079	L/h
Hoogte	80	cm
Volume zand	770	mL
Contacttijd (HRT)	900	sec
	15.0	min
	0.25	uur
Expansie tijdens flushen	1.2	-
Exp. Hoogte	96	cm
Exp. Volume	924	mL
Contacttijd tijdens flushen	1080	sec
	18	min

Enten en operatie van de kolommen

De kolommen bevatte zand van een snelfilter bij Loenderveen (snelfilter 32) dat, met uitzondering van kolom 4, werd gemengd met 10% (op volumebasis) zand van een snelfilter van WRK bij Nieuwegein (snelfilter 63). Het zand werd handmatig gemengd voordat het als slurrie met water van Loenderveen in de kolommen werd gebracht.

De kolommen werden wekelijks teruggespoeld met influentwater vanwege drukopbouw veroorzaakt door microbiologische activiteit op het zand. Omdat de kolommen maar 100 cm lang waren is een optimale expansie van 50% nooit gehaald. De spoelsnelheid is niet vastgesteld en was niet constant omdat er breuken ontstonden in het bed, deze moesten eerst worden doorbroken waarna het zand met maximaal 20% expansie is gespoeld (er was niet meer ruimte in de kolom).

Elke twee weken (op de donderdag) zijn monsters genomen voor de analyses van het water (pH, EGV, zuurstof, OMV), daarnaast is elke 2 weken ca 5 gram zand van bovenuit de kolom bemonsterd voor microbiële populatieanalyse (zie paragraaf 3.3) voordat de kolommen teruggespoeld werden. In Figuur 8 is een foto tijdens

een spoeling van de kolommen getoond. Bij het terugspoelen ontstond meestal een breuk in het bed die met behulp van een metalen staafje door te prikken werd hersteld. Ook is te zien dat kolom 4, welke niet is geënt met WRK-materiaal, een lichtere kleur had in vergelijking met de overige 3 kolommen.



Figuur 8 Foto van de kolommen tijdens een spoeling, waarbij vaak breuken in het bed ontstonden.

OMV-mix influent (tankwater)

In tabel 6 zijn de gewenste concentraties van de te doseren OMV vermeld en de gemiddelde concentraties die in alle tanks op de verschillende tijdstippen gemeten waren (influent voor kolom) met bijbehorende standaarddeviaties. De gewenste eindconcentratie van de OMV was 10 µg/l zodat deze 100 maal boven de rapportagegrens waren en er 99% omzetting gemeten kon worden. Voor amidotrizoïnezuur, diclofenac en PFOA week de gemeten concentratie in het influent af van de gewenste concentratie (zie Tabel 6).

Tabel 6: Gedoseerde OMV in het tankwater (influent voor kolom) met gewenste en gemeten gemiddelde concentraties van alle tanks op de verschillende meetpunten en de standaarddeviaties hiervan.

Compound	Gewenste concentraties (µg/L)	Gemeten concentraties (µg/L)	Standaarddeviatie (µg/L)
Acesulfame (Acesulfaam-K)	10	9,52	0,38
Amidotrizoate (Diatrizoate / Amidotrizoïnezuur)	10	24,64	2,68
Benzotriazole	10	9,00	0,30
Carbamazepine	10	9,46	0,36

Gabapentine	10	9,04	0,36
Diclofenac	10	0,93	0,25
lopamidol	10	8,75	0,48
Metoprolol	10	8,20	0,48
Propranolol	10	8,12	0,47
PFOA (Perfluorooctanoic acid)	10	5,93	0,49

Nutriënten, sporenelementen en vitamineoplossingen

In Tabel 7 zijn de gegevens van de nutriënten, sporenelementen en vitamineoplossingen vermeld. De nutriëntenoplossing bestaat uit ammonium (0,8 mg/L), nitraat (4,0 mg/L) en fosfaat (0,06 mg/L) zodat de maximumconcentraties bereikt worden die in het influent van de Loenderveen-filters gevonden zijn (zie paragraaf 3.1.1). De vitamines en sporenelementen voor het influent zijn ook gegeven in deze tabel.

Tabel 7: Nutriënten, sporen- en vitamineoplossingen met gewenste concentraties gedoseerd aan het water.

N/P oplossing	Concentraties (mg/L)
Na ₃ PO ₄ (als PO ₄ ³⁻)	0,06
NH ₄ Cl (als NH ₄ ⁺)	0,8
NaNO ₃ (als NO ₃ ⁻)	4,0
Sporenelementen zuur	Concentraties (mg/L)
HCl	0,0018
H ₃ BO ₃	0,0618
MnCl ₂	0,06125
FeCl ₂	0,9435
CoCl ₂	0,0645
NiCl ₂	0,01286
ZnCl ₂	0,0677
CuCl ₂	0,01335

Sporenelementen basisch	Concentraties (mg/L)
NaOH	0,4
Na ₂ SeO ₃	0,0173
Na ₂ WO ₄	0,0294
Na ₂ MoO ₄	0,0205
Vitamines	Concentraties (mg/L)
Biotin	0,02
Nicotinamid	0,2
p-Aminobenzoic acid	0,1
Thiamin (Vit B1)	0,2
Panhotenic acid	0,1
Pyridoxamine	0,5
Cyanocobalamine (Vit B12)	0,1
Riboflavine	0,1

3.2 Analyse operationele parameters en microverontreinigingen

pH, EGV, zuurstof en temperatuur

De pH, EGV, zuurstof en temperatuur werden wekelijks gemeten. De pH-, EGV- en zuurstofsensoren werden wekelijks gekalibreerd. Van alle kolommen werden monsters van het influent en het effluent genomen. De temperatuur werd direct bij de influenttanks gemeten met een Testo 110 elektrische thermometer. Gezien de gestabiliseerde temperaturomstandigheden in de proefhal werd de temperatuur van het effluent constant verondersteld. De pH, EGV en zuurstof werden gemeten aan de hand van de verzamelde monsters van het influent en het effluent. Het water werd verzameld door de container volledig onder te dompelen in de influenttanks of de effluentpijpen om vermenging van atmosferische zuurstof met de watermonsters te voorkomen. De pH werd gemeten met een Radiometer PHM 210 sensor, de EGV met een Radiometer CDM 83 Conductivity meter en zuurstof met een WTW Oxi 340i membraan elektrode.

Acesulfaam, amidotrizoïnezuur, iopamidol en PFOA

De methode is gebaseerd op een directe injectie van het watermonster op een C18-kolom in combinatie met massaspectrometrie. Aan het watermonster worden eerst interne standaarden toegevoegd, waarna het gefiltreerd wordt over een 0,20 µm filter. Hierna wordt 100 µL van het watermonster op een C18 analytische kolom gebracht. De analyse wordt uitgevoerd met behulp van een Accela HPLC-systeem gekoppeld aan een triple quadrupole Vantage massaspectrometer. De massaspectrometer is uitgerust met een heated electrospray ionisatie-interface

(H-ESI) en meet volgens het selected reaction monitoring (SRM) principe. De analyse wordt uitgevoerd in positieve en negatieve ionisatiemodus.

Voor de chromatografische scheiding wordt gebruik gemaakt van een Hypersil Gold C18 kolom (100 mm × 2,1 mm I.D., deeltjesgrootte 1,9 µm) in combinatie met een Phenomenex SecurityGuard Ultra voorkolom. Het gehalte wordt berekend aan de hand van een externe kalibratiecurve, waarbij gecorrigeerd wordt voor de interne standaarden. De rapportagegrens van de methode is component afhankelijk, 0,01 µg/L tot 0,5 µg/L.

Diclofenac, metoprolol, propranolol, benzotriazool, carbamazepine en gabapentine

De methode is gebaseerd op een directe injectie van het watermonster op een C18-kolom in combinatie met massaspectrometrie. Aan het watermonster worden eerst interne standaarden toegevoegd, waarna het gefiltreerd wordt over een 0,20 µm filter. Hierna wordt 100 µL van het watermonster op een C18 analytische kolom gebracht. De analyse wordt uitgevoerd met behulp van een Shimadzu Nexera X2 HPLC-systeem gekoppeld aan een triple quadrupole SCIEX 6500+ massaspectrometer. De massaspectrometer is uitgerust met een heated electrospray ionisatie interface (H-ESI) en meet volgens het selected reaction monitoring (SRM) principe. De analyse wordt uitgevoerd in positieve ionisatiemodus.

Voor de chromatografische scheiding wordt gebruik gemaakt van een Phenomenex Luna Omega Polar C18 kolom (100 mm × 2,1 mm I.D., deeltjesgrootte 1,6 µm) in combinatie met een Phenomenex SecurityGuard Ultra voorkolom. Het gehalte wordt berekend aan de hand van een externe kalibratiecurve, waarbij gecorrigeerd wordt voor de interne standaarden. De rapportagegrens van de methode is 0,01 µg/L.

Herhaalbaarheid en meetonzekerheid methoden

Voor elke gemeten stof is de herhaalbaarheid (op 1 dag 8 analyses door 1 analist) bepaald voor drinkwater of oppervlaktewater monsters waar de stof aan toegevoegd is tot aan de rapportagegrens of hogere concentraties van 0,5 en 1 µg/L. De herhaalbaarheid is bekend voor iopamidol (6,7%), amidotrizoïne zuur (4%), acesulfaam (2,4%) en PFOA (6,7%) in drinkwater bij additie van 1 µg/L. Voor gabapentine, benzotriazool, propranolol, carbamazepine, diclofenac en metoprolol in oppervlaktewater bij additie van 0,5 µg/L tussen 1%-3,8%.

Voor de methode 'gidsstoffen' is ook de meetonzekerheid ook bekend. Deze is bekend geworden op basis van reproduceerbaarheid, met additieniveau van 0,5 µg/l. In tabel 8 zijn deze prestatiekenmerken getoond.

Tabel 8: prestatiekenmerken van methode 'gidsstoffen' in oppervlaktewater als matrix.

Methode: "Gidsstoffen"	Oppervlaktewater			
	Rapportagegrens ¹⁾ (µg/l)	Aantoonbaarheidsgrens ¹⁾ (µg/l)	Meetonzekerheid ²⁾ (%)	Terugvinding ²⁾ (%)
Gabapentine	0,01	0,004	5,0 (n=9)	101 (n=9)
Benzotriazool	0,01	0,001	8,3 (n=7)	102 (n=7)
Propranolol	0,01	0,0009	4,1 (n=8)	102 (n=8)
Carbamazepine	0,01	0,001	4,5 (n=10)	102 (n=10)
Diclofenac	0,01	0,0006	4,0 (n=12)	101 (n=12)
Metoprolol	0,01	0,002	4,9 (n=10)	102 (n=10)

¹⁾Op basis van herhaalbaarheid (n=8), additieniveau is 0,01 µg/l

²⁾Op basis van reproduceerbaarheid, additieniveau is 0,50 µg/l. Aantal metingen staat tussen haakjes vermeld.

Berekeningen

Verschillende berekeningen zijn uitgevoerd om de omzettingssnelheden van de verschillende OMV te berekenen:

- HRT (hydraulic retention time of contact tijd) = volume kolom / flow

- De verwijderingssnelheid (in g h^{-1}): $(C_{\text{effluent}} - C_{\text{influent}}) \times \text{flow}$ (L h^{-1})
- De volumetrische verwijderingssnelheid ($\mu\text{g/h}$): omzettingssnelheid per liter (kolommen hebben een volume van 0,7L)
- De specifieke verwijderingssnelheid ($\mu\text{g/h/gr}_{\text{zand}}$): omzettingssnelheid per gram zand (kolommen bevatten ongeveer 1400 gr zand)
- Aan de hand van de hoogst gevonden verwijderingssnelheid per OMV is de benodigde flow en contacttijd (i.e. hydraulische retentietijd (HRT)) voor verwijdering van 99% van de OMV in het influent water berekend. $\text{Flow}_{99} = \text{volumetrische verwijderingssnelheid } (\mu\text{g/h}) / \text{influent concentratie } (\mu\text{g/L})$. $\text{HRT}_{99} = \text{volume kolom} / \text{flow}_{99}$.

3.3 Microbiële populatieanalyse

Om een beeld te krijgen van de microbiële populaties die veranderen tijdens de experimenten, is microbiële populatieanalyse uitgevoerd m.b.v. next generation sequencing (NGS) op het 16S rRNA gen. Voor uitleg over deze methode, zie (Timmers, Slootweg et al. 2022). Op elk tijdstip wanneer de OMV zijn geanalyseerd is ook een zandmonster genomen voor NGS-analyse, behalve op het eerste tijdstip ($t=0$). In plaats daarvan zijn monsters genomen van het Loenderveen inoculum met en zonder menging van 10% WRK zand vlak voordat deze gebruikt zijn voor het vullen van de kolommen. Deze monsters zouden daarom voldoende representatief moeten zijn voor $t=0$ monsters. De microbiële populatieanalyse bestaat in dit rapport uit microbiële diversiteitsanalyse met behulp van de Faith's PD index en principal component analyses (PCA) van Bray Curtis dissimilariteit na Hellinger transformatie. Faith's PD is de fylogenetische analoog van soortenrijkdom. Hoe hoger de waarde voor Faith's PD, hoe hoger de diversiteit. Een hoge diversiteit zegt onder andere iets over hoeveel verschillende soorten micro-organismen er zijn en in welke verhouding. De uitleg over PCA kan gevonden worden in Box 1.

4 Resultaten

4.1 Analyse OMV in doseeroplossingen

Van de OMV-mix in de doseeroplossing waren de concentraties bepaald van de verschillende OMV, om te toetsen of de berekende concentraties van de stoffen overeenkwamen met gemeten concentraties. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 8. Te zien is dat de meeste OMV in ongeveer de geplande 10 mg/L voorkwamen in de doseeroplossing, behalve voor diclofenac die in 1,1 mg/L voorkwam. De influent-concentratie voor de kolommen (gemeten in de tank) was voor diclofenac hierdoor ook 10 keer lager dan gewenst (Tabel 6). De meest plausibele verklaring voor deze lage concentraties is dat door de lage oplosbaarheid van diclofenac een groot aandeel in het filter is achtergebleven tijdens het filteren van de stockoplossing. Voor PFOA geldt dat de concentratie van de stockoplossing iets lager lag dan de gewenste concentratie lag, maar dat concentratie in de tank (influent) nog lager was (Tabel 6). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat een deel van het PFOA aan de tank aan deeltjes geadsorbeerd is, dat uitgezakt is en daardoor niet gemeten in de vloeistof. Voor amidotrizoïnezuur is de concentratie in de doseeroplossing licht hoger dan de gewenste concentratie van 10 mg/L (Tabel 9), maar is de concentratie in de tank bijna 25 $\mu\text{g/L}$ in plaats van de geplande 10 $\mu\text{g/L}$ (Tabel 6). Dit komt waarschijnlijk niet door het achtergrondgehalte amidotrizoïnezuur in het influentwater van de Waterleidingplas, dat minder dan 150 ng/L bedraagt. De reden blijft hierdoor onbekend.

Tabel 9: gemeten concentraties van de OMV die aanwezig waren in de OMV-mix doseeroplossing dat toegevoegd werd aan het influent van de kolommen.

	Doseeroplossing (mg/L)
Iopamidol	9,5
Amidotrizoïnezuur	12
Acesulfaam	8,9
Gabapentine	9,6
Benzotriazool	9,2
Propranolol	9,7
Carbamazepine	9,7
PFOA	7,8
Diclofenac	1,1
Metoprolol	9,6

4.2 EGV, pH, O₂, temperatuur

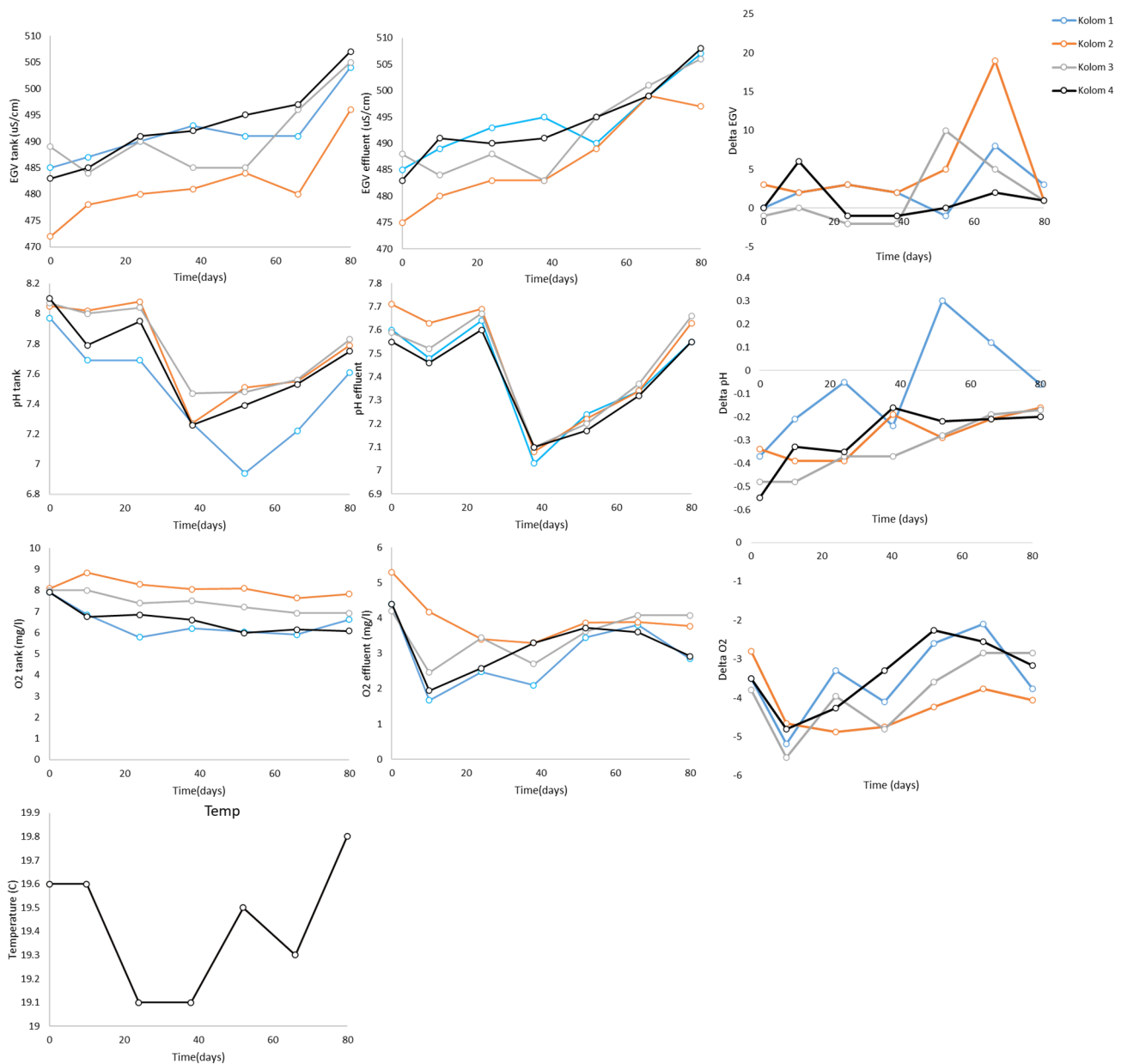
Operationele parameters die gemeten waren in het effluent van elke kolom zijn EGV ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, en zuurstof (mg/l). In de voedingstank zijn deze parameters ook gemeten, en daarnaast is ook de temperatuur ($^{\circ}\text{C}$) bijgehouden, die representatief was voor de gehele ruimte waar de kolommen opgesteld stonden.

Voor de tank en het effluent van de kolommen zijn deze parameters weergegeven in Figuur 9, waarbij ook de delta EGV, delta pH en delta O₂ gegeven zijn. Dit zijn de verschillen tussen de waarden in de tank en in het effluent van de kolommen en kunnen beschouwd worden als verschil tussen influent en effluent.

Resultaten tonen dat alle kolommen dezelfde temperatuur en pH trend volgden, met een sterke daling in pH rond 40 dagen, ongeveer de temperatuurfuctuaties volgend. Diezelfde daling was ook te zien in het tankwater, dat waarschijnlijk veroorzaakt wordt door microbiële activiteit in de tanks, dat gekoppeld is aan de temperatuur. In de Waterleidingplas was de pH-daling niet waargenomen. Het influent vertoonde wat meer variatie in pH dan het effluent van de kolommen, wat aantoont dat snelfiltratie de pH stabiliseert. Het influent in de tank voor kolom 1 vertoonde een lagere pH dan het influent in de andere tanks en de daling in pH vond pas bij 52 dagen plaats. Omdat de pH van het effluent voor alle kolommen gelijk was, vertoonde kolom 1 dus een stijging van pH in het effluent t.o.v. het influent.

Voor de EGV volgen alle kolommen een soortgelijke trend, maar deze bleef het laagst voor het influent en het effluent van kolom 2 (zonder nutriënten), waarbij een piek van toename optrad in het effluent t.o.v. het influent op dag 66. Omdat het EGV al lager was in de influent van de tank werd dit waarschijnlijk veroorzaakt door de afwezigheid van extra nitraat, fosfaat en ammonium, dat een lagere EGV veroorzaakt.

Voor zuurstof is te zien dat de kolommen die nutriënten en/of vitamines en sporenelementen ontvangen (kolom 1, 3 en 4) aan het begin meer zuurstofverbruik vertoonden dan de kolom zonder nutriënten (kolom 2), maar dat kolom 2 na 24 dagen meer zuurstofverbruik liet zien. Ook in het influent was bij kolom 1 en 4 minder zuurstof aanwezig. Het zuurstofverbruik in de kolommen nam met de tijd af, maar na het dal bij 66 dagen leek het zuurstofverbruik in de kolommen weer toe te nemen. De temperatuur liet in het influent van alle tanks dezelfde schommelingen zien tijdens het experiment, met een verlaging van de temperatuur tussen 24 en 38 dagen van ongeveer 19,6 naar 19,1 $^{\circ}\text{C}$ en een totale schommeling tussen 19,1 $^{\circ}\text{C}$ en 19,8 $^{\circ}\text{C}$.



Figuur 9: DE EGV ($\mu\text{S/cm}$), pH, zuurstofconcentratie (mg/l) en temperatuur ($^{\circ}\text{C}$) in het influent in de doseertank (links) en het effluent van de kolommen (midden). Het verschil tussen het influent van de tank en het effluent is weergegeven als delta EGV, delta pH en delta zuurstof (rechts).

4.3 Ammonium en nitraat

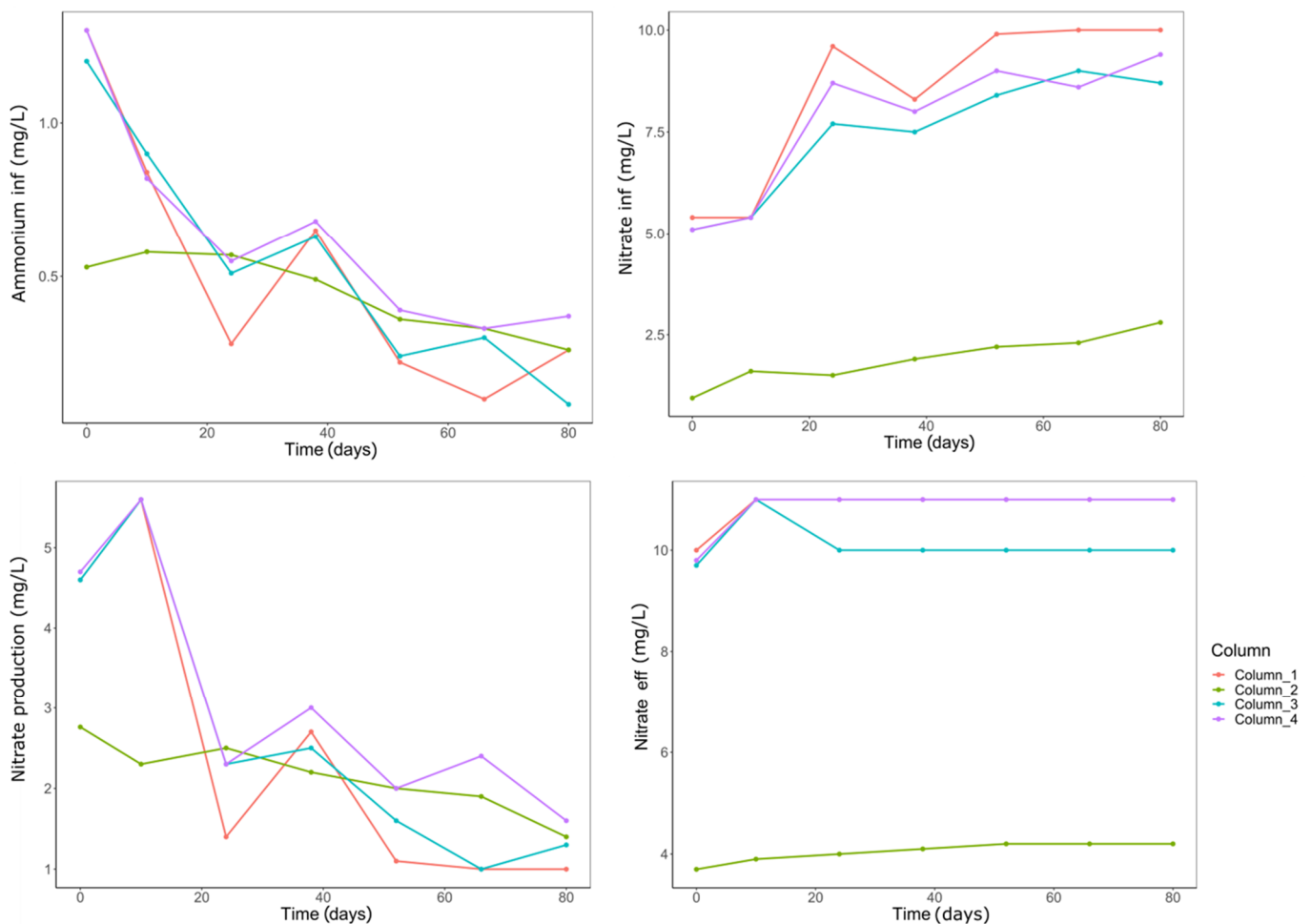
Ammonium en nitraat zijn in het influent en effluent van alle kolommen gemeten. De effluent concentratie van ammonium was altijd 0 mg/L. Hiermee is de nitraatproductie (nitrificatie) ook berekend (Figuur 10). Er was ongeveer 0,8 mg/L ammonium en 4,0 mg/L nitraat toegevoegd aan het influent in de tanks voor kolommen 1, 3 en 4 (Tabel 7). Aan kolom 2 was geen nitraat en ammonium toegevoegd aan het influent en de gemeten concentraties zijn de concentraties van het water die in de tanks met het Waterleidingplas water gemeten zijn.

De verwijdering van ammonium was gedurende het experiment altijd volledig, dat aangeeft dat al het ammonium tijdens het gehele experiment geoxideerd werd. De stoichiometrie van nitrificatie is dat 1 mol ammonium 1 mol

nitraat levert. Het influent water in de tank bevatte ongeveer 0,5-0,6 mg/L ammonium aan het begin van het experiment (zie influent kolom 2 zonder nutriënten, Figuur 10). Dat maakt 1,72-2 mg/L nitraat tijdens volledig nitrificatie. Het influent water in de tank bevatte aan het begin ook ongeveer 2 mg/L nitraat (zie influent kolom 2 zonder nutriënten, Figuur 10), dus dat levert samen met nitrificatie van ammonium in totaal rond 4 mg/L nitraat tijdens volledige nitrificatie. Dit was inderdaad de concentratie in het effluent van de kolommen zonder nutriënten-toevoeging (zie effluent kolom 2 zonder nutriënten, Figuur 10), wat aangeeft dat al het ammonium omgezet werd in nitraat tijdens nitrificatie.

De kolommen met nutriënten-toevoeging ontvingen aan het begin ongeveer 1,3 mg/L ammonium, wat precies de som is van de natuurlijk aanwezige 0,5 mg/L en de toevoeging van 0,8 mg/L ammonium. Nitrificatie van 1,3 mg/L ammonium levert 4,5 mg/L nitraat. Daarnaast ontvingen de kolommen met nutriënten-toevoeging 2 mg/L nitraat vanuit het Loenderveen water en een extra toevoeging van 4 mg/L in de nutriënten oplossing. In totaal zou er dus $4,5 + 2 + 4 = 10,5$ mg/L nitraat in het effluent van de kolommen aanwezig moeten zijn als er volledige nitrificatie optreedt. De gemeten concentratie van ongeveer 11 mg/L kwam daar redelijk mee overeen (Figuur 10).

Tijdens het experiment nam de ammoniumconcentratie van het influent in alle tanks af, wat gepaard ging met een toename van nitraat. Dit geeft aan dat er nitrificatie in de tanks plaatsvond. Deze nitrificatie was hoger in de tanks van de kolommen waar ammonium en nitraat aan toegevoegd waren (kolom 1,3 en 4), waardoor de nitraatconcentratie in het influent na 24 dagen was opgelopen tot 8-10 mg/L. In het effluent van de kolommen lag de nitraatconcentratie vanaf het begin op 11 mg/L. Na 24 dagen vond de meeste nitrificatie dus niet meer plaats in de kolommen, maar in de tanks, waardoor er vrijwel geen verschil in ammoniumconcentratie en dus nitrificatieactiviteit meer was tussen de verschillende kolommen. Dit komt overeen met het zuurstofverbruik in de kolommen, dat het hoogste was in de eerste 24 dagen en daarna afnam in de tijd. De tanks met het influent werden wekelijks aangevuld met water uit de Waterleidingplas en nutriënten (kolom 1, 3 en 4), waardoor de micro-organismen in de tank wekelijks werden gevoed met ammonium. Dat aspect heeft het mogelijk gemaakt voor de micro-organismen om zich in de tanks op te hopen.



Figuur 10: Ammonium en nitraatconcentraties (mg/L) in het influent (inf) en nitraatconcentraties in het effluent (eff) van de kolomexperimenten en de berekende nitraatproductie (mg/L). Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

4.4 Adsorptie OMV aan zandmateriaal

Om onderscheid te maken tussen sorptie aan zandmateriaal en biologische verwijdering van OMV, zijn de concentraties van de OMV bepaald in het snelle zandfiltermateriaal aan het begin en eind van de kolomexperimenten. Voor het bepalen van de concentraties aan het begin ($t=0$) van de experimenten, hebben we RSF-materiaal van de bemonsterde Loenderveen-filter en van de Loenderveen-filter na menging met 10% WRK-ent bewaard voor OMV-analyses. Aan het eind van het experiment (30-09-2021) is van alle kolommen ook zandfiltermateriaal verzameld en bewaard. Van al deze monsters is een analyse gedaan van de OMV-concentraties in het zand (Tabel 10).

Resultaten tonen dat sommige OMV sorptie vertonen aan het zandfiltermateriaal. PFOA en propanolol vertonen de meeste sorptie en zijn toegenomen tot hoge concentraties in het zandfiltermateriaal aan het einde van het experiment. Amidotrizoïnezuur, benzotriazool en carbamazepine vertoonden ook sorptie, maar in veel mindere mate.

Tabel 10: De concentraties van OMV ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in het Loenderveen-zandfiltermateriaal zonder ent (L) en met 10% WRK-ent (L+WRK) voor start van de kolomexperimenten ($t=0$) en de concentraties van de OMV in het zandfiltermateriaal van de kolommen aan het eind van het experiment (30-09-2021). De Δ waarden geven de verschillen weer in OMV-concentratie tussen $t=0$ en het eind van het experiment in de kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

[OMV] in $\mu\text{g}/\text{kg}$	L ($t=0$)	L + WR K ($t=0$)	Kolom 1	Δ Kolom 1	Kolom 2	Δ Kolom 2	Kolom 3	Δ Kolom 3	Kolom 4	Δ Kolom 4
Iopamidol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amidotrizoïne zuur	0	0	0,9	0,9	1	1	0,6	0,6	0,7	0,7
Acesulfaam	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gabapentine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Benzotriazool	0,1	0,2	1,7	1,5	1,4	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1
Propranolol	0	0	12	12	13	13	12	12	7,1	7,1
Carbamazepine	0	0	1,6	1,6	1,8	1,8	1,3	1,3	1,3	1,3
PFOA	0,6	0	43	43	53	53	45	44,4	47	46,4
Diclofenac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metoprolol	0	0	0	0	0	0	0,12	0,12	0	0

4.5 Verwijdering OMV in filtraat

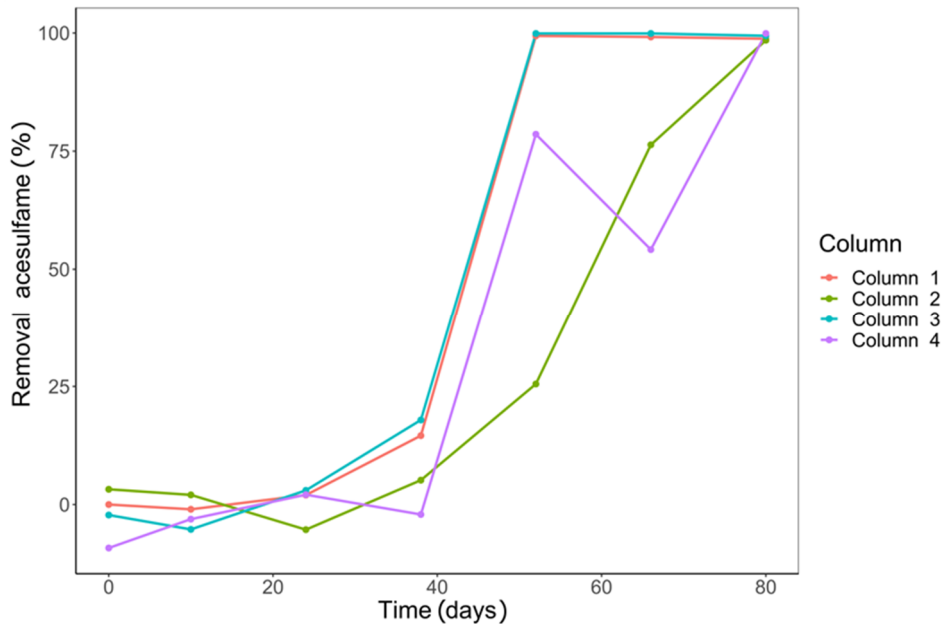
Naast de analyse van OMV in het zandfiltermateriaal zijn de OMV-concentraties ook bepaald van het influent (in de tank) en effluent van de kolommen en van de doseringsoplossingen. Dit is elke twee weken gedaan met een totaal van zeven momenten tijdens de loop van de kolomexperimenten. Door de concentraties van het effluent en het influent te vergelijken hebben we de verwijderingspercentages van de OMV bepaald. In deze paragraaf wordt de verwijdering van elke OMV besproken in volgorde van hoge naar lage verwijdering.

Zeer hoge verwijdering (99%) was te zien van **acesulfaam**, **gabapentine** en **metoprolol**. Middelhoge verwijdering (30-55%) was te zien voor **propranolol** en **diclofenac**. Lage verwijdering (<20%) was te zien voor **PFOA**, **carbamazepine**, **benzotriazool**, **amidotrizoïne zuur** en **iopamidol**.

Acesulfaam

Acesulfaam werd in alle kolommen na 80 dagen voor 99% verwijderd (Figuur 11). De geënte kolom die nutriënten en sporenelementen ontving (kolom 1) en de geënte kolom die alleen nutriënten ontving (kolom 3), vertoonden hetzelfde gedrag en bereikten na 52 dagen al 99% verwijdering. De geënte kolom die alleen sporenelementen

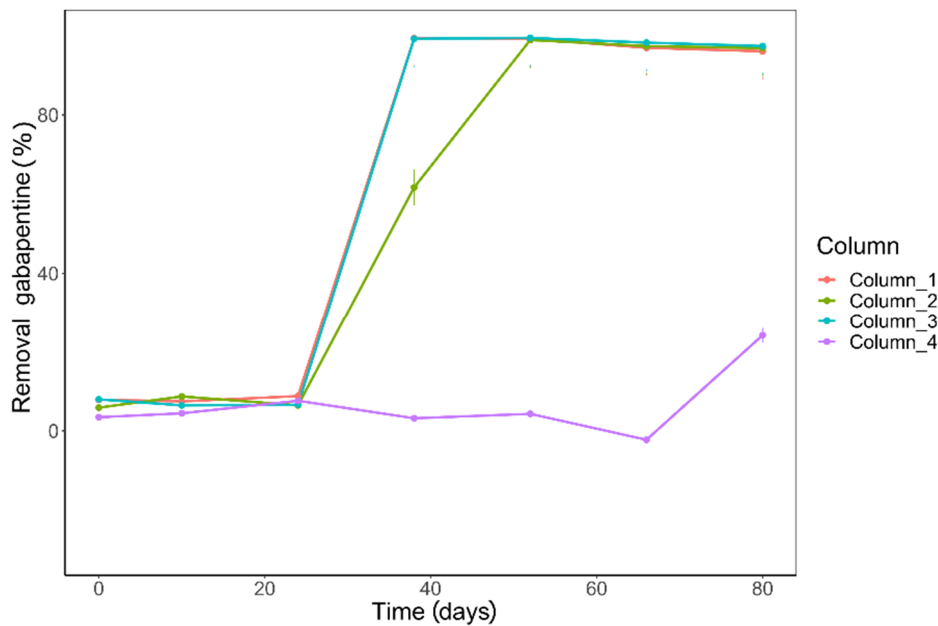
ontving (kolom 2) en de niet-geënte kolom die nutriënten en sporenelementen ontving (kolom 4), vertoonden pas 99% verwijdering na 80 dagen. Deze resultaten tonen aan dat toevoeging van nutriënten en entmateriaal, en niet van sporenelementen en entmateriaal, de verwijdering van acesulfaam bevordert. Daarnaast tonen de resultaten dat de niet-geënte kolom, ongeacht nutriënten en sporenelementen, meer tijd nodig heeft om acesulfaam te verwijderen dan de geënte kolom.



Figuur 11: De acesulfaamverwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

Gabapentine

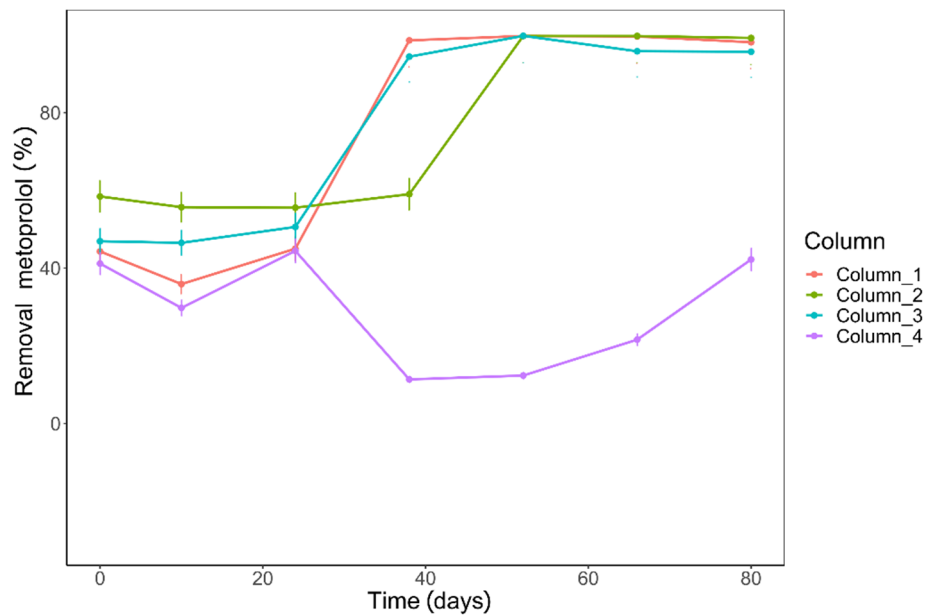
Gabapentine wordt in alle geënte kolommen (kolom 1 t/m 3) na 52 dagen voor 99% verwijderd (Figuur 12). De geënte kolom die nutriënten en sporenelementen ontving (kolom 1) en de geënte kolom die alleen nutriënten ontving (kolom 3) vertoonden hetzelfde gedrag en bereikten na 38 dagen al 99% verwijdering. De geënte kolom die alleen sporenelementen ontving (kolom 2) vertoonde pas 99% verwijdering na 52 dagen. De niet-geënte kolom die nutriënten en sporenelementen ontving (kolom 4) vertoonde gedurende het hele experiment vrijwel geen verwijdering van gabapentine. Deze resultaten tonen aan dat toevoeging van nutriënten en entmateriaal, en niet van sporenelementen en entmateriaal, de verwijdering van gabapentine bevordert. Opvallend is dat de niet-geënte kolom vrijwel geen verwijdering liet zien. Pas op dag 80 leek een verbeterde verwijdering (~20%) van gabapentine in kolom 4 op te treden, maar dit betreft een enkel meetpunt en is dus minder betrouwbaar.



Figuur 12: De gabapentine verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen. Standaarddeviaties (meetonzekerheid) zijn berekend aan de hand van de waarden uit Tabel 8.

Metoprolol

Metoprolol werd in alle geënte kolommen (kolom 1 t/m 3) na 52 dagen voor 99% verwijderd (Figuur 13). De geënte kolom die nutriënten en sporenelementen ontving (kolom 1) en de geënte kolom die alleen nutriënten ontving (kolom 3), vertoonden hetzelfde gedrag en bereikten na 38 dagen al 99% verwijdering. De geënte kolom die alleen sporenelementen ontving (kolom 2) vertoonde pas 99% verwijdering na 52 dagen. De niet-geënte kolom die nutriënten en sporenelementen ontving (kolom 4) vertoonde vanaf het begin lagere verwijdering dan de geënte kolommen en deze nam juist af tussen dag 24 en 38, terwijl de geënte kolommen op dat moment juist een toename van verwijdering lieten zien. Na dag 38 nam de verwijdering in de niet-geënte kolom echter weer toe, maar bleef beduidend lager dan in de andere kolommen. Deze resultaten tonen aan dat toevoeging van nutriënten en entmateriaal, en niet van sporenelementen en entmateriaal, de verwijdering van metoprolol bevordert. Opvallend is dat de niet-geënte kolom de eerste 24 dagen een soortgelijke verwijdering laat zien als de andere kolommen maar tussen dag 24 en 38 juist afneemt. De toename na 38 dagen in kolom 4 is mogelijk veroorzaakt door het langzaam op gang komen van biologische verwijdering. Zandfiltermateriaal van de kolommen vertoont vrijwel geen aanwezigheid van metoprolol aan het einde van het experiment, alleen in kolom 3 is aan het eind van het experiment te zien dat er nog (zeer weinig) metoprolol aan het zandfiltermateriaal is gebonden (Tabel 9). Dit is de verwachting wanneer metoprolol uiteindelijk voor 99% biologisch verwijderd wordt.

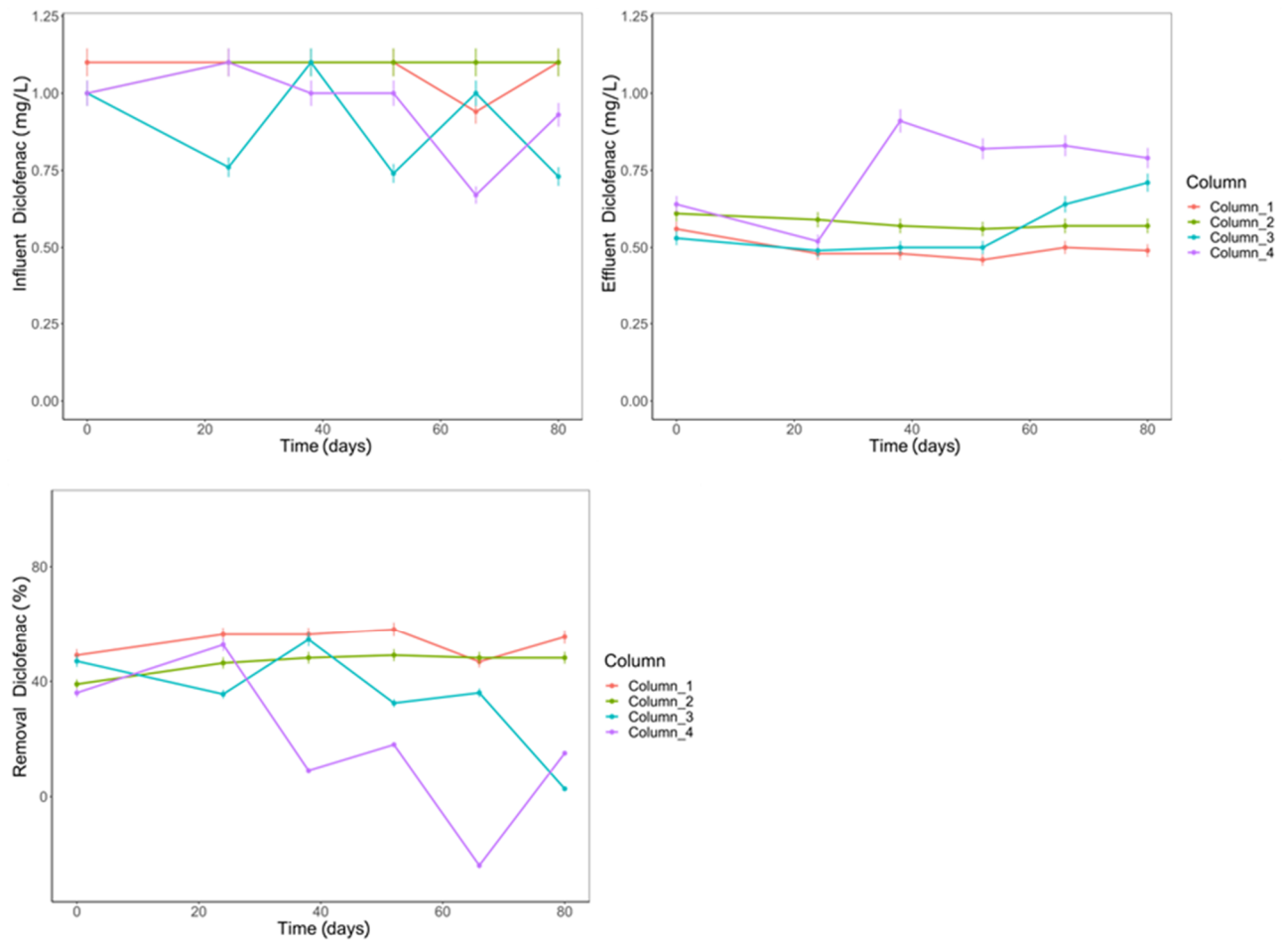


Figuur 13: De metoprolol verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen. Standaarddeviaties (meetonzekerheid) zijn berekend aan de hand van de waarden uit Tabel 8.

Diclofenac

Diclofenac kwam in een lagere concentratie voor in het influent dan de andere OMV (1 $\mu\text{g/L}$ ipv 10 $\mu\text{g/L}$), wat veroorzaakt is door de lagere concentraties in de doseeroplossing. Opvallend is dat de influentconcentraties ook fluctueerden voor alle kolommen, behalve voor de kolom zonder toegevoegde nutriënten (kolom 2). Het meetpunt op 10 dagen week zelfs zo erg af bij kolom 1, 3 en 4 dat dit op een meetfout duidt. Dit meetpunt is daarom niet getoond.

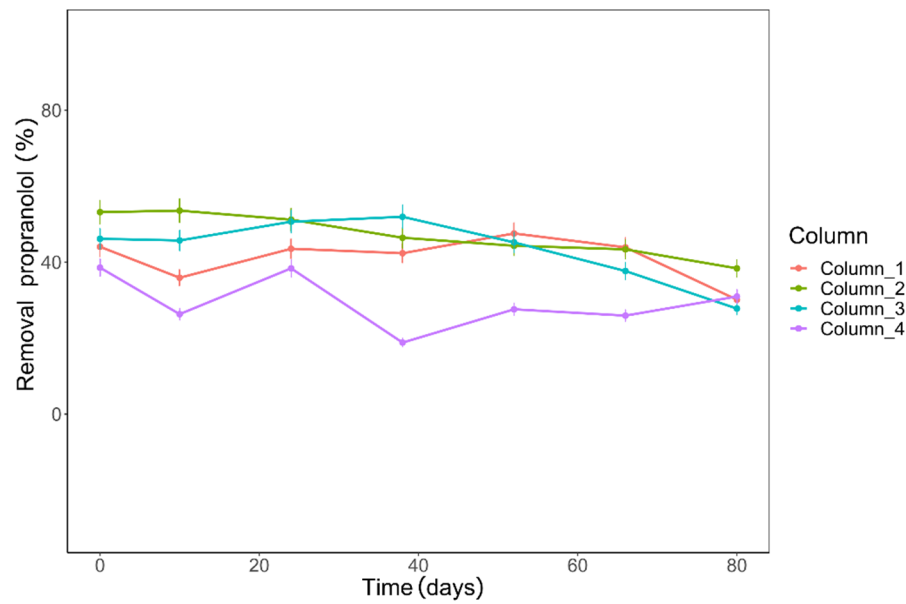
Voor diclofenac zagen we 40-50% verwijdering vanaf het begin van het experiment, wat voor de geënte kolommen met nutriënten en sporenelementen (kolom 1) en voor de geënte kolommen met alleen sporenelementen (kolom 2) aanbleef tot het eind van het experiment (Figuur 14). Voor de geënte kolom met alleen nutriënten (kolom 3) nam de verwijdering na 66 dagen af. Voor de niet-geënte kolom (kolom 4) nam de verwijdering al na 24 dagen af. Directe en stabiele verwijdering van diclofenac vanaf het begin van het experiment kan duiden op sorptieprocessen of aanwezigheid van micro-organismen die diclofenac kunnen verwijderen. Er is echter geen sorptie van diclofenac gemeten aan het snelle zandfiltermateriaal aan het einde van het experiment (Tabel 9), wat biologische afbraak aannemelijker maakt.



Figuur 14: De diclofenacconcentraties ($\mu\text{g/l}$) in het influent (boven) en het effluent (onder) gedurende de tijd (dagen) en de verwijdering (%) (rechts) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen. Standaarddeviaties (meetonzekerheid) voor influent en effluent zijn afkomstig uit Tabel 8, waarbij die voor de verwijdering zijn berekend aan de hand van de waarden in Tabel 8.

Propranolol

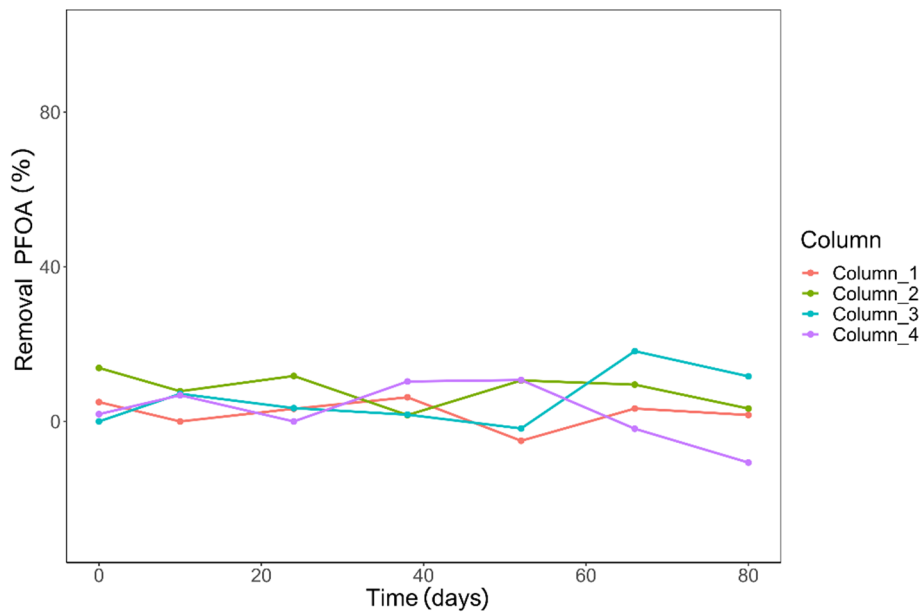
Voor propranolol was de verwijdering direct bij de start van het experiment hoog (40-55%), en nam gedurende het experiment af (30-40%) in alle kolommen, ongeacht bioaugmentatie of biostimulatie (Figuur 15). Opvallend is dat de verwijdering iets slechter was van dag 0 tot dag 68 wanneer de kolom niet geënt was met 10% WRK materiaal (kolom 4). Mogelijk heeft het WRK-materiaal een betere sorptiecapaciteit. Dit was ook te zien aan het feit dat het zandfiltermateriaal van kolom 4 minder propranolol bevatte aan het eind van het experiment dan de kolommen met geënte zandfilters (Tabel 9). Eerdere analyse van de full-scale zandfilters (van Bel, Bertelkamp et al. 2020) liet zien dat propranolol wel gemeten was, maar niet aangetroffen in het influent en effluent van beide WRK en Loenderveen-filters (Tabel 2).



Figuur 15: De propranolol verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen. Standaarddeviaties (meetonzekerheid) zijn berekend aan de hand van de waarden uit Tabel 8.

PFOA

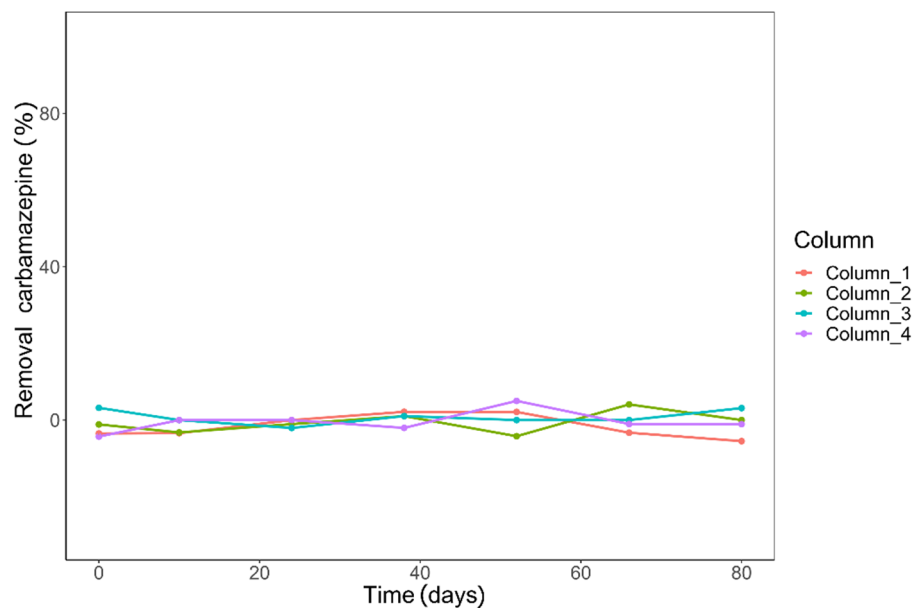
Voor PFOA was de verwijdering zeer laag (<15%) en was er ook geen verschil te zien in verwijdering tussen de verschillende behandelingen van de kolommen (Figuur 16). PFOA heeft zich opgehoopt in het zandfiltermateriaal tijdens het experiment (Tabel 9). Dit impliceert ook dat adsorptieprocessen de overhand hebben. Op enkele momenten lijkt de verwijdering toe te nemen, maar op andere momenten lijkt de verwijdering weer af te nemen (Figuur 16). Deze grillige patronen zijn niet makkelijk te verklaren met eventuele verwijderingsprocessen, maar lijkt niet te duiden op variatie in de metingen (de herhaalbaarheid is 6,7%). In ieder geval laten de resultaten zien dat er weinig tot geen verwijdering plaatsvond en dat dit komt door minimale sorptie. Deze lage adsorptie kan ervoor gezorgd hebben dat uiteindelijk toch een deel van PFOA geadsorbeerd was aan het filtermateriaal tijdens het experiment (Tabel 9) en dat er geen verzadiging heeft opgetreden.



Figuur 16: De PFOA verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

Carbamazepine

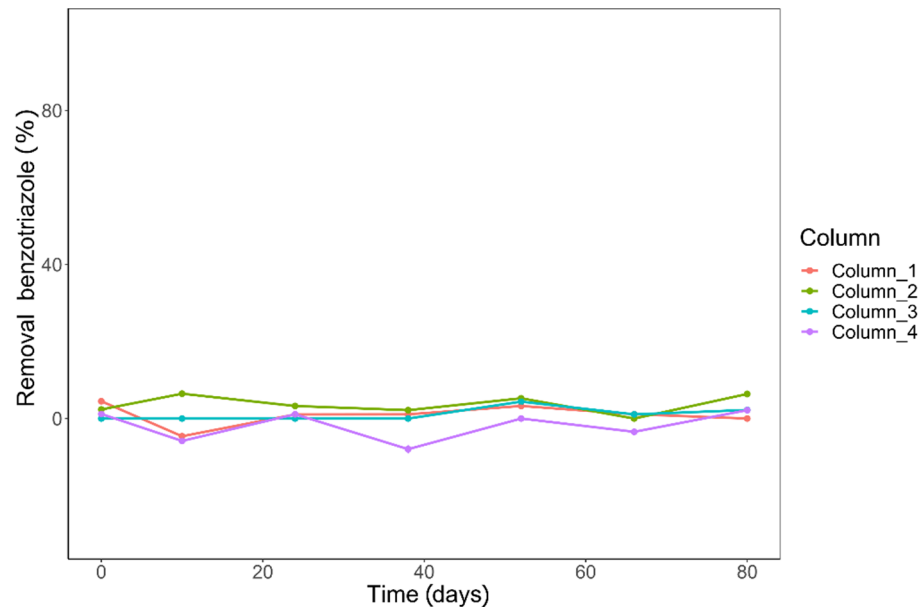
Carbamazepine werd vrijwel niet verwijderd gedurende het experiment (Figuur 17). De verwijdering fluctueert tussen 0 en 4%. Ondanks dat carbamazepine in eerder onderzoek was aangetroffen in full-scale zandfilters van WRK, maar niet in filters van Loenderveen (van Bel, Bertelkamp et al. 2020), lijkt dit niet tot biologische verwijdering of substantiële adsorptie te leiden.



Figuur 17: De carbamazepine verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen. Standaarddeviaties (meetonzekerheid) zijn berekend aan de hand van de waarden uit Tabel 8.

Benzotriazool

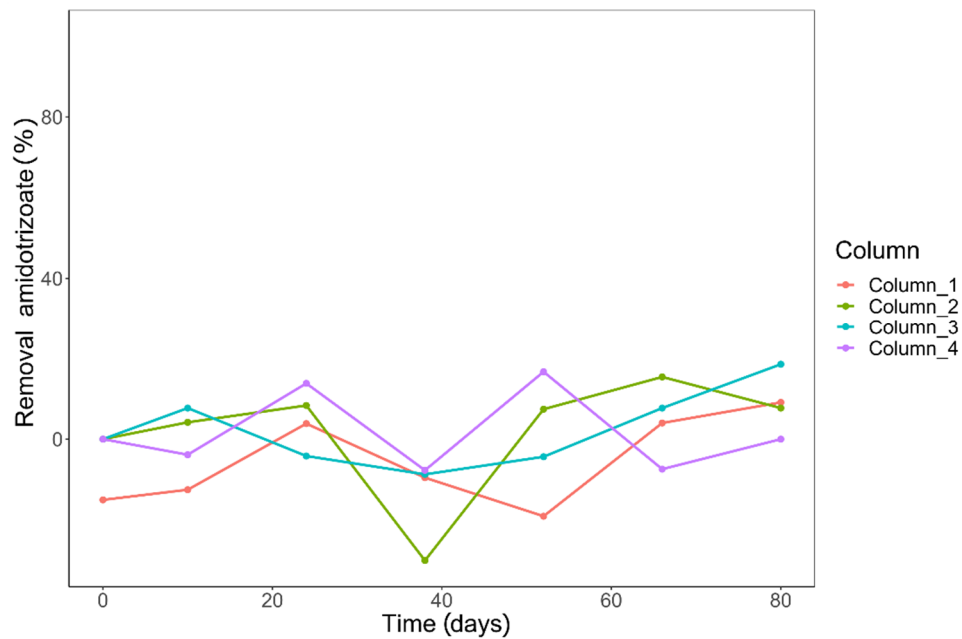
Benzotriazool werd net als carbamazepine vrijwel niet verwijderd, met verwijdering tussen de 0 en 6,5% (Figuur 18). De verwijdering lijkt zoals voor propranolol te komen door adsorptie. Alle kolommen vertonen inderdaad adsorptie van benzotriazool aan het zandfiltermateriaal (Tabel 9), en er lijkt weinig verschil te zijn tussen de verschillende kolommen.



Figuur 18: De benzotriazool verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen. Standaarddeviaties (meetonzekerheid) zijn berekend aan de hand van de waarden uit Tabel 8.

Amidotrizoïne zuur

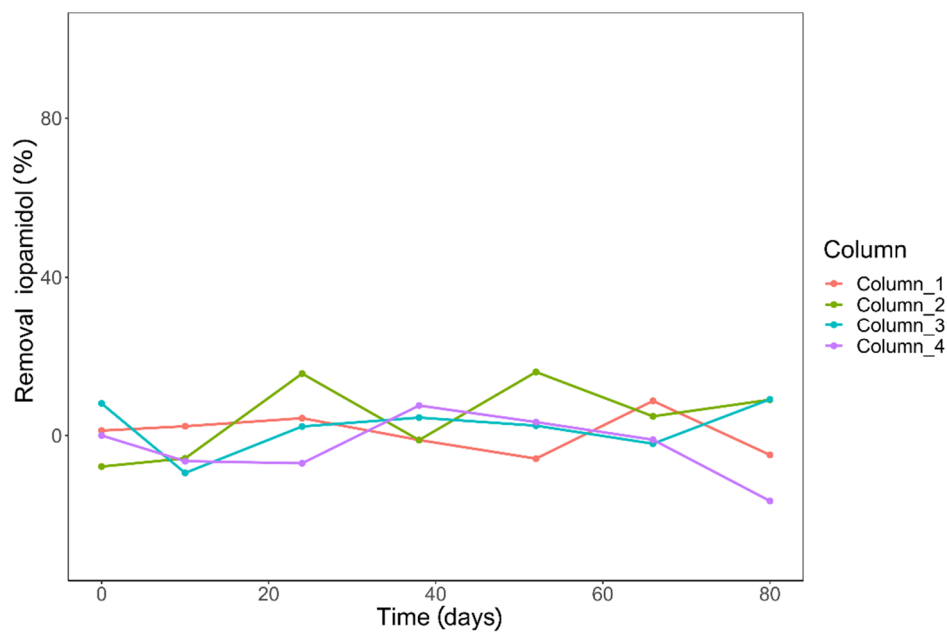
Amidotrizoïnezuur vertoonde fluctuerende verwijdering waarbij de verwijdering gemiddeld over alle kolommen fluctueerde tussen 0 en 16% (Figuur 19). Er leek ook geen verschil te zijn tussen de vier kolommen in de mate van verwijdering. Het zandfiltermateriaal van alle kolommen bevatte aan het einde van het experiment ongeveer evenveel amidotrizoïnezuur, onafhankelijk van de toevoeging. Eerdere analyse van de full-scale zandfilters (van Bel, Bertelkamp et al. 2020) liet zien dat amidotrizoïnezuur wel gemeten was, maar niet aangetroffen in het influent en effluent van beide WRK- en Loenderveen-filters (Tabel 2).



Figuur 19: De amidotrizoïnezuur verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

Iopamidol

Iopamidol vertoonde ook fluctuerende verwijdering, waarbij verwijdering over alle kolommen maximaal 16% is (Figuur 20). Iopamidol liet geen adsorptie zien aan het filtermateriaal (Tabel 9), wat impliceert dat Iopamidol niet geadsorbeerd wordt.



Figuur 20: De Iopamidol verwijdering (%) gedurende de tijd (dagen) in de vier kolommen. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

Verwijderingssnelheden

Voor elke OMV zijn ook de volumetrische en specifieke verwijderingssnelheden bepaald (zie materiaal en methoden). Aan de hand daarvan kan de HRT (i.e. contacttijd) berekend worden die nodig is om 99% van de OMV te verwijderen (HRT_{99}). Deze gegevens staan in Tabel 11. Deze berekeningen helpen om de bevindingen van dit onderzoek te vergelijken met ander onderzoek en om te extrapoleren of de verwijdering van de OMV rendabel zal zijn in full-scale snelle zandfilters. Voor de OMV die maximaal verwijderd werden (99%) zijn de HRT_{99} waarden niet betrouwbaar, want het is onbekend of deze maximale verwijdering niet bij een lagere HRT ook al bereikt had kunnen worden, en de HRT_{99} dus nog lager zou kunnen zijn. Voor andere OMV komt duidelijk naar voren dat het verhogen van de HRT kan helpen voor de verwijdering van deze stoffen.

OMP	Group	CAS number	MW	pK _s	Log K _{ow}	Average concentration on influent (ug/L)	Time at highest removal (days)	Removal (%)	Specific removal rate (µg h ⁻¹ gr ⁻¹ sand)	Volumetric removal rate (µg h ⁻¹ L ⁻¹)	HRT ₉₉ (h)
Acesulfame-K	Sweetener	33665-90-6	163.2	2	-1.33	9.52	52 (C1)	99	0.022	39.36	0.23
Amidotrizoate	X-ray contrast	117-96-4	613.9	-	1.37	24.64	80 (C3)	18.5	0.011	20	1.22
1-H Benzotriazole	Chelating agent	95-14-7	119.1	8.37	1.44	9	10 (C2)	6.5	0.001	2.4	3.52
Carbamazepine	Pharmaceutical	298-46-4	236.3	13.9	2.45	9.46	52 (C4)	5	0.001	2	4.54
Diclofenac	Pharmaceutical	15307-86-5	296.2	4.15	4.51	0.93	52 (C1)	58.2	0.001	2.56	0.39
Iopamidol	X-ray contrast	60166-93-0	777.1	10.7	-2.42	8.75	24 (C2)	15.5	0.003	5.6	1.92
Metoprolol	Pharmaceutical	51384-51-1	267.4	9.7	1.88	8.2	52 (C1)	99	0.018	32.32	0.23
Propranolol	Pharmaceutical	525-66-6	259.3	9.42	3	8.12	10 (C2)	53.6	0.010	18	0.42
Gabapentin	Pharmaceutical	60142-96-3	171.2	3.7	-1.1	9.04	38 (C1)	99	0.020	36.96	0.23
PFOA (Perfluorooctanoic acid)	PFAS	335-67-1	414.1	1.3-2.8	4.81	5.93	38 (C1)	6.25	0.001	1.6	3.64

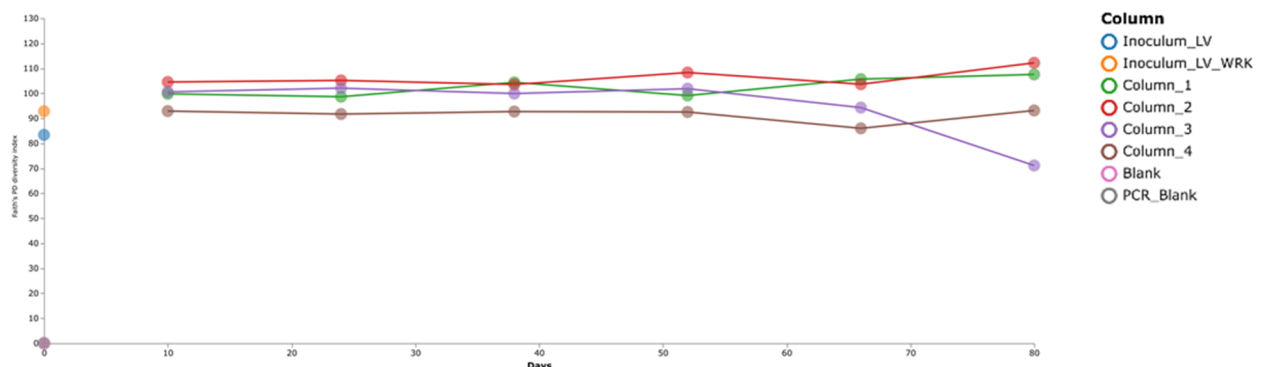
Tabel 11: Eigenschappen van de gedoseerde OMV met de verwijderingssnelheden op een bepaald tijdstip waarbij maximale verwijdering is geobserveerd en de berekende hydraulische retentietijd die nodig is om 99% omzetting te verkrijgen (HRT₉₉)

4.6 Microbiële populatieanalyse

4.6.1 Microbiële compositie

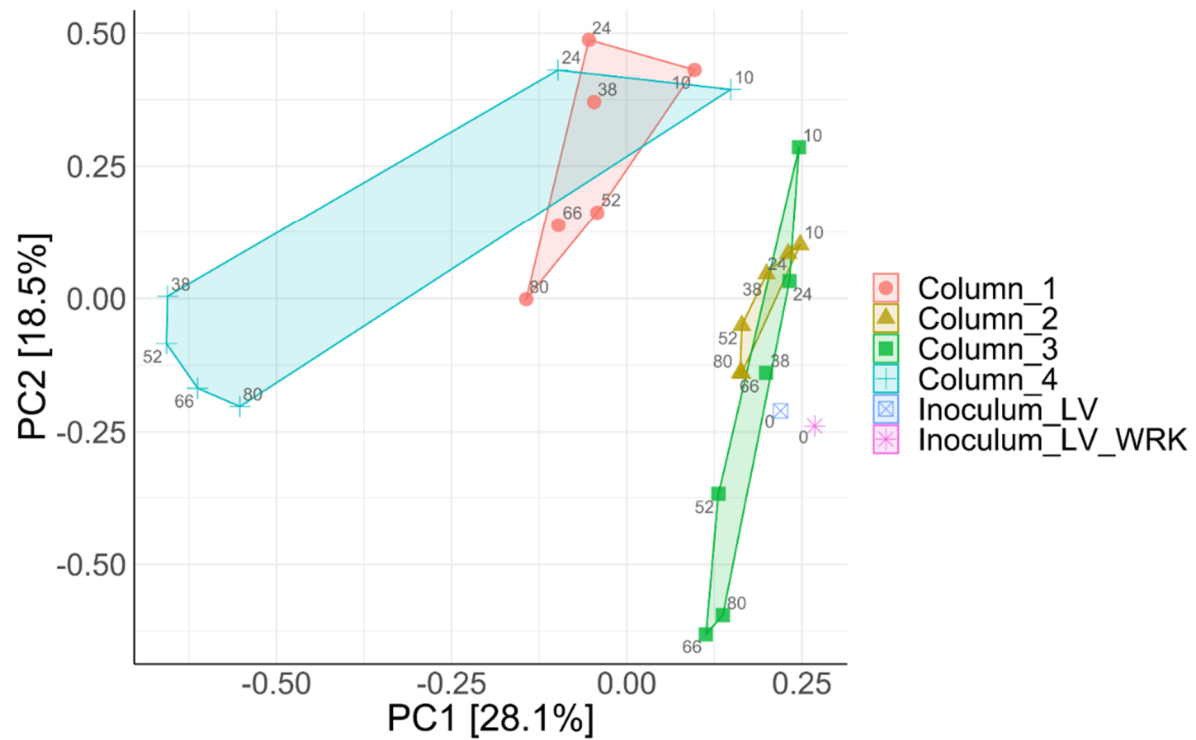
Eén van de onderzoeksvragen van het onderzoek is ook of de microbiële gemeenschap in zijn algemeenheid verschillen laat zien tijdens OMV-verwijdering in de kolommen, en of eventuele verschillen in de microbiële gemeenschap te correleren zijn aan de verwijdering van (bepaalde) OMV.

Een belangrijke microbiële ecologische parameter is de microbiële diversiteit, dat uitgedrukt is in Faith's Phylogenetic Diversity (PD). Faith's PD is de fylogenetische analogoog van soortenrijkdom. Hoe hoger de waarde voor Faith's PD, hoe hoger de diversiteit. Een hoge diversiteit zegt onder andere iets over hoeveel verschillende soorten micro-organismen er zijn. De Faith's PD resultaten lieten zien dat de microbiële diversiteit wat hoger was in de Loenderveen monsters die gemengd waren met 10% WRK materiaal dan in degene die niet gemengd waren (Inoculum_LV_WRK en Inoculum_LV, respectievelijk, Figuur 21). Hierdoor lag de microbiële diversiteit van de geënte kolommen gedurende het experiment wat hoger dan de niet-geënte kolom (Figuur 21). Kolom 1 heeft een significant hogere diversiteit dan kolom 4 en kolom 2 heeft een significant hogere diversiteit dan kolom 3 en 4. Alle kolommen vertonen een lichte verhoging van de microbiële diversiteit op 80 dagen, behalve kolom 3. Op het laatste tijdstip van kolom 3 nam de microbiële diversiteit juist behoorlijk af. Dit monster had ook tijdens de opwerking een andere kleur en een lagere DNA-concentratie. Door deze afwijkende waarnemingen voor kolom 3 is het vermoeden dat dit monster niet van de bovenkant van het zandfilter kolom was genomen, wat wel het geval was bij de andere genomen monsters.



Figuur 21: De microbiële diversiteit (Faith's PD diversity index) van de blanco monsters (Blank en PCR Blank), de inocula Loenderveen (LV) en Loenderveen met 10% WRK (LV_WRK) en de kolomexperimenten uitgezet tegen de tijd (dagen). De experimentele opzet van de verschillende kolommen (column 1-column 4) staat in Tabel 4. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

Naast microbiële diversiteit is de compositie van de microbiële gemeenschap ook van belang. Twee microbiële gemeenschappen kunnen dezelfde diversiteit hebben, maar van een geheel andere samenstelling. Met Principal Component Analysis (PCA) kunnen de verschillen in de samenstelling van een microbiële gemeenschap in kaart worden gebracht (zie BOX1 voor uitleg over deze methode). Elk punt in een PCA stelt een microbiële gemeenschap van één monster voor. Hoe dichter twee punten bij elkaar liggen, hoe meer deze microbiële gemeenschappen op elkaar lijken. De resultaten in Figuur 22 laten een PCA plot zien van de microbiële gemeenschappen van alle monsters.



Figuur 22: Principal component analyse (PCA) van de microbiële gemeenschappen in de kolomexperimenten. Principal component 1 (PC1) en principal component 2 (PC2) verklaren samen 46.6% van de variabiliteit in de data. Elke kleur en vorm is een andere kolom (zie legenda) en het getal bij elk punt is de monsterdag. De experimentele opzet van de verschillende kolommen (column 1-column 4) staat in Tabel 4. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

BOX 1: Principal component analysis

Principal component analysis (PCA) is een ordinatiemethode die gebruikt wordt om het verschil tussen microbiële gemeenschappen van monsters te visualiseren. De verschillen tussen monsters kunnen op verschillende manieren berekend worden, zoals met de Bray-Curtis dissimilatie-index die in deze studie is toegepast.

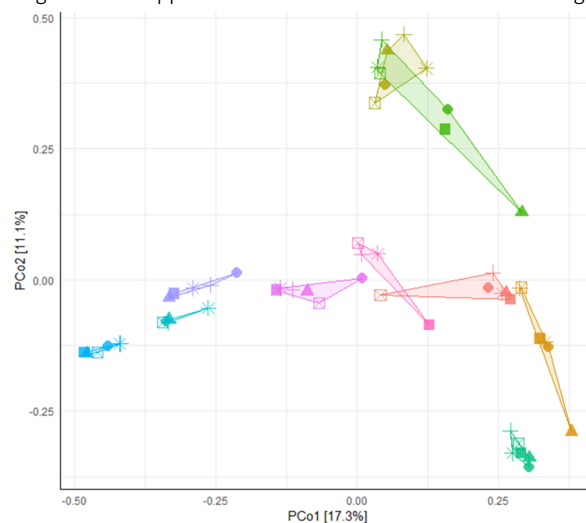
Deze index is een kwantitatieve maat voor verschillen in de microbiële populaties tussen monsters. Deze maat vergelijkt hoeveel verschillende sequenties van micro-organismen er zijn tussen monsters, maar ook hoeveel van elke sequentie voorkomt in ieder monster en hoe deze aantallen verschillen tussen monsters en wordt beschreven met de volgende formule:

$$Bray-Curtis = \frac{2A_{i,j}}{S_i + S_j}$$

waarbij i het ene monster en j het andere monster is; $A_{i,j}$, het laagste aantal sequenties die in allebei de monsters aanwezig zijn, S_i , het totaal aantal sequenties in monster i en S_j , het totaal aantal sequenties in monster j . Het getal dat hier uitkomt (tussen 0 en 1) wordt ook wel de afstand (distance) tussen twee monsters genoemd.

Met deze index wordt dus een afstandswaarde berekend tussen de populatiesamenstelling van monster 1 en monster 2, monster 1 en monster 3, monster 1 en monster N, monster 2 en monster 3, monster 2 en monster N, monster 3 en monster N, etc. Dat levert een kruistabel met monsters op de x en y-as en een afstandswaarde voor de overeenkomst/verschil tussen de populaties tussen twee monsters. Die grote kruistabel wordt middels PCA gereduceerd tot een groot aantal ongedefinieerde variabelen die verschillen in de mate waarin ze de variantie van de kruistabel verklaren. De twee tot drie variabelen die de hoogste mate van variantie verklaren kunnen vervolgens worden uitgezet op de x en y of x, y en z-as (Ramette 2007), de zogenaamde principal components (PC's). In een PCA plot staan op elkaar gelijkende microbiële gemeenschappen dicht bij elkaar en sterk verschillende microbiële gemeenschappen ver van elkaar af.

In het geval van NGS-data stelt dus elk punt in een PCA-plot een microbiële gemeenschap van een monster voor. Hieronder is een voorbeeld gegeven waarin de x- en y-as samen 28,4% van de variatie in de data verklaren. Er is duidelijk te zien hoe de verschillende microbiële gemeenschappen met elkaar in verhouding staan; de punten met dezelfde kleur zijn microbiële gemeenschappen die uit hetzelfde soort water afkomstig zijn.



Alle kolommen verschillen significant van elkaar in microbiële compositie (PERMANOVA, $p < 0.05$). De verschillen tussen de kolommen worden vooral bepaald door toevoeging van nutriënten (17%), bioaugmentatie met WRK-materiaal (13%) en vitamines-sporenelementen (11%) (Adonis test, $p < 0.05$). PCA-analyse laat ook zien dat kolom 1 en 4 (die beide nutriënten en vitamines-sporenelementen ontvangen) op het begin nog veel op elkaar lijken qua microbiële compositie, maar dat na 38 dagen kolom 4 veel is veranderd. Dit correspondeert met de verwijdering van acesulfaam, gabapentine en metoprolol, die zeer verschillend zijn tussen kolom 1 en 4 na 38 dagen. Kolom 2 en 3 clusteren meer samen met de inocula, waarbij kolom 3 na 66 dagen sterk afwijkt van kolom 2. Dat correspondeert met de afname in microbiële diversiteit in de laatste twee monsters op 66 en 80 dagen.



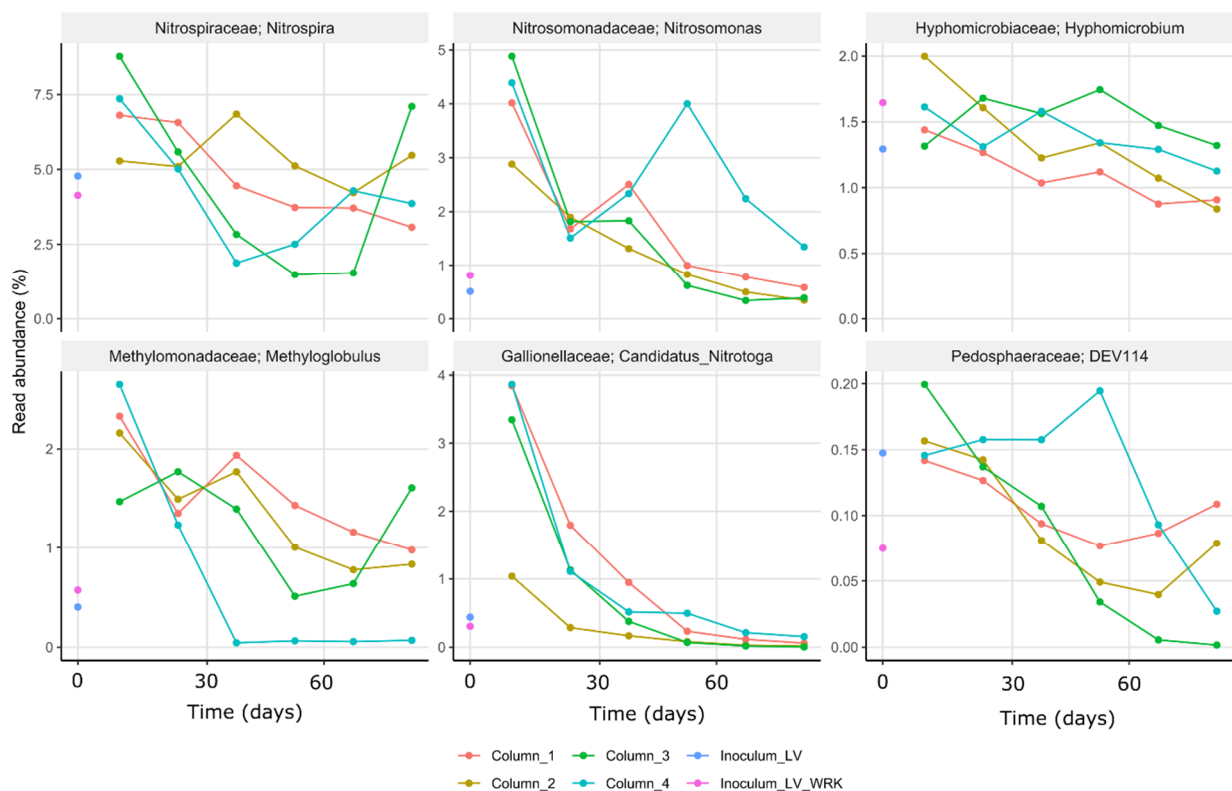
Figuur 23: Heatmap van de top 25 meest abundante genera in de kolomexperimenten. De getallen in de cellen zijn relatieve abundanties (%), op de x-as staan de monsterdagen. De experimentele opzet van de verschillende kolommen (column 1-column 4) staat in Tabel 4. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

De meest abundante genera zijn vaak bepalend voor de verschillen in microbiële populaties en zijn daarom gegeven in Figuur 23. Hierin zijn een paar dingen duidelijk te zien: Het inoculum dat gemengd is met WRK materiaal bevat meer *Planctomyceten* en *Anaerolineae*, maar wijkt verder niet heel sterk af van Loenderveen materiaal dat niet gemengd was met WRK materiaal. Dit komt overeen met de algemene kolomprestaties (EGV, ammonium, nitraat) en OMV-verwijdering die niet veel anders waren tussen de twee inocula bij het begin van de experimenten.

Kolommen 1 en 4 bevatten beide *Leucobacter*, die niet voorkomt in kolom 2 en 3 en in het inoculum. Dit kan verklaren waarom deze kolommen dan ook samen clusteren (Figuur 22). Het lijkt dat deze micro-organismen toegenomen zijn door de aanwezigheid van de combinatie van nutriënten en vitamines-sporenelementen. Kolom 4 wijkt verder af van de andere kolommen door sterke afname in de tijd van *Pirellula*, *Methyloglobulus* en *Entotheonellaceae*. Kolom 3 vertoont een sterke toename van *Planctomycetes* en *Alphaproteobacteria* vanaf 52 dagen. Dit komt overeen met de daling in microbiële diversiteit (Figuur 21) en de sterke afwijking in microbiële compositie t.o.v. kolom 2 (Figuur 22).

4.6.2 Correlaties met ammoniumverwijdering

Resultaten van ammonium- en nitraatmetingen lieten zien dat nitrificatie in de eerste 24 dagen plaatsvond in de kolommen, waarna dit verminderde (maar nog steeds optrad) en voornamelijk plaatsvond in de voedingstanks. Correlatieanalyse van ammonium- of nitraatconcentraties met microbiële populaties lieten zien dat een aantal genera een positieve correlatie (Spearman correlatie test, $p > 0,4$) vertoonden met ammoniumconcentraties in het influent en nitraatproductie. Hieronder vallen, zoals verwacht, genera die ammoniumoxiderende (AOB) en/of nitrietoxiderende bacteriesoorten (NOB) bevatten, zoals *Nitrospira*, *Nitrosomonas*, en "*Candidatus Nitrotoga*" (Figuur 24). Verder vertoonden *Methyloglobulus* (een methaan- en methanoloxiderend genus) en *Hyphomicrobium* (dit genus bevat metabole diverse bacteriesoorten, waaronder soorten die facultatief methanol en monomethylamine, maar niet methaan, oxideren met behulp van denitrificatie) ook deze correlatie. De correlatie tussen de drastisch afname van ammoniumoxidatie na 24 dagen in de kolommen en de relatieve abundantie van AOB en NOB tonen dat nitrificerende micro-organismen (en enkele methaan- en methanoloxiderende soorten) waarschijnlijk niet betrokken waren bij de biologische verwijdering van de hier gedoseerde OMV. OMV verwijdering van acesfulaam, gabapentine en metoprolol neemt namelijk juist toe na de eerste 24 dagen.



Figuur 24: De relatieve abundanties (%) van zes genera die een positieve correlatie ($R^2 > 0.4$) vertoonden met ammoniumconcentraties gedurende de tijd (dagen) in de kolomexperimenten. Elke kleur is een andere kolom of inoculum (zie legenda). De experimentele opzet van de verschillende kolommen (column 1-column 4) staat in Tabel 4. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en

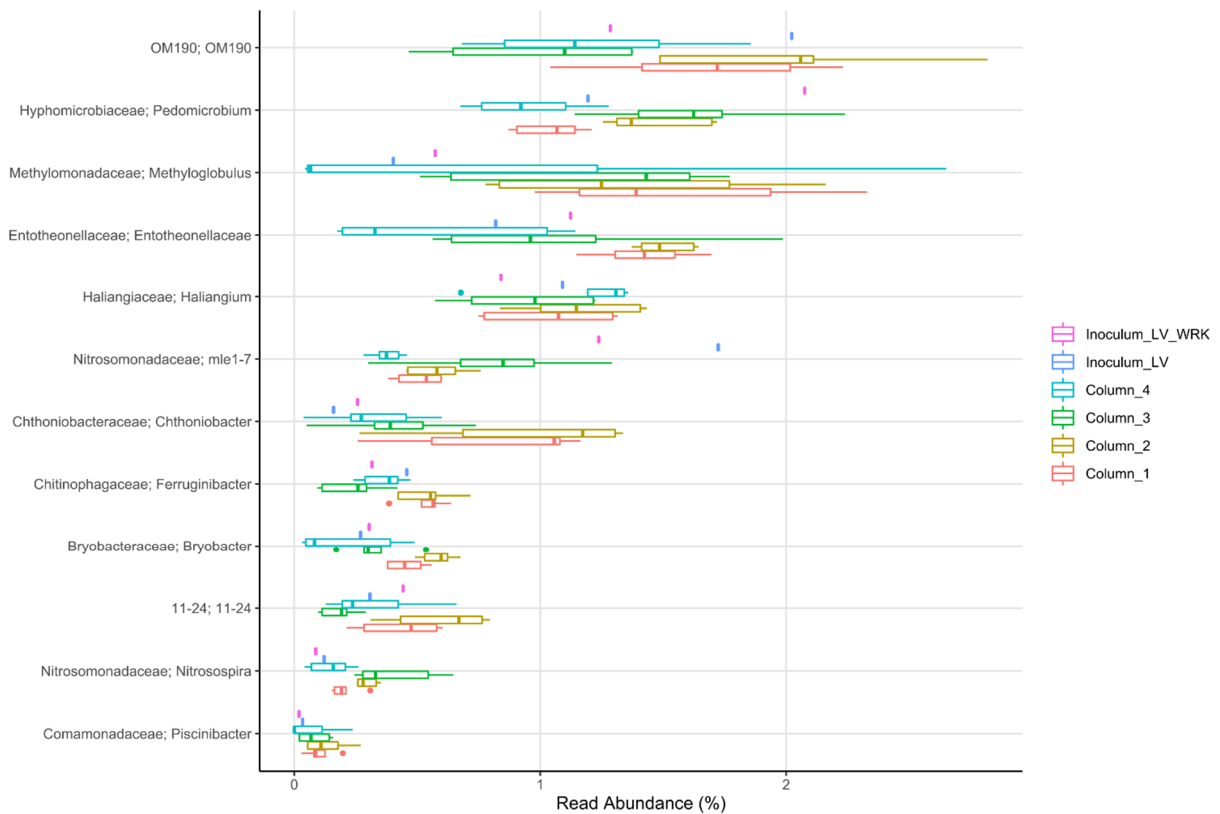
sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

4.6.3 Correlaties met OMV-verwijdering

Om te bepalen of micro-organismen mogelijk betrokken zijn bij de verwijdering van OMV in de kolommen, zijn er meerdere analyses uitgevoerd. Hieronder zijn deze analyses op een rijtje gezet:

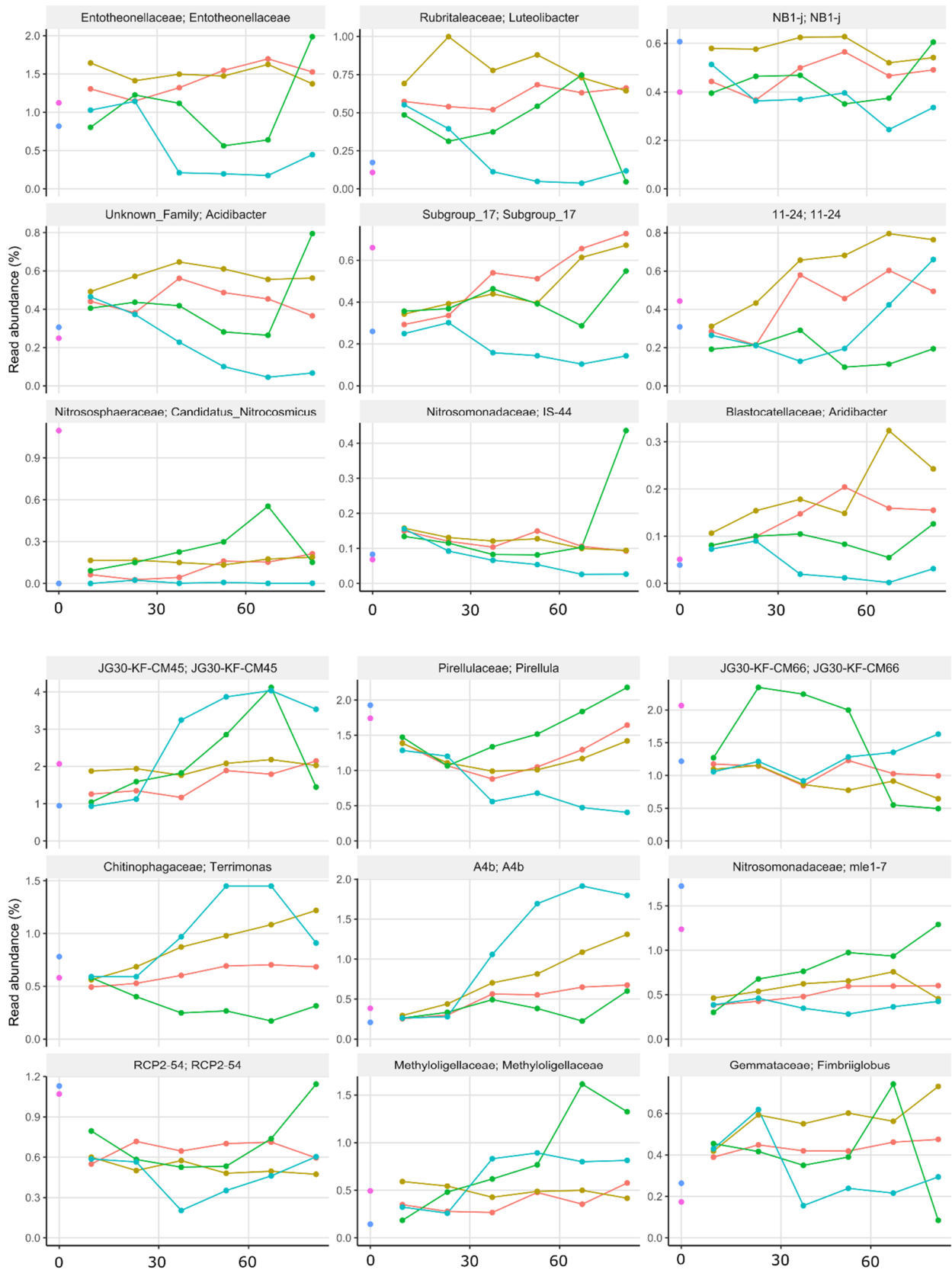
1. Er is bepaald of micro-organismen meer voorkomen in de kolommen die geënt zijn (kolom 1 t/m 3) t.o.v. de niet-geënte kolom (kolom 4). Uit deze differentiële abundantieanalyse zijn een aantal genera naar voren gekomen (Figuur 24). Het voorkomen van deze genera in geënte kolommen wil uiteraard niet zeggen dat ze betrokken zijn bij OMV-verwijdering, maar het is voor metoprolol- en gabapentineverwijderende micro-organismen wel een vereiste dat ze voorkomen in de geënte kolommen omdat er geen verwijdering plaatsvond in de niet-geënte kolommen.
2. Er is een correlatieanalyse uitgevoerd tussen microbiële populaties en de tijd; ofwel, nemen de micro-organismen toe in relatieve abundantie gedurende de kolomexperimenten? In het geval van acesulfaam, metoprolol en gabapentine nam de verwijdering toe in de tijd, dus is de verwachting dat de betrokken micro-organismen ook toenemen in de tijd i.v.m. de aanname dat het metabole verwijdering door micro-organismen betreft. Het is met NGS-analyse lastig om dit vast te stellen, omdat de resultaten in relatieve abundantie en niet in absolute aantallen uitgedrukt worden. Desalniettemin geeft een afname in relatieve abundantie in ieder geval een mogelijke indicatie dat het micro-organisme waarschijnlijk *niet* betrokken is bij de OMV-verwijdering.
3. Er is een correlatieanalyse uitgevoerd tussen microbiële populaties en de verwijdering van acesulfaam, gabapentine, metoprolol en diclofenac. De verwachting is dat, zoals bij punt 2 beschreven, de betrokken micro-organismen ook toenemen bij hogere verwijdering i.v.m. de aanname dat het metabole verwijdering betreft.

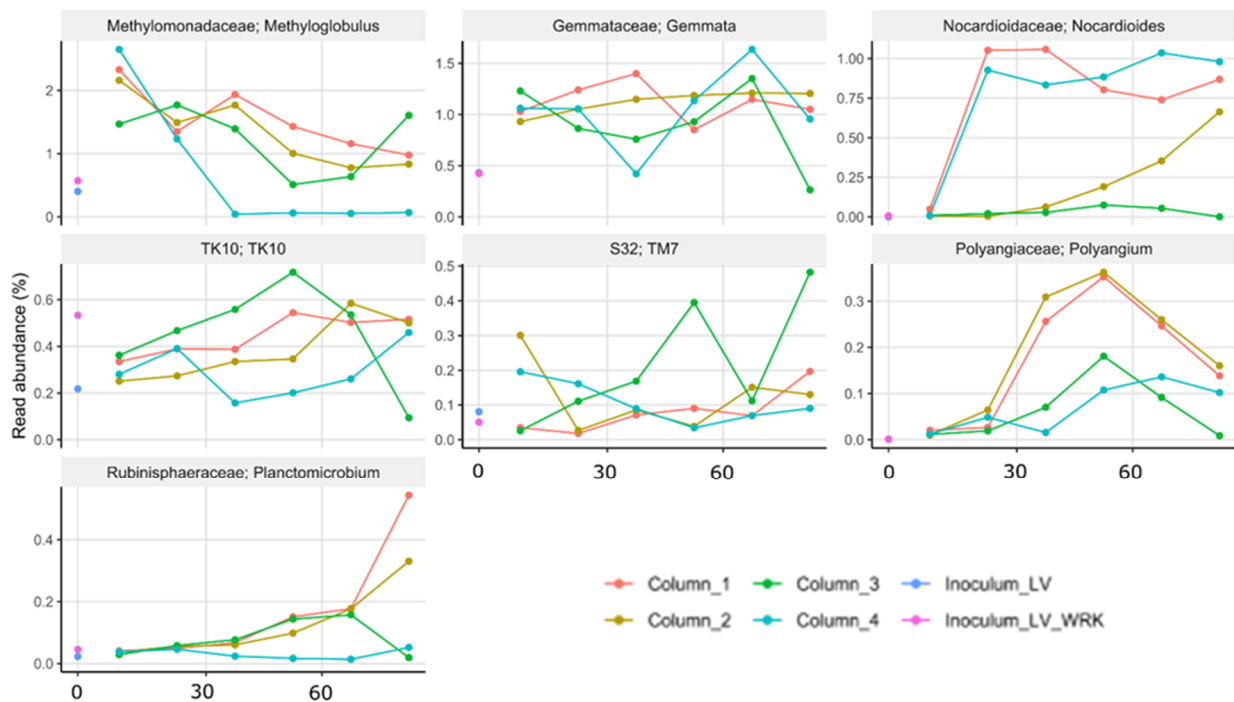
Resultaten van de exercitie van punt 1 zijn gegeven in Figuur 25, waarbij de relatieve abundantie te zien is voor de inocula en de kolommen. Dit zijn gemiddelde relatieve abundanties van alle tijdstippen. Voornamelijk OM190, *Pedomicrobium*, *Methyloglobulus*, *Enthothionellaceae*, *Nitrospira*, *Bryobacter*, *Ferruginibacter*, *Chthoniobacter* en *Nitrosomonadaceae* m1e 1-7 komen minder voor in de niet-geënte kolommen.



Figuur 25: Boxplots van de genera die meer voorkomen in de geënte kolommen in vergelijking met de niet-geënte kolommen (ANCOM differential abundance analysis). Elke kleur is een andere kolom of inoculum (zie legenda). De experimentele opzet van de verschillende kolommen (column 1-column 4) staat in Tabel 4. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

Resultaten van de exercitie van punt 2 en 3 zijn samengevoegd. Van alle genera die een correlatie met tijd en/of OMV-verwijdering vertoonden is visueel bepaald of deze genera in ieder geval niet afnemen in de tijd en het liefst toenemen in de tijd in de kolommen. Deze resultaten zijn gegeven in Figuur 26. Omdat alle OMV samen gedoseerd waren in de kolommen, kan er niet per OMV bepaald worden welke genera betrokken kunnen zijn bij de verwijdering. Wel komen duidelijk een aantal kandidaten naar voren die toenemen in *alle* kolommen, en dus mogelijk betrokken kunnen zijn bij de verwijdering van acesulfaam omdat deze stof in alle kolommen goed verwijderd werd. Genera die vooral toenemen in de kolommen 1 t/m 3 kunnen mogelijk betrokken zijn bij de verwijdering van metoprolol en gabapentine omdat verwijdering van deze OMV vooral in deze kolommen toenam. Voor diclofenac was dit niet te bepalen, omdat de verwijdering niet sterk toe- of afnam.





Figuur 26: De relatieve abundanties (%) van genera die een positieve correlatie ($R^2 > 0.4$) vertoonden met incubatietijd, verwijdering van metoprolol, gabapentine en/of acesulfaam gedurende de tijd (dagen) in de kolomexperimenten. Elke kleur is een andere kolom of inoculum (zie legenda). De experimentele opzet van de verschillende kolommen (column 1-column 4) staat in Tabel 4. Kolom 1: 10% RSF-entmateriaal, nutriënten en sporenelementen; kolom 2: 10% RSF-entmateriaal en sporenelementen; kolom 3: 10% RSF-entmateriaal en nutriënten; kolom 4: nutriënten en sporenelementen.

Van een aantal groepen is niet bekend tot welk genus deze behoren dus worden ze ingedeeld op familieniveau. Daarnaast is van veel micro-organismen niet bekend wat het metabolisme of functie is, vaak omdat er geen genera of soorten van gecultiveerd zijn. Deze genera hebben daarom ook geen naam, maar een code. Van deze genera in Figuur 26 waarvan wel enigszins informatie bekend is, wordt de informatie gegeven in Tabel 12. Deze informatie is geen algemene informatie over alle soorten binnen het genus; het kan zijn dat verschillende soorten binnen een genus een volledig ander metabolisme hebben.

Tabel 12: Eigenschappen van de genera die correlaties vertoonden met incubatietijd, verwijdering van metoprolol, gabapentine en/of acesulfaam.

Genus/groep	Familie	e ⁻ acceptor	e ⁻ donor	Metabolisme	Referentie
<i>Entothionellaceae</i>	<i>Entothionellaceae</i>	?	?	?	
<i>Luteolibacter</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	Zuurstof, nitraat	Organisch koolstof	Facultatief aeroob, chemo- organoheterotroof	(Jiang, Li et al. 2012, Pascual, García-López et al. 2017)
NB1-j	?	?	?	?	

<i>Acidibacter</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	Ijzer(III)	Organisch koolstof	Ijzerreducerend, micro-aeroob of anaeroob, obligaat heterotroof	(Falagán and Johnson 2014)
Subgroup 17	<i>Acidobacteria</i>	?	?	?	
11-24					
<i>Candidatus Nitrocosmicus</i>		Zuurstof	ammonium	Lithoautotrofe ammoniumoxidatie Aeroob	(Lehtovirta-Morley, Ross et al. 2016)
<i>Aridibacter</i>	<i>Blastocatellaceae</i>	Zuurstof en nitraat	Organisch koolstof	Aeroob, chemo-organoheterotroof	(Huber, Geppert et al. 2017)
JG30-KF-CM45	?	?	?	?	
<i>Pirellula (Rhodopirellula baltica)</i>	<i>Pirellulaceae</i>	Zuurstof en soms nitraat	Organisch koolstof	Aeroob, chemo-organoheterotroof	(Fuerst 2017)
<i>Terrimonas</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	Zuurstof	Organisch koolstof	Strikt aeroob, chemo-organoheterotroof	(Jin, Wang et al. 2013)
A4b	?	?	?	?	
<i>Nitrosomonadaceae</i> mle 1-7	<i>Nitrosomonadaceae</i>	Zuurstof	Ammonia	Lithoautotrofe ammoniumoxidatie, aeroob	(Lehtovirta-Morley, Ross et al. 2016) (Prosser, Head et al. 2014)
<i>Methyloligellaceae</i>	<i>Methyloligellaceae</i>	Zuurstof	Methaan en gemethyleerde verbindingen	Methaanoxidatie, aeroob, autotroof	(Begmatov, Savichev et al. 2021)
<i>Fimbrioglobus</i>	<i>Gemmataceae</i>	Zuurstof	Organisch koolstof	Strikt aeroob, chemo-organoheterotroof	(Kulichevskaya, Ivanova et al. 2017)
<i>Polyangium</i>	<i>Polyangiaceae</i>	Zuurstof	Organisch koolstof	Aeroob, chemo-organoheterotroof	(Wang, ran et al. 2021)
<i>Planctomicrobium</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	Zuurstof	Organisch koolstof	Aeroob, chemo-organoheterotroof	(Kulichevskaya, Ivanova et al. 2015)

Zoals in Tabel 12 te zien is, hebben de meeste genera/groepen die toenamen in de tijd, en gecorreleerd waren met verwijdering van acesulfaam, gabapentine en/of metoprolol, een aeroob en heterotroof metabolisme, dat wil zeggen gebruiken organisch koolstof voor groei. Daarnaast kunnen enkele van deze micro-organismen naast zuurstof, ook nitraat reduceren (denitrificatie). Sommige kwamen veel minder voor in de niet-geënte kolom t.o.v. de geënte kolommen, zoals bijvoorbeeld *Enthothionellaceae* en *Nitrosomonadaceae* mle 1-7.

Naast bovenstaande analyses, is er ook gekeken of OMV-verwijderende micro-organismen die beschreven zijn in de literatuur, voorkwamen in de kolomexperimenten. Acesulfaamdegradatie is aangetoond voor het genus *Chelatococcus* (behorende bij orde *Hyphomicrobiales*) (Huang, Deng et al. 2021). Ook de families *Phyllobacteriaceae*, *Methylophilaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, en het genus *Pseudomonas* werden geassocieerd met verwijdering van acesulfaam (Kahl, Kleinsteuber et al. 2018). Gabapentine biodegradatie was aangetoond voor *Micrococcus luteus*, maar dit was tijdens co-metabolische afbraak van glucose (Kamal, Tarafdar et al. 2020). Hoewel eerdere studies dus hebben laten zien dat deze genera en families zijn geassocieerd bij OMV-afbraak, kwamen deze genera en families in onze studie niet naar voren als geassocieerd te zijn met OMV-verwijdering.

5 Discussie

5.1 OMV verwijdering

De verwijdering van de 10 gedoseerde OMV wordt in Tabel 13 gegeven, aan de hand van de verkregen resultaten in deze studie. In de discussie wordt verder ingegaan op indicaties dat sommige OMV fysisch/chemisch verwijderd worden, terwijl andere OMV biologisch verwijderd lijken te worden. Voor diclofenac en iopamidol is dit niet geheel duidelijk geworden en daarom weergegeven met een vraagteken.

Tabel 13: Verwijdering van de 10 gedoseerde OMV tijdens snelle zandfiltratie in deze studie. . +: goede verwijdering (99%); +/-: middelmatige verwijdering (30-50%); -: slechte verwijdering (<20%), ?: niet duidelijk welk type verwijdering.

Stof	Fys-chem verwijdering	Biol verwijdering	Beide
PFOA	-		
Propranolol	+/-		
Amidotrizoïne zuur	-		
Carbamazepine	-		
Acesulfaam		+	
Gabapentine		+	
Metoprolol			+
Diclofenac			+/-?
Iopamidol		-?	
Benzotriazol	-		

PFOA, propranolol, amidotrizoïne zuur, carbamazepine

PFOA en propranolol vertoonden de meeste adsorptie en zijn in hoge concentraties toegenomen in het zandfiltermateriaal aan het einde van het experiment. Er trad ook direct verwijdering op bij de start van het experiment en dit nam gedurende het experiment af in alle kolommen, ongeacht toevoeging van nutriënten, vitamines en sporenelementen of ent met WRK-materiaal. Dit maakt het voor propranolol en PFOA aannemelijk dat verwijdering niet door biologische processen, maar door adsorptieprocessen leek te zijn veroorzaakt. Daarnaast zijn beide stoffen zeer hydrofoob (>log Kow), wat sorptie bevordert (Tabel 11). Voor propranolol toonden de kolommen sterke adsorptie, waarbij er uiteindelijk verzadiging optrad en de verwijdering daardoor afnam, waardoor de effluentconcentraties weer toenamen. De geobserveerde adsorptie van propranolol is ook bevestigd in het literatuuronderzoek (paragraaf 2.2.4). Opvallend is dat de verwijdering van propranolol slechter was wanneer de kolom niet geënt was met 10% WRK-materiaal. Dit werd bevestigd door het feit dat het zandfiltermateriaal van kolom 4 minder propranolol bevatte aan het eind van het experiment dan de geënte zandfilters. Mogelijk heeft het

WRK-materiaal een betere adsorptiecapaciteit, waarvan de reden in toekomstig onderzoek achterhaald kan worden.

Het is opvallend dat PFOA zeer slechte verwijdering liet zien t.o.v. propranolol, terwijl het filtermateriaal veel hogere adsorptiecapaciteit had voor PFOA (i.e. veel hogere concentraties aan het einde van het experiment). Het zandfiltermateriaal bevatte gemiddeld namelijk 47.4 µg/kg (=0.11 µmol/kg) PFOA en 12.3 µg/kg (=0.05 µmol/kg) propranolol in de geënte kolommen. Omdat PFOA een hoger molecuulgewicht heeft, bevatte het influent gemiddeld met 10 µg/L ook nog minder moleculen PFOA dan propranolol (gemiddeld 0.024 µmol/L PFOA en 0.039 µmol/L propranolol). Een verklaring kan zijn dat er biologische verwijdering heeft plaatsgevonden van propranolol, waardoor de geadsorbeerde concentraties verlaagd zijn, en biologische verwijdering is eerder gerapporteerd in de literatuur (Bertelkamp et al., 2014). Een andere optie is dat het wekelijks terugspoelen wel een effect had op desorptie van propranolol, en dus de adsorptiecapaciteit van het zand wekelijks deels regeneert, maar geen effect had op PFOA. In een vervolg wordt geadviseerd om daarom ook concentraties van OMV in het spoelwater te meten, zodat de balans van gebonden en doorgespoeld OMV opgemaakt kan worden. Ook zal dit indicaties geven welke OMV desorptie vertonen bij terugspoelen.

Amidotrizoïnezuur en **carbamazepine** vertoonden ook adsorptie, maar in veel mindere mate. Deze stoffen vertoonden ook lage verwijdering (<20%). De verwijdering die plaatsvond leek ook voor amidotrizoïnezuur en carbamazepine volledig te komen door adsorptieprocessen. Er leek namelijk ook geen verschil te zijn in de mate van verwijdering tussen de verschillende kolommen. Het zandfiltermateriaal van alle kolommen bevatte ook aan het einde van het experiment ongeveer evenveel amidotrizoïnezuur en carbamazepine.

De literatuur over verwijdering van carbamazepine geeft aan dat biologische verwijderingen in zandfilters alleen optrad na lange contacttijd van 4 uur (paragraaf 2.2.4) (Zhou, Wang et al. 2022). Ook onze resultaten toonden aan dat een langere contacttijd de verwijdering kan bevorderen. Daarnaast kwam uit de literatuurstudie naar voren dat carbamazepine zeer persistent is, ook omdat metaboliëten opnieuw kunnen transformeren naar de moederverbinding. Dat laatste maakt het lastig om adsorptieve en biologische verwijdering van elkaar te onderscheiden. Over amidotrizoïnezuur kwam naar voren dat deze stof alleen anaeroob biologisch verwijderd kan worden, wat verklaart dat deze stof persistent is in oxische zandfilters.

Voorspelling van sorptie

Om een idee te krijgen over de mate van adsorptie door bepaalde eigenschappen van de onderzochte stoffen, kan de verwijdering van OMV aan actief kool gemodelleerd worden met de door KWR ontwikkelde [AquaPrioritool \(AquaPriori \(kwrwater.nl\)\)](#). Uiteraard is adsorptie aan actief kool niet representatief voor adsorptie aan snelle-zandfiltermateriaal, maar het kan indicaties geven voor de adsorptie-eigenschappen (isothermen) van de stoffen. PFOA, amidotrizoïnezuur en acesulfaam worden zeer slecht (<20%) verwijderd door actief kool, wat aangeeft dat ze slecht adsorberen aan actief kool. Dit komt overeen met de slechte verwijdering die te zien is in de snelle zandfilters. Propranolol en metoprolol worden voorspeld om voor 99% verwijderd te worden met actief kool, wat overeenkomt met de sterke adsorptie van propranolol en metoprolol aan het zandfiltermateriaal. Ook carbamazepine zou zeer goede adsorptie moeten vertonen aan actief kool. Ander onderzoek heeft aangetoond dat carbamazepineverwijdering in snelle-zandfiltratie laag was (Zearley and Summers 2012), terwijl dit inderdaad hoog was in actieve-koolfiltratie (Nugroho, Reungoat et al. 2010). Dit geeft weer aan dat actief kool en snelfiltraat andere adsorptiecapaciteiten hebben. Wel is er een duidelijk verband tussen adsorptie aan zandfiltermateriaal (Tabel 10) en de hydrofobe eigenschappen van de OMV (>log Kow, Tabel 11). Dit toont aan dat hydrophobiciteit al een goede parameter is om het gedrag van OMV aan zandfiltermateriaal te voorspellen. Alleen diclofenac was niet geadsorbeerd aan zandmateriaal aan het eind van het experiment, ondanks het hydrofobe karakter. Dit kan te maken hebben met biologische verwijdering (zie paragraaf 5.4.2) of het terugspoelen van de kolommen, waarbij desorptie kan optreden. Daarnaast kan de pH schommeling een rol spelen, omdat dit invloed heeft op desorptie van bepaalde stoffen.

Acesulfaam, gabapentine

De resultaten van de verwijdering van **acesulfaam, gabapentine** impliceren dat de 99% verwijdering biologisch van aard is, waarbij metabolische verwijdering het meest aannemelijk is. Dit komt door meerdere aspecten:

- 1 Verwijdering van deze stoffen is laag aan het begin en neemt toe tijdens het kolomexperiment. Voor adsorptieprocessen wordt het tegenovergestelde verwacht, omdat in het begin de adsorptieplekken nog niet verzadigd zijn. Deze toename van verwijdering in de tijd duidt daarom op groei van micro-organismen die deze stoffen metabolisch verwijderen.
- 2 Biostimulatie met nutriënten katalyseert de verwijdering. We zien bij alle twee de OMV dat de verwijdering langzaam op gang komt in de kolom zonder toegevoegde stikstof en fofoor (kolom 2). Dit geeft aan dat deze nutriënten de OMV-verwijdering stimuleren en omdat micro-organismen deze nutriënten gebruiken voor groei, duidt dit dus op biologische verwijdering. De verwijdering van deze twee OMV was niet gerelateerd aan de nitrificatieactiviteit; nitrificatie in de kolommen neemt namelijk af gedurende het experiment terwijl OMV-verwijdering juist toeneemt. Dit maakt metabole OMV-verwijdering aannemelijker, waarbij de micro-organismen het gedoseerde stikstof en fosfor gebruiken voor het maken van celmateriaal. Omdat de celgroei langzamer is in de kolom waar geen nutriënten zoals ammonium, nitraat en fosfaat gedoseerd zijn, lijken (in ieder geval 1 van) deze nutriënten limiterend voor de groei geweest te zijn.
- 3 Bioagumentatie (het enten met 10% WRK-materiaal) katalyseert de verwijdering. We zien bij alle twee de OMV dat de verwijdering in de kolom zonder toegevoegde 10% WRK-ent (kolom 4) langzamer op gang kwam. Dit geeft aan dat enten met materiaal van een filter waar verwijdering van deze OMV is waargenomen, de OMV-verwijdering stimuleert. Het is misschien ook mogelijk dat het entmateriaal beter bepaalde OMV adsorbeert, zoals het geval lijkt te zijn voor propranolol. Bij adsorptieprocessen wordt echter alleen een OMV-afname in de tijd verwacht, en geen toename.

De bevindingen over acesulfaam uit de literatuur (paragraaf 2.2.4) komen overeen met onze observaties, waarbij acesulfaam biologisch en metabolisch verwijderd lijkt te worden in aanwezigheid van zuurstof of nitraat. Het zou in eventueel vervolgonderzoek interessant zijn om ook het afbraakproduct sulfaminezuur te meten, en of dit afbraakproduct accumuleert of ook verwijderd wordt.

Voor gabapentine komen onze observaties deels overeen met de literatuur beschreven in paragraaf 2.2.4. Gabapentine werd in onze experimenten aeroob goed verwijderd, wat in tegenspraak is met ander onderzoek dat aantoonde dat gabapentine zeer slecht werd verwijderd met snelfiltratie (Nugroho, Reungoat et al. 2010). Daarentegen lieten deze auteurs wel zien dat actief kool gabapentine goed verwijderde. Modelleren van verwijdering met actief kool (Aquapriori) door adsorptieprocessen toonde aan dat gabapentine inderdaad goede verwijdering (70%) laat zien. In andere kolomstudies, met zand en afvalwatereffluent als inoculum, werd maar 10% gabapentine-verwijdering gevonden (Onesios and Bouwer 2012). Onze resultaten vertonen ook grote verschillen in verwijdering tussen geënte en niet-geënte zandfilters, met hoge verwijdering enkel in de geënte zandkolommen. Dit impliceert dat de waargenomen variatie in onze studie en in eerdere studies ten aanzien van gabapentine, waarschijnlijk te verklaren is door de mate van aanwezigheid van micro-organismen die gabapentine kunnen omzetten, en dat deze aanwezigheid sterk kan variëren tussen zandfilters. Hier wordt verder op ingegaan in paragraaf 5.4.

Metoprolol

De verwijdering van metoprolol was in alle kolommen in de eerste 24 dagen gelijk, ongeacht behandeling. In de niet-geënte kolom nam de verwijdering na 24 dagen af, wat impliceert dat de eerste periode in alle kolommen gedomineerd werd door sorptieprocessen en dat na verzadiging de verwijdering door sorptie afnam. Het hydrofobe karakter van metoprolol (log Kow = 1.88, Tabel 11) geeft ook de neiging van sorptie aan. Na 24 dagen nam de

verwijdering juist toe in de geënte kolommen, wat impliceert dat er biologische verwijdering plaatsvond. Na 38 dagen was er een lichte toename van verwijdering in de niet-geënte kolom 4, wat mogelijk veroorzaakt werd door het langzaam op gang komen van biologische verwijdering. Het zandfiltermateriaal van de kolommen vertoonde vrijwel geen aanwezigheid van metoprolol aan het einde van het experiment, alleen in kolom 3 was aan het eind van het experiment te zien dat er nog (zeer weinig) metoprolol aan het zandfiltermateriaal was gebonden. Dit is de verwachting wanneer metoprolol uiteindelijk voor 99% biologisch verwijderd wordt, en kan te maken hebben met het wekelijks terugspoelen. Dat betekent dat ook in kolom 4 biologische verwijdering is opgetreden en dat eventuele sorptie van metoprolol gedurende de eerste 24 dagen door biologische verwijdering is omgezet in de resterende periode. Voor metoprolol is eerder aangetoond dat het biologische en aeroob verwijderd wordt, mogelijk door heterotrofe micro-organismen (paragraaf 2.2.4).

Verdere indicaties dat verwijdering van metoprolol voornamelijk biologisch van aard was zijn genoemd in de 3 punten in paragraaf 5.3, namelijk: 1) verwijdering van deze stoffen is laag aan het begin en neemt toe tijdens het kolomexperiment; 2) biostimulatie met nutriënten katalyseert verwijdering, en 3) bioagumentatie (het enten met 10% WRK-materiaal) katalyseert verwijdering.

Diclofenac

Voor diclofenac zagen we 40-50% verwijdering vanaf het begin van het experiment, wat voor de geënte kolommen met nutriënten en sporenelementen (kolom 1) en voor de geënte kolommen met alleen sporenelementen (kolom 2) aanbleef tot het eind van het experiment (Figuur 14). Voor de geënte kolom met alleen nutriënten (kolom 3) nam de verwijdering na 66 dagen af. Voor de niet-geënte kolom (kolom 4) nam de verwijdering al na 24 dagen af.

De resultaten van de verwijdering van **diclofenac** geven aan dat de verwijdering biologisch van aard was (waarbij co-metabolische verwijdering het meest aannemelijk is) en/of dat verwijdering via adsorptieprocessen verloopt. Het is met deze resultaten niet mogelijk om een eenduidige conclusie te trekken. Dit komt door meerdere aspecten:

- 1 Verwijdering trad vanaf het begin van het experiment op. Dit kan duiden op adsorptieprocessen. Ook het hydrofobe karakter van diclofenac ($\log K_{ow} = 4,51$) duidt op adsorptie. Er heeft geen adsorptie van diclofenac opgetreden aan het snelle zandfiltermateriaal, wat impliceert dat verwijdering juist biologisch van aard was, maar ook kan komen door desorptie tijdens het terugspoelen.
- 2 Het verschil tussen de geënte kolommen met en zonder sporenelementen kan wijzen op een biologische factor, maar ook op een fysisch/chemische factor, omdat de aanwezige metalen in de sporenelementen verantwoordelijk kunnen zijn voor adsorptie aan diclofenac. Het niet toevoegen van deze metalen kan dan leiden tot afname van adsorptiecapaciteit wanneer de van nature aanwezige sporenelementen verzadigd zijn. In het geval dat micro-organismen diclofenac verwijderen en wanneer de sporenelementen limiterend worden, neemt verwijdering van diclofenac af.
- 3 Wanneer de verwijdering biologisch van aard is, is co-metabolische verwijdering het meest voor de hand liggend. Dit omdat directe verwijdering van diclofenac zichtbaar is vanaf het begin van het experiment en deze verwijdering niet toeneemt tijdens het experiment. Bij co-metabole afbraak zullen de van nature aanwezige micro-organismen (bv nitrificeerders) bij start van het experiment al actief zijn (en dus diclofenac verwijderen), terwijl bij metabole afbraak verwacht wordt dat de micro-organismen die diclofenac verwijderen eerst dienen te gaan groeien en dat de afbraak dus toeneemt gedurende het experiment (zoals het geval was voor acesulfaam, gabapentine en metoprolol). Daarnaast is diclofenac in eerder onderzoek wel gemeten maar niet aangetroffen in de full-scale zandfilters van WRK en Loenderveen (van Bel, Bertelkamp et al. 2020), waardoor de verwachting is dat in het geval van metabolische afbraak, de microorganismen eerst zouden moeten groeien en dus niet direct in staat zijn om diclofenac te verwijderen. Tijdens co-metabole processen is directe verwijdering wel verwacht.

- 4 De niet-geënte kolom vertoonde meer diclofenac verwijdering in het begin, maar gedurende het experiment nam deze verwijdering sneller af dan de geënte kolommen, wat duidt op adsorptieprocessen. De kolommen waar sporenelementen aan werden gedoseerd, vertoonde soortgelijk gedrag en bij de kolom zonder sporenelementen nam de verwijdering in de tijd sneller af. Dit correspondeert met de eerder beschreven hypothese dat adsorptie van diclofenac optreedt aan de sporenelementen. Het lijkt daarom aannemelijk dat de verwijdering gecombineerd fysisch-chemische en biologisch was. De verantwoordelijke micro-organismen leken niet aanwezig in de niet-geënte kolom en waren mogelijk gelimiteerd in de kolom zonder toegevoegde sporenelementen.

Onze bevindingen dat diclofenac door adsorptie en/of co-metabolische processen wordt verwijderd corresponderen met bevindingen uit de literatuurstudie (paragraaf 2.2.4). Co-metabole verwijdering van diclofenac van nitrificeerders tijdens activiteit van het enzym ammoniamonooxygenase kan verklaren waarom de kolom zonder sporenelementen limitatie in verwijdering vertoonde. Ammoniamonooxygenase bevat namelijk koper en ijzer. Wanneer deze twee metaalionen limiterend worden, neemt de activiteit van het enzym, en daarmee het cometabolisme, af. Aan de andere kant zien we echter geen verschil in nitrificatieactiviteit tussen de kolommen met en zonder sporenelementen, dus lijkt deze hypothese niet van toepassing in de bestudeerde kolommen.

5.2 Microbiële populatieanalyse

De microbiële genera die toenamen in de tijd en gecorreleerd waren met verwijdering van acesulfaam, gabapentine en/of metoprolol, hadden voornamelijk een aeroob en heterotroof metabolisme. Daarnaast kunnen enkele van deze micro-organismen naast zuurstof, ook nitraat reduceren tijdens denitrificatie. Autotrofe ammoniumoxiderende micro-organismen vertoonden een negatieve relatie met OMV-verwijdering. Zoals eerder genoemd is de toename van microbiële genera in NGS data relatief, en is het dus niet te relateren aan absolute toename door microbiële groei. Relatieve toename kan namelijk ook komen door afname (bijvoorbeeld door sterfte) van andere genera. Additionele qPCR analyses op deze toenemende genera kan uitsluitsel geven. Desalniettemin komt een heterotroof metabolisme overeen met de verwijderingscurves, die duiden op metabole groei. Daarnaast is dit in overeenstemming met de literatuur, waarbij acesulfaam, gabapentine en metoprolol voornamelijk via een aeroob metabolisme of tijdens denitrificatie afgebroken worden, maar afbraak is niet gerelateerd of wordt zelfs geremd door nitrificatie (zie paragraaf 2.2.4). In onze studie ging de relatieve afname van nitrificerende micro-organismen gepaard met een afname van ammoniumoxidatie en een verlaging van het zuurstofverbruik en de temperatuur. Dit kan ervoor gezorgd hebben dat de concurrentie om zuurstof met OMV verwijderende micro-organismen verminderd was, maar kan ook betekenen dat de algemene microbiële activiteit lager was door de lagere temperatuur. De concurrentie om zuurstof kan wel een verklaring zijn voor de gerapporteerde remming van OMV verwijdering door nitrificatie. Onze resultaten maken het dus onwaarschijnlijk dat OMV-afbraak in onze experimenten gebeurt door co-metabolisme van nitrificeerders. Uiteraard is het nog steeds mogelijk dat de micro-organismen groei vertoonden op andere, in het innamewater aanwezige koolstofbronnen dan de gedoseerde OMV, zoals bijvoorbeeld methanol. Het is dus niet uit te sluiten dat de OMV-verwijdering via een heterotroof co-metabolisme gebeurt. Desalniettemin geven deze resultaten genoeg indicaties dat ophopingsculturen met OMV als koolstofbron, met en zonder extra koolstofbron, waarschijnlijk succesvol zullen zijn voor het verrijken van OMV-verwijderende micro-organismen (zie paragraaf 5.3.3).

5.3 Bioremediatie

5.3.1 Bioaugmentatie met zandfiltermateriaal

Het is opvallend dat acesulfaam na verloop van tijd wel voor 99% verwijderd werd door de niet-geënte kolom, terwijl gabapentine vrijwel niet verwijderd werd in de niet-geënte kolom en metoprololverwijdering in deze kolom afnam. Voor beide stoffen nam verwijdering pas weer toe na 66 dagen in de niet-geënte kolom. Zoals in paragraaf 5.1 beschreven, lijkt de verwijdering van deze drie stoffen te komen door metabolische heterotrofe processen. Dit betekent dat bepaalde micro-organismen in de kolommen energie halen uit de omzetting van deze stoffen en

daardoor kunnen groeien. Aanwezigheid van deze OMV stimuleert de groei van deze specifieke microorganismen en de daardoor toegenomen biomassa zorgt voor een toenamen van de verwijdering in de tijd. Dit wordt ook bevestigd door de microbiële populatie analyse; de meeste genera die toenamen in de tijd en een positieve correlatie vertoonden met verwijdering van acefulfaam, gabapentine en/of metoprolol hadden een aeroob en heterotroof metabolisme. Daarnaast heeft microbiële populatie analyse bevestigd dat er geen relatie was tussen nitrificatie en OMV verwijdering.

De redelijk goede verwijdering van acesulfaam door de niet-geënte kolom zou dus moeten betekenen dat de micro-organismen die acesulfaam kunnen omzetten al aanwezig waren in het filtermateriaal. De slechte biologische verwijdering van gabapentine en metoprolol in de niet-geënte kolom geeft juist aan dat micro-organismen die deze twee stoffen omzetten vrijwel niet aanwezig waren in de niet-geënte kolommen. Doordat in de 10% WRK-materiaal geënte kolommen deze stoffen wel biologisch werden omgezet, zijn deze micro-organismen dus waarschijnlijk wel aanwezig in de WRK-filters. Omdat de hypothese is dat deze micro-organismen metabool groeien op deze stoffen, is de verwachting dat deze stoffen dus niet in het influent voor de Loenderveen-filters, maar wel in het influent van de WRK-filters aanwezig waren.

Het influent en effluent van de snelfilters van de full-scale WRK- en Loenderveen-zandfilters zijn eerder geanalyseerd op de aanwezigheid van een scala aan OMV (van Bel, Bertelkamp et al. 2020) (Tabel 2). Acesulfaam was tijdens deze analyse aangetroffen in het influent van de WRK- en Loenderveen-filters, waardoor het ook de verwachting is dat deze stof door beide zandfilters verwijderd kan worden. De verlaatte verwijdering van acesulfaam in de niet-geënte kolom impliceert dat Loenderveen-materiaal mogelijk minder acesulfaamverwijderende micro-organismen bevatte, die meer tijd nodig hadden om te groeien. Gabapentine werd in hoge concentraties aangetroffen in het influent en effluent van WRK filter, en nauwelijks in het Loenderveen-filter. Metoprolol werd ook aangetroffen in het influent en effluent van WRK filter, maar niet in het Loenderveen filter (Tabel 2). Dit maakt aannemelijk dat de micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de verwijdering van gabapentine en metoprolol niet of minder in Loenderveen-zandfiltermateriaal aanwezig waren dan in WRK-filtermateriaal. Dit kan verklaren waarom het ook lang duurde in de niet-geënte kolom (66 dagen) voordat deze micro-organismen genoeg groei vertoonden voor significante verwijdering van deze stoffen, ongeacht of OMV, nutriënten en sporenelementen worden toegevoegd. Het enten van WRK-filtermateriaal waarin deze micro-organismen waarschijnlijk wel aanwezig zijn, had daarom een effect op de verwijdering van deze stoffen. De microbiële populatie analyse liet inderdaad zien dat de meeste genera die toenamen in de tijd en een positieve correlatie vertoonden met verwijdering van acefulfaam, gabapentine en/of metoprolol vaak minder voorkwamen in de niet-geënte kolom. Daarnaast leken kolom 1 en 4 (die beide nutriënten en vitamines-sporenelementen ontvangen) op het begin nog veel op elkaar qua microbiële compositie, maar na 38 dagen was kolom 4 veel veranderd wat correspondeerde met de verwijdering van acesulfaam, gabapentine en metoprolol, die zeer verschillend waren tussen kolom 1 en 4 na 38 dagen.

Een zorg voor de toepassing van bioaugmentatie, is dat de geënte microorganismen die OMV verwijderen kunnen worden uitgespoeld, begraasd door ongewervelde dieren of de concurrentie verliezen met andere micro-organismen. De kolommen in de hier gerapporteerde experimenten werden wekelijks teruggespoeld. Resultaten laten zien dat dit terugspoelen geen negatief effect had op de biologische verwijdering van de OMV en de toename in relatieve abundantie van genera die een positieve correlatie vertoonde met OMV verwijdering. Dit toont dus aan dat uitspoeling van de geënte microorganismen niet of nauwelijks heeft opgetreden. Ook begrazing en concurrentie leken tijdens de duur van dit experiment geen probleem te vormen. Daarnaast bleek ook dat het nemen van 5 gram zandmonstes elke 2 weken voor analyse geen negatief effect had op OMV verwijdering. Deze aspecten moeten uiteraard verder onderzocht worden in experimenten van langere tijdsduur en realistische terugspoelcondities.

5.3.2 Verwijderingssnelheden en full scale filters

Voor elke OMV zijn ook de volumetrische en specifieke verwijderingssnelheden bepaald (zie materiaal en methoden). Aan de hand daarvan is de HRT (i.e. contacttijd) berekend die nodig is om 99% van de OMV te verwijderen (HRT_{99}). Deze gegevens staan in Tabel 11.

De full scale snelfilter 63 van de WRK in Nieuwegein heeft een bedhoogte van 1,25 m en de filtratiesnelheid bedraagt 2,9 m/h, wat een HRT geeft van 0.43 uur. De full scale filter 32 van Loenderveen heeft een bedhoogte van 1,20 m met een filtratiesnelheid van 2,5 m/h, wat een HRT geeft van 0.48 uur. De kolommen in dit onderzoek hadden een filtratiesnelheid van 3.2 m/h met een bedhoogte van 80 cm en een HRT van 0.25 uur. De HRT is dus langer in de full scale filters waarbij verwijdering van de OMV waarschijnlijk dus nog hoger zal zijn. Voor diclofenac en propranolol is bijvoorbeeld berekend dat voor 99% verwijdering, een HRT van 0.39 uur en 0.42 uur nodig is, respectievelijk (Tabel 11). Dit wordt bereikt wordt bij fullscale filters. Voor de andere verbindingen die slecht verwijderd worden zoals amidotrizoaat, 1-H benzotriazol, carbamazepine, iopamidol en PFOA is een HRT van 1,2 - 4,5 uur nodig waardoor wellicht langzame zandfiltratie een betere technologie is voor de verwijdering van deze stoffen. Uiteraard is het ook nog steeds mogelijk dat niet de juiste micro-organismen aanwezig waren om deze stoffen af te breken, en dat bioaugmentatie met andere zandfilters of bacteriestammen een betere verwijdering kan geven. Daarnaast waren de concentraties in dit project ongeveer 10x hoger dan normaal in oppervlaktewater. Verwijdering kan daarom anders zijn bij de lagere, natuurlijke concentraties.

5.3.3 Biostimulatie

Voor de biologische verwijdering van acesulfaam, gabapentine en metoprolol is duidelijk geworden dat kolommen die gevoed werden met nutriënten, een snellere volledige verwijdering lieten zien dan de kolom zonder toegevoegde nutriënten. Toevoeging van sporenelementen had daarentegen geen effect. Dat nutriënten de verwijdering versnellen, komt waarschijnlijk doordat microorganismen die **acesulfaam**, **gabapentine** en **metoprolol** verwijderen snellere groei vertonen doordat ze niet gelimiteerd worden in stikstof en fosfor. De verwijdering van gabapentine trad bijvoorbeeld al op binnen 38 dagen na enten met toevoeging van nutriënten, en bleef stabiel. De extra toevoeging van nutriënten was dus niet essentieel voor de groei van OMV-verwijderende bacterien, maar versnelde het wel. Wanneer OMV verwijdering co-metabool, tijdens bijvoorbeeld nitrificatie, zou plaatsvinden is de aanwezigheid van voldoende ammonium wel essentieel voor de verwijdering van de OMV, omdat het dan als energiebron gebruikt wordt. In dit experiment leek het achteraf juist gunstig dat ammoniumoxidatie na 24 dagen veel minder in de kolommen plaatsvond, zodat de concurrentie om zuurstof met OMV-verwijderende microorganismen mogelijk verminderd was.

Naast de factoren die in dit onderzoek getest zijn, is temperatuur een belangrijke factor voor biologische verwijdering, zoals ook beschreven in paragraaf 2.2.2. In dit experiment was de temperatuur redelijk constant gehouden, met variaties tussen 19,1 en 19,8°C. Tussen 24 en 38 dagen was de temperatuur 0,5-0,7°C lager dan de rest van het experiment, wat mogelijk een effect had op het zuurstofverbruik en de microbiële activiteit. Het leek alleen geen effect te hebben op de biologische verwijdering van OMV. Waarschijnlijk hebben grotere fluctuaties die gedurende het jaar voorkomen wel een groot effect op OMV-verwijdering. In vervolgonderzoek zou dit effect daarom onderzocht kunnen worden.

5.3.4 Bioaugmentatie met ophopingsculturen en reinculturen

Ophopingsculturen en reinculturen die specifieke OMV verwijderen kunnen verkregen worden door op laboratoriumschaal OMV te doseren aan zandfiltermateriaal en zo ophopingsculturen te kweken en 'serial dilution to extinction' en/of groeien op agarplaten toe te passen om reinculturen te verkrijgen. De microbiële populatie analyse impliceert dat ophopingsculturen met OMV als koolstofbron, met en zonder extra koolstofbron, succesvol kunnen zijn voor het verrijken van OMV verwijderende micro-organismen.

De voordelen van ophopingscultures en reïncultures is dat optimale omstandigheden voor groei en activiteit van deze bacteriën gemakkelijk bestudeerd kunnen worden. Daarnaast is het enten van ophopingscultures of reïncultures aan zandfiltermateriaal een veel beter alternatief dan het enten van ander zandfiltermateriaal. Een voordeel is namelijk dat men niet te maken heeft met grote hoeveelheden zand die geënt moeten worden, maar dan geconcentreerde celsuspensies geënt kunnen worden. Daarnaast is er veel meer controle of de juiste OMV verwijderende bacteriën toegevoegd worden en in welke hoeveelheid dan met zandfiltermateriaal.

Als laatste kunnen specifieke detectie methoden (zoals qPCR) ontwikkeld worden om de aanwezigheid en kwantiteit van de OMV verwijderende micro-organismen te monitoren tijdens het enten en de bedrijfsvoering. Wanneer OMV verwijdering vermindert, kan op deze manier een link gelegd worden of dit komt door de afwezigheid van de verantwoordelijke bacteriën, en of dat weer komt door suboptimale omstandigheden.

6 Conclusies en aanbevelingen

6.1 Conclusies

- Bioaugmentatie en/of biostimulatie zijn effectieve methoden om de verwijdering van **acesulfaam**, **gabapentine** en **metoprolol** door snelle-zandfiltratie te verhogen en/of te bespoedigen, waarbij in de loop van de tijd 99% van deze OMV worden verwijderd.
- Bioaugmentatie van Loenderveen-zandfilterkolommen met zandfiltermateriaal van WRK blijkt zeer effectief om de biologische verwijdering van deze drie OMV te verhogen.
- Het tegelijk toepassen van bioaugmentatie, door het enten van 10% WRK-materiaal, en biostimulatie, door het toevoegen van nutriënten voor microorganismen, aan Loenderveen-zandfilterkolommen blijkt te zorgen voor een snellere verwijdering van deze drie OMV die het Loenderveen-filter normaal niet of minder goed zou verwijderen.
- De waargenomen 99% verwijdering van gabapentine en metoprolol in Loenderveen-zandfilterkolommen geënt met WRK-filtermateriaal treedt al op binnen 38 dagen na toevoeging van nutriënten, en blijft stabiel in de tijd. Het enten van filtermateriaal met andere bacteriën (bioaugmentatie) is dus zeer effectief en robuust. Wanneer de micro-organismen genoeg gegroeid zijn, lijkt de extra toevoeging van nutriënten niet meer nodig en bleef metabole verwijdering stabiel optreden gedurende het experiment.
- De populatiestudies geven een aanwijzing dat biologische verwijdering van acesulfaam, gabapentine en metoprolol gecorreleerd is aan een relatieve toename van micro-organismen met een aeroob of denitrificerend en hetetroof metabolisme. NGS data geeft alleen relatieve abundanties en additionele qPCR analyse kan aantonen of deze genera daadwerkelijk toegenomen zijn door groei.
- Voor **propranolol** verloopt verwijdering in de zandfilterkolommen via adsorptie en neemt deze verwijdering in de tijd af van ~50% naar ~35%.
- **Diclofenac** werd in de kolommen tot 30 – 40% verwijderd door adsorptie en/of biologische verwijdering.
- **PFOA**, **carbamazepine**, **benzotriazol**, **amidotrizoïne zuur** en **iopamidol** werden slecht verwijderd (< 20%) in de Loenderveen-zandfilterkolommen met of zonder ent van WRK-filtermateriaal, nutriënten en/of sporenelementen.

Aan het begin van dit project werden een aantal onderzoeksvragen opgesteld die hieronder beantwoord worden:

- 1 Wat is het effect van bioaugmentatie op verwijdering van een andere selectie OMV dan metformine en pyrazool?

Zoals te zien in de resultaten is het effect van bioaugmentatie erg wisselend per OMV, wat geen verassing is; alleen sommige OMV worden biologisch verwijderd en dit kan verlopen via een scala aan metabolische of co-metabolische processen. Dit geeft weer aan dat onderzoek naar een breed scala aan relevante OMV belangrijk is. Het beste zou zijn als we OMV zouden kunnen clusteren (QSPR/QSAR) aan de hand van de biologische verwijderingseigenschappen zodat we per cluster een representatieve OMV zouden kunnen kiezen voor dit soort experimenten, zoals ook gedaan is voor de stofselectie voor andere zuiveringsprocessen (Roberta Hofman-Caris 2020). Een andere optie is om meer uitgebreid in kaart te brengen welke OMV in het influent van zandfilters voorkomen en verwijderd worden en onder welke omstandigheden.

- 2 Wat zijn de limiterende factoren voor OMV-verwijdering en bioaugmentatie?

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat sporenelementen en vitamines niet limiterend zijn in het influent water van Loenderveen voor de biologische verwijdering van OMV gedurende dit experiment. Toevoeging van nutriënten zoals ammonium, nitraat en fosfaat liet een duidelijk positief effect zien op de snelheid van OMV-verwijdering, wat aangeeft dat in ieder geval 1 van deze nutriënten limiterend was voor groei.

- 3 Wat zijn de nutriënten die verwijdering stimuleren? Kan worden achterhaald of verwijdering metabolisch of co-metabolisch gebeurd?

Toevoeging van nutriënten zoals ammonium, nitraat en fosfaat liet een duidelijk positief effect zien op de snelheid van OMV-verwijdering. OMV-verwijdering was niet gekoppeld aan nitrificatie. Nitrificatie vond namelijk na ongeveer 20 dagen vooral plaats in de voedingstank, waardoor het zuurstofverbruik in de kolommen naar beneden ging. Dit had geen negatief effect op de biologische verwijdering van OMV, maar hoogstens een positief effect door het wegvallen van concurrentie om zuurstof met nitrificeerders. De nutriënten leken dus limiterend en hielpen de groei van de OMV-verwijderende micro-organismen te stimuleren. Daarnaast werd een eerste aanwijzing verkregen dat de biologische verwijdering van OMV mogelijk via aerobe en heterotrofe metabolische processen plaatsvindt.

6.2 Aanbevelingen

Door de succesvolle en stabiele verwijdering van een aantal onderzochte OMV door bioaugmentatie en/of biostimulatie in kolomexperimenten met snelfiltermateriaal, wordt aanbevolen om dit verder te onderzoeken om tot geoptimaliseerde en succesvolle toepassing te komen van biologische verwijdering van OMV in de drinkwaterzuivering.

- In dit onderzoek is gebleken dat bioaugmentatie van snelle zandfilters in kolomexperimenten effectief is in het stimuleren van de afbraak van bepaalde OMV. Een logische vervolgstap is om te onderzoeken of bioaugmentatie ook werkt in pilotscale of full-scale gedreven snelfilters, waarbij een aantal punten van belang zijn. Zo is de bioaugmentatie in de kolomexperimenten gedaan onder gecontroleerde omstandigheden, waarbij 10% van WRK-materiaal volledig gemengd is met Loenderveen-materiaal voordat de kolommen met het materiaal gevuld werden. Dit is in de realiteit echter niet mogelijk. Het wordt daarom aangeraden om te onderzoeken of minder dan 10% enten van materiaal van zandfilters (mogelijk van een andere locatie) bovenop een pilotscale of full-scale zandfilter een vergelijkbaar effect heeft. Daarnaast kan onderzocht worden of het enten van terugspoelwater soortgelijke effecten heeft op OMV verwijdering.
- Biostimulatie (toevoegen van nutriënten) versnelt de biologische verwijdering van een aantal OMV in geënte zandfilterkolommen. Naast enten met ander filtermateriaal, is het daarom ook aan te raden om te onderzoeken of het doseren van nutriënten aan pilotscale of full-scale zandfilters dezelfde resultaten oplevert. Op deze manier kan men ervoor kiezen om snelle-zandfilters alleen te enten tijdens de seizoenen wanneer concentraties van nutriënten hoog zijn en tijdens de seizoenen wanneer de nutriëntconcentraties laag zijn, ook nutriënten te doseren. In dat geval zal ook het risico van dosering op verhoogde nagroei onderzocht moeten worden.
- De langetermijneffecten en robuustheid van biostimulatie en bioaugmentatie op OMV verwijdering onder full-scale condities is niet onderzocht, terwijl over de lange termijn schommelingen in concentraties van OMV, nutriënten en omgevingsfactoren optreden. De kolomexperimenten zijn namelijk uitgevoerd gedurende 80 dagen met zo min mogelijk variaties in deze parameters. In eerder BTO-onderzoek zijn geënte kolommen langer bestudeerd (160 dagen) en bleek de verwijdering van OMV na een doseerstop rond 90 dagen af te nemen. Het is niet duidelijk geworden of dit kwam door een limitatie van nutriënten (bv anorganische nutriënten, vitamines en sporenelementen) of door het afsterven/uitspoelen van de geënte microbiële populatie door temporele afwezigheid van de OMV.

- In dit onderzoek is de temperatuur gecontroleerd op ongeveer 20°C met schommelingen van max 0,5-0,7°C, die geen effect hadden op de biologische OMV verwijdering. Het is belangrijk om te onderzoeken wat het effect is van grotere, temporele temperatuurverschillen zoals die normaliter tussen de seizoenen optreden bij snelfilters die oppervlaktewater behandelen. Wanneer de invloed van temperatuur op de biologische verwijdering van bepaalde OMV bekend is, kan beter worden bepaald wanneer snelle-zandfilters het beste geënt kunnen worden met ander filtermateriaal en wanneer additionele biostimulatie middels dosering van nutriënten vereist is. Waternet past daarnaast dosering van fosfaat toe wanneer het water zeer koud is om nitrificatie te stimuleren. Dit effect zou ook bestudeerd kunnen worden.
- Het wordt ook aanbevolen te onderzoeken hoe groot het effect is van nutriënten en sporenelementen op de OMV-verwijdering in niet-geënte snelle-zandfilters. Het is in dit onderzoek namelijk niet duidelijk geworden of biostimulatie alleen (dus zonder enten van ander filtermateriaal) ook gezorgd heeft voor snellere afbraak van bijvoorbeeld acelsulfaam. Wanneer de invloed van biostimulatie op OMV verwijdering duidelijk is, kan dat helpen om de afweging te maken wanneer bioaugmentatie naast biostimulatie nodig is.
- In deze studie zijn de tien onderzochte OMV zorgvuldig geselecteerd. Deze OMV vallen in bepaalde clusters met soortgelijke moleculaire eigenschappen die gebruikt zijn voor het voorspellen van de verwijdering tijdens bepaalde zuiveringsstappen (Roberta Hofman-Caris 2020). Het beste zou zijn als we OMV zouden kunnen clusteren aan de hand van de biologische verwijderingseigenschappen zodat we per cluster een representatieve OMV zouden kunnen kiezen voor dit soort experiment. Het wordt namelijk aangeraden om de verwijdering van een groter scala aan OMV te onderzoeken, waarbij ook OMV worden onderzocht die co-metabool, bijvoorbeeld tijdens nitrificatie, verwijderd worden. Daarnaast zijn er nog andere OMV die voor specifieke drinkwaterbedrijven van belang zijn om te onderzoeken. Het is in dit onderzoek namelijk duidelijk geworden dat de eerder uitgevoerde full-scale screening van OMV (van Bel, Bertelkamp et al. 2020) niet de volledige potentie van snelle-zandfilters in kaart heeft gebracht, vooral niet wanneer OMV gedoseerd worden aan deze filters of extra nutriënten worden gedoseerd. Een optie is ook om meer uitgebreid in kaart te brengen welke OMV in het influent van zandfilters voorkomen en verwijderd worden en onder welke omstandigheden. Dit geeft informatie over welke OMV van belang zijn, over de potentie van zandfilters en over de verwijderingsmechanismen en hoe deze te optimaliseren.
- Tijdens de in dit rapport beschreven experimenten trad er nitrificatie op in de voedingstanks, waardoor de concentratie ammonium in de kolommen veel lager was dan verwacht. Dit had mogelijk een positief effect op de metabole OMV verwijdering door wegvallen van concurrentie om zuurstof. Wanneer co-metabole afbraak van OMV tijdens nitrificatie wordt onderzocht, wordt aangeraden om ammonium ook direct op de kolom te doseren, zodat nitrificatie alleen in de kolommen optreedt.
- De kolommen waren zo ingesteld dat de contacttijd van het water met het zandfiltermateriaal altijd 15 minuten was. Er zijn echter indicaties dat bepaalde OMV een langere contacttijd nodig hebben, zoals mogelijk voor iopamidol en carbamazepine. Wanneer het de wens is om deze OMV beter te verwijderen tijdens snelfiltratie, kan onderzocht worden bij welke contacttijd de verwijdering verbeterd en of dergelijke contacttijden ook kunnen worden toegepast in full-scale snelfilters of dat dit beter onderzocht kan worden in langzame zandfilters.
- Het wordt aangeraden om specifieke OMV-verwijderende micro-organismen op te hopen, te identificeren en te kwantificeren. Dit is wenselijk voor een aantal aspecten: 1) gericht bepaalde micro-organismen enten dan met ongedefinieerd zandfiltermateriaal waarvan je hoopt dat de bacteriën aanwezig zijn, 2) gemakkelijker de omstandigheden voor groei en activiteit van de micro-organismen bepalen die belangrijk zijn voor full-scale OMV verwijdering, 3) specifiek kunnen detecteren van de OMV-verwijderende micro-organismen met kwantitatieve methoden (bijv. qPCR) zodat het enten en de bedrijfsvoering (met veranderende omstandigheden gedurende het jaar) van de zandfilters beter te monitoren is en hoe dit de aanwezigheid van de micro-organismen beïnvloed. Zo kan veel gericht de bedrijfsvoering worden geoptimaliseerd om deze organismen in de filters te houden.

- Het onderzoek heeft ook laten zien dat bepaalde OMV niet of nauwelijks door biologische verwijdering en/of adsorptie in snelfilters wordt verwijderd. Voor die OMV is aanvullend onderzoek nodig of moet in kaart worden gebracht of andere processen (i.e. ozon, UV, UV/H₂O₂, membranen) deze stoffen kunnen verwijderen.
- Verder onderzoek of de hier geïdentificeerde aerobe/denitrificerende en heterotrofe micro-organismen die correleren met verwijdering van gabapentine, acesulfaam en/of metoprolol ook in absolute aantallen toenemen en of deze organismen daadwerkelijk betrokken zijn bij OMV-afbraak.

Veel aanbevelingen tot verder onderzoek zijn met pilot of full-scale filters en met ophopingsculturen in het laboratorium. Het wordt samen met de drinkwaterbedrijven besproken welke van de aanbevolen onderzoek stappen het beste als eerste kunnen worden uitgevoerd.

7 Referenties

Begmatov, S., A. S. Savvichev, V. V. Kadnikov, A. V. Beletsky, I. I. Rusanov, A. A. Klyuvitkin, E. A. Novichkova, A. V. Mardanov, N. V. Pimenov and N. V. Ravin (2021). "Microbial Communities Involved in Methane, Sulfur, and Nitrogen Cycling in the Sediments of the Barents Sea." *Microorganisms* 9(11): 2362.

Benner, J., D. E. Helbling, H.-P. E. Kohler, J. Wittebol, E. Kaiser, C. Prasse, T. A. Ternes, C. N. Albers, J. Aamand, B. Horemans, D. Springael, E. Walravens and N. Boon (2013). "Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes?" *Water Research* 47(16): 5955-5976.

Bertelkamp C., J. Reungoat, E.R. Cornelissen, N. Singhale, J. Reynissonf, A.J. Cabog, J.P. van der Hoek, A.R.D. Verliefe (2014). "Sorption and biodegradation of organic micropollutants during river bank filtration: A laboratory column study". *Water Research* 52: 231-214.

Bertelkamp, C., Hofman-Caris R., Siegers W (2017). "Biologische verwijdering van pyrazool, metformine, guanylureum, melamine en urotropine in snelle zandfilters". BTO 2017.060.

Castronovo, S., A. Wick, M. Scheurer, K. Nödler, M. Schulz and T. A. Ternes (2017). "Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters." *Water research* 110: 342-353.

Chen, R., Y. Miao, Y. Liu, L. Zhang, M. Zhong, J. M. Adams, Y. Dong and S. Mahendra (2021). "Identification of novel 1,4-dioxane degraders and related genes from activated sludge by taxonomic and functional gene sequence analysis." *Journal of Hazardous Materials* 412: 125157.

D'Alessio, M., B. Yoneyama, M. Kirs, V. Kisand and C. Ray (2015). "Pharmaceutically active compounds: Their removal during slow sand filtration and their impact on slow sand filtration bacterial removal." *Science of The Total Environment* 524-525: 124-135.

Dawas-Massalha, A., S. Gur-Reznik, S. Lerman, I. Sabbah and C. G. Dosoretz (2014). "Co-metabolic oxidation of pharmaceutical compounds by a nitrifying bacterial enrichment." *Bioresour Technol* 167: 336-342.

Di Marcantonio, C., C. Bertelkamp, N. van Bel, T. E. Pronk, P. H. A. Timmers, P. van der Wielen and A. M. Brunner (2020). "Organic micropollutant removal in full-scale rapid sand filters used for drinking water treatment in The Netherlands and Belgium." *Chemosphere* 260: 127630.

Falagán, C. and D. B. Johnson (2014). "Acidibacter ferrireducens gen. nov., sp. nov.: an acidophilic ferric iron-reducing gammaproteobacterium." *Extremophiles* 18(6): 1067-1073.

Falås, P., A. Wick, S. Castronovo, J. Habermacher, T. A. Ternes and A. Joss (2016). "Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment." *Water Res* 95: 240-249.

Fernandez-Fontaina, E., I. B. Gomes, D. S. Aga, F. Omil, J. M. Lema and M. Carballa (2016). "Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitratation and heterotrophic conditions." *Science of The Total Environment* 541: 1439-1447.

Fuerst, J. A. (2017). Chapter 1 - Planctomycetes—New Models for Microbial Cells and Activities. *Microbial Resources*. I. Kurtböke, Academic Press: 1-27.

González, S., J. Müller, M. Petrovic, D. Barceló and T. P. Knepper (2006). "Biodegradation studies of selected priority acidic pesticides and diclofenac in different bioreactors." *Environmental Pollution* 144(3): 926-932.

Hedegaard, M. J. and H.-J. Albrechtsen (2014). "Microbial pesticide removal in rapid sand filters for drinking water treatment – Potential and kinetics." *Water Research* 48: 71-81.

Henning, N., U. Kunkel, A. Wick and T. A. Ternes (2018). "Biotransformation of gabapentin in surface water matrices under different redox conditions and the occurrence of one major TP in the aquatic environment." *Water Research* 137: 290-300.

Hijnen, W., Hofman-Caris, R., Bertelkamp, C. (2016). "BTO 2016.203(s) Pyrazool - inventarisatie full-scale data en verkennend experimenteel onderzoek." KWR. Nieuwegein.

Hofman-Caris C.H.M., , D. J. H. H., W.G Siegers (2018). "Verkenning selectieve technieken voor de verwijdering van microverontreinigingen uit drinkwater." BTO 2018.026

Hofman-Caris R., Bas Wols, Dirk Vries, Martin Korevaar, Wolter Siegers (2020). "Voorspelling en validatie van de verwijdering van organische microverontreinigingen uit water; deel 1: stofselectie". BTO 2020.056.

Hollender, J., J. Rothardt, D. Radny, M. Loos, J. Epting, P. Huggenberger, P. Borer and H. Singer (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.

Huang, Y., Y. Deng, J. C.-F. Law, Y. Yang, J. Ding, K. S.-Y. Leung and T. Zhang (2021). "Acesulfame aerobic biodegradation by enriched consortia and *Chelatococcus* spp.: Kinetics, transformation products, and genomic characterization." *Water Research* 202: 117454.

Huber, K. J., A. M. Geppert, U. Groß, M. Luckner, G. Wanner, P. Cooper, J. Abakah, I. Janssen and J. Overmann (2017). "*Aridibacter nitratireducens* sp. nov., a member of the family Blastocatellaceae, class Blastocatellia, isolated from an African soil." *Int J Syst Evol Microbiol* 67(11): 4487-4493.

Jiang, F., W. Li, M. Xiao, J. Dai, W. Kan, L. Chen, W. Li, C. Fang and F. Peng (2012). "*Luteolibacter luojiensis* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(Pt_9): 2259-2263.

Jin, D., P. Wang, Z. Bai, B. Jin, Z. Yu, X. Wang, G. Zhuang and H. Zhang (2013). "*Terrimonas pekingensis* sp. nov., isolated from bulking sludge, and emended descriptions of the genus *Terrimonas*, *Terrimonas ferruginea*, *Terrimonas lutea* and *Terrimonas aquatica*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(Pt_5): 1658-1664.

Joss A, Zabczynski S, Göbel A, Hoffmann B, Löffler D, Mc Ardell CS, Ternes TA, Thomsen A, Siegrist H (2006). "Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme". *Water Res.* 2006 40(8):1686-96. doi: 10.1016/j.watres.2006.02.014.

Kahl, S., S. Kleinsteußer, J. Nivala, M. van Afferden and T. Reemtsma (2018). "Emerging Biodegradation of the Previously Persistent Artificial Sweetener Acesulfame in Biological Wastewater Treatment." *Environmental Science & Technology* 52(5): 2717-2725.

Kamal, N., A. Tarafdar, A. Sinha and V. Kumar (2020). "Effect of Glucose Cometabolism on Biodegradation of Gabapentin (an Anticonvulsant Drug) by Gram-Positive Bacteria *Micrococcus luteus* N.ISM.1." *Applied Biochemistry and Microbiology* 56(4): 433-440.

Kim, S., K. Rossmassler, C. D. Broeckling, S. Galloway, J. Prenni and S. K. De Long (2017). "Impact of inoculum sources on biotransformation of pharmaceuticals and personal care products." *Water Res* 125: 227-236.

Kulichevskaya, I. S., A. A. Ivanova, E. N. Detkova, W. I. C. Rijpstra, J. S. Sinninghe Damsté and S. N. Dedysh (2015). "*Planctomicrobium piriforme* gen. nov., sp. nov., a stalked planctomycete from a littoral wetland of a boreal lake." *Int J Syst Evol Microbiol* 65(Pt 5): 1659-1665.

Kulichevskaya, I. S., A. A. Ivanova, O. I. Baulina, W. I. C. Rijpstra, J. S. Sinninghe Damsté and S. N. Dedysh (2017). "*Fimbrioglobus ruber* gen. nov., sp. nov., a Gemmata-like planctomycete from Sphagnum peat bog and the proposal of Gemmataceae fam. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(2): 218-224.

Lehtovirta-Morley, L. E., J. Ross, L. Hink, E. B. Weber, C. Gubry-Rangin, C. Thion, J. I. Prosser and G. W. Nicol (2016). "Isolation of 'Candidatus Nitrosocosmicus franklandus', a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration." *FEMS microbiology ecology* 92(5): fiw057-fiw057.

Margot, J., S. Lochmatter, D. A. Barry and C. Holliger (2016). "Role of ammonia-oxidizing bacteria in micropollutant removal from wastewater with aerobic granular sludge." *Water Sci Technol* 73(3): 564-575.

Nowak, A., G. Pacek and A. Mroziak (2020). "Transformation and ecotoxicological effects of iodinated X-ray contrast media." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 19(2): 337-354.

Nugroho, W. A., J. Reungoat and J. Keller (2010). THE PERFORMANCE OF BIOLOGICAL ACTIVATED CARBON IN REMOVING PHARMACEUTICALS IN DRINKING WATER TREATMENT.

Onesios, K. M. and E. J. Bouwer (2012). "Biological removal of pharmaceuticals and personal care products during laboratory soil aquifer treatment simulation with different primary substrate concentrations." *Water Research* 46(7): 2365-2375.

Park, J., N. Yamashita, G. Wu and H. Tanaka (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.

Pascual, J., M. García-López, I. González and O. Genilloud (2017). "Luteolibacter gellanilyticus sp. nov., a gellan-gum-degrading bacterium of the phylum Verrucomicrobia isolated from miniaturized diffusion chambers." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(10): 3951-3959.

Petrovic, M., M. J. L. de Alda, S. Diaz-Cruz, C. Postigo, J. Radjenovic, M. Gros and D. Barcelo (2009). "Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 367(1904): 3979-4003.

Plósz, B. G., K. H. Langford and K. V. Thomas (2012). "An activated sludge modeling framework for xenobiotic trace chemicals (ASM-X): Assessment of diclofenac and carbamazepine." *Biotechnology and Bioengineering* 109(11): 2757-2769.

Prosser, J. I., I. M. Head and L. Y. Stein (2014). The Family Nitrosomonadaceae. The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 901-918.

Piai L., Marco Blokland, Albert van der Wal, Alette Langenhoff (2020). "Biodegradation and adsorption of micropollutants by biological activated carbon from a drinking water production plant". *Journal of Hazardous Materials*, 388, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122028>.

Quintana, J. B., S. Weiss and T. Reemtsma (2005). "Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor." *Water Research* 39(12): 2654-2664.

Ramette, A. (2007). "Multivariate analyses in microbial ecology." *FEMS Microbiol Ecol* 62(2): 142-160.

Rattier, M., J. Reungoat, W. Gernjak, A. Joss and J. Keller (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(3): 127-139.

Roberta Hofman-Caris, B. W., Dirk Vries, Martin Korevaar, Wolter Siegers (2020). "Voorspelling en validatie van de verwijdering van organische microverontreinigingen uit water; deel 1: stofselectie." BTO 2020.056.

Rubirola, A., M. Llorca, S. Rodriguez-Mozaz, N. Casas, I. Rodriguez-Roda, D. Barceló and G. Buttiglieri (2014). "Characterization of metoprolol biodegradation and its transformation products generated in activated sludge batch experiments and in full scale WWTPs." *Water Research* 63: 21-32.

Rutere, C., M. Posselt, A. Ho and M. A. Horn (2021). "Biodegradation of metoprolol in oxic and anoxic hyporheic zone sediments: unexpected effects on microbial communities." *Applied Microbiology and Biotechnology* 105(14): 6103-6115.

Sathyamoorthy, S., K. Chandran and C. A. Ramsburg (2013). "Biodegradation and Cometabolic Modeling of Selected Beta Blockers during Ammonia Oxidation." *Environmental Science & Technology* 47(22): 12835-12843.

Shimabuku, K. K., T. L. Zearley, K. S. Dowdell and R. S. Summers (2019). "Biodegradation and attenuation of MIB and 2,4-D in drinking water biologically active sand and activated carbon filters." *Environmental Science: Water Research & Technology* 5(5): 849-860.

Su, Q., A. R. Schittich, M. M. Jensen, H. Ng and B. F. Smets (2021). "Role of Ammonia Oxidation in Organic Micropollutant Transformation during Wastewater Treatment: Insights from Molecular, Cellular, and Community Level Observations." *Environ Sci Technol* 55(4): 2173-2188.

Timmers, P. H. A., T. Slootweg, A. Knezev, M. van der Schans, L. Zandvliet, A. Reus, D. Vughs, L. Heijnen, T. Knol, J. El Majjaoui, P. van der Wielen, P. J. Stuyfzand and K. Lekkerkerker-Teunissen (2022). "Improved drinking water quality after adding advanced oxidation for organic micropollutant removal to pretreatment of river water undergoing dune infiltration near The Hague, Netherlands." *Journal of Hazardous Materials* 429: 128346.

Tran, N. H., T. Urase and O. Kusakabe (2009). "The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds." *Journal of Hazardous Materials* 171(1): 1051-1057.

van Bel, N., C. Bertelkamp and P. H. A. Timmers (2020). "Biologische afbraak van organische microverontreinigingen in snelfilters van de drinkwaterzuivering." BTO 2020.028.

van der Kooij, D., B. Martijn, P. G. Schaap, W. Hoogenboezem, H. R. Veenendaal and P. W. van der Wielen (2015). "Improved biostability assessment of drinking water with a suite of test methods at a water supply treating eutrophic lake water." *Water Res* 87: 347-355.

Wang, J., D. de Ridder, A. van der Wal and N. B. Sutton (2021). "Harnessing biodegradation potential of rapid sand filtration for organic micropollutant removal from drinking water: A review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 51(18): 2086-2118.

Wang, J., Q. ran, X. Du, S. Wu, J. Wang, D. Sheng, Q. Chen, Z. Du and Y.-z. Li (2021). "Two new *Polyangium* species, *P. aurulentum* sp. nov. and *P. jinanense* sp. nov., isolated from a soil sample." *Systematic and Applied Microbiology* 44(6): 126274.

Zearley, T. L. and R. S. Summers (2012). "Removal of Trace Organic Micropollutants by Drinking Water Biological Filters." *Environmental Science & Technology* 46(17): 9412-9419.

Zhou, J., D. Wang, F. Ju, W. Hu, J. Liang, Y. Bai, H. Liu and J. Qu (2022). "Profiling microbial removal of micropollutants in sand filters: Biotransformation pathways and associated bacteria." *Journal of Hazardous Materials* 423: 127167.