

Verbetering microbiologische waterkwaliteit RWZI-effluent door nazuivering met waterharmonica

Aleida Hommes-de Vos van Steenwijk, Marc van Bommel (Orvion), Henk Tamerus, Oscar van Zanten (waterschap de Dommel)

Waterharmonica 'waterpark Groote Beerze' zorgt voor een natuurlijke nazuivering van het effluent van rioolwaterzuivering Hapert. Wat het effect hiervan is op de microbiologische waterkwaliteit was echter niet bekend. Aan de hand van een combinatie van DNA-technieken (NGS en qPCR) is in deze studie aangetoond dat de microbiële samenstelling van het RWZI-effluent als gevolg van de nazuivering aanzienlijk is veranderd en dat de impact op de ontvangende Natura2000-beek De Groote Beerze daardoor minimaal is.

Waterpark Groote Beerze bij rioolwaterzuivering Hapert werd in 2001 aangelegd en was de eerste natuurlijke nazuivering (waterharmonica) van waterschap De Dommel. In 2018 is het waterpark geoptimaliseerd om de prestaties te verbeteren en het geheel onderhoudsvriendelijker te maken. Het waterpark is een systeem van vijvers, sloten, open water met waterplanten en moerasbos, dat het effluent van de RWZI omzet in natuurlijk beekwater ('ecologiseert'). De beek de Groote Beerze (waar de RWZI zijn effluent op loost) is een van de meest natuurlijke beken in het beheergebied van waterschap De Dommel en onderdeel van een Natura2000-gebied dat deel uitmaakt van een Europees netwerk van natuurgebieden. In het beekdal zijn waardevolle plant- en diersoorten als blauwgraslanden, waterweegbree, waterranonkel en de zeldzame kleine modderkruiper te vinden. Het waterpark heeft als (hoofd)doel om dit kwetsbare ecosysteem beter te beschermen tegen de lozing uit de RWZI. Daarnaast vervult het waterpark ook de functies van (regenwater)buffer, natuurontwikkeling en recreatie en educatie.

Onderdeel van de ecologisering van het effluent in het waterpark is de verwijdering van micro-organismen uit het rioolwater en de waterzuivering. Deze maken immers geen deel uit van natuurlijk beekwater. In welke mate dit wordt gerealiseerd is echter niet bekend. Concentraties van kweekbare indicatorbacteriën, zoals *Escherichia coli*, nemen in een waterharmonica af als gevolg van natuurlijke sterfte, door sedimentatie, biologische filtratie en sterfte door UV-straling [1]. Dergelijke kweekanalyses geven echter een te beperkt beeld. Het effluent bevat ook veel andere niet-kweekbare microben waarvoor *E. coli* geen goede indicator is. Bovendien maken vogels en andere dieren ook dankbaar gebruik van het waterpark. Deze kunnen *E. coli* weer in het water introduceren, wat een vertekend beeld geeft van de verwijdering van deze fecale indicator.

Om te kunnen bepalen of het waterpark in staat is micro-organismen efficiënt uit het RWZI-effluent te verwijderen hebben waterschap De Dommel en Orvion een alternatieve aanpak gevolgd. Met ORVldecode NGS-analyses van Orvion is in plaats van enkele indicatororganismen juist het volledige microbioom, de microbiële samenstelling van het water, gemeten op verschillende punten in het waterpark en in de beek. Hiermee is inzicht verkregen in het effect van de natuurlijke nazuivering op de microbiële samenstelling van het RWZI-effluent en de impact op de beek de Groote Beerze. Ook is een eerste beeld verkregen van het effect van de verschillende stappen van de nazuivering op de microbiële samenstelling van het water. Daarnaast zijn metingen op specifieke fecale

indicatororganismen uitgevoerd met qPCR om nader te beoordelen wat de bron van aangetroffen fecale besmetting in het water is (humaan/RWZI of anders).

Waterpark Groote Beerze

Waterpark Groote Beerze bestaat uit twee delen, waterpark Noord en waterpark Zuid. Beide delen zijn opgebouwd uit acht compartimenten. Een schematisch overzicht van het waterpark is gegeven in afbeelding 1, de compartimenten worden hieronder beknopt toegelicht.



Afbeelding 1. Overzicht van het waterpark met de verschillende compartimenten (1-8). Bemonsteringsplekken zijn met rode stippen aangegeven

Buffersloot/verdeelsloot (1 & 2): Deze dient voor het bufferen en gelijkmatig verdelen van het water over de bezinkvijver. De verblijftijd is 0,2 dag (5 uur).

Vlooienvijver/UV-plateau (3 & 4): het effluent wordt in 1,8 dagen (43 uur) ontdaan van bezinkbare deeltjes (bezinking), zwevende stoffen en (een deel van) de bacteriën. De in groten getale aanwezige watervlooiën zorgen onder andere voor afname van bacteriën (biologische filtratie). De laatste zes meter van de vlooienvijver is over de hele breedte verondiept (10-20 cm waterdiepte). UV-licht doodt bacteriën.

Rietsloot/vijver met ondergedoken waterplanten (5 & 6): De sloot en vijver vormen een ecologisch filter (o.a. door filterwerking, plantopname en biodegradatie) en door ondergedoken waterplanten komt er zuurstofritmiek (dag/nachtritme O₂) in het water. De verblijftijd is 0,8 dag (19 uur).

Moerasbos met snelle loop (sloot) (7 & 8): Deze sloot is ondiep en heeft een zandige bodem. Door UV-instraling worden hier mogelijk ook bacteriën gedood. Er stroomt alleen water in het moerasbos bij hoge regenwateraanvoer (RWA). De verblijftijd in de snelle loop is 0,1 dag (2 uur).

De totale gemiddelde hydraulische verblijftijd (HRT) is ongeveer 3 dagen bij droogweeraanvoer (DWA).

Monsternamen

In juli 2020 zijn de volgende monsters genomen, op de in afbeelding 1 aangegeven plaatsen:

RWZI-effluent: steekmonster van het effluent. Dit monster bevat de micro-organismen die in het waterpark moeten worden verwijderd.

Waterpark: het uitstromende water van Noord en Zuid. Deze monsters laten zien in hoeverre de micro-organismen uit het RWZI-effluent zijn verwijderd. In waterpark Zuid zijn nog twee monsters genomen: aan het einde van de bezinkvijver en na de vijver met waterplanten. Deze monsters geven inzicht in het microbiom in de verschillende compartimenten van het waterpark.

Beek de Grootte Beerze: stroomopwaarts is een monster van de Grootte Beerze genomen als referentiemonster dat niet wordt beïnvloed door de rioolwaterzuivering. Verder is een monster genomen na het lozingspunt van Zuid op de beek en een derde na het lozingspunt van Noord (invloed van beide lozingen) op de beek. Hiermee wordt een eerste inzicht verkregen in hoeverre de lozing impact heeft op de microbiële samenstelling van de Grootte Beerze.

Uitgevoerde DNA-analyses

Om de microbiële samenstelling inzichtelijk te maken zijn ORVidecode-NGS-analyses uitgevoerd op de acht watermonsters. Hiermee wordt al het aanwezige DNA in een monster gedecodeerd met *next generation sequencing* (NGS). Met algoritmes worden de gedecodeerde stukken DNA geïdentificeerd aan de hand van databases waarin bekende microbiële DNA-sequenties staan opgeslagen. Op deze manier is voor het eerst de biodiversiteit (microbiële samenstelling/microbiom) van het RWZI-effluent, het waterpark en de Grootte Beerze inzichtelijk gemaakt. De data zijn steeds op verschillende manieren gefilterd en gevisualiseerd om inzichten te verkrijgen in de werking en effectiviteit van het waterpark.

Een ORVidecode-analyse geeft inzicht in de relatieve aantallen (percentages) van micro-organismen in een monster. Een toename in het aandeel van een bacteriegroep hoeft dan niet te betekenen dat de absolute aantallen ook zijn toegenomen (of andersom). Om informatie te verkrijgen over absolute concentraties zijn daarom ook qPCR analyses uitgevoerd op 'universeel bacteriën' en Archaea. Om verder inzicht te verkrijgen in de verwijdering van fecale bacteriën in het waterpark, zijn extra qPCR-tellingen uitgevoerd op de fecale indicatororganismen *E. coli* en *Bacteroides dorei* (een fecale indicator die specifiek is voor humane feces).

Bacterieaantallen in het water

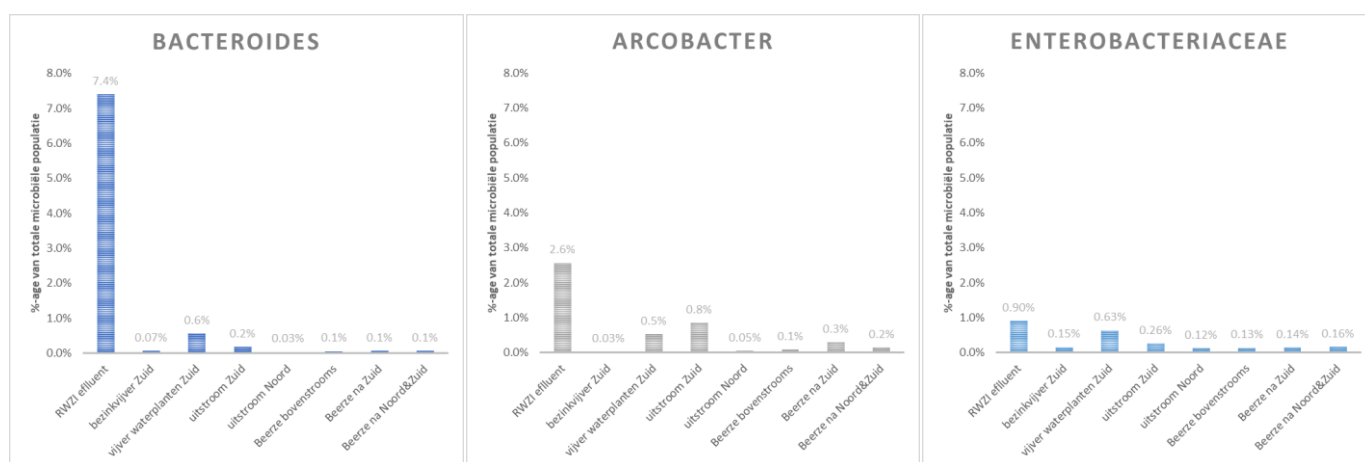
De bacterieconcentraties in de acht watermonsters zijn met qPCR geanalyseerd om te bepalen hoe groot de verschillen tussen de monsters zijn. Uit de resultaten blijkt dat het aantal bacteriën in de acht monsters vergelijkbaar is en met maximaal een factor 4,2 verschilt: het RWZI-effluent bevatte op het moment van bemonstering de laagste concentraties bacteriën ($2,6 \times 10^6$ DNA-kopieën/ml) en het monster na de bezinkvijver/UV-plateau bevatte de hoogste concentraties bacteriën ($1,1 \times 10^7$ DNA-kopieën/ml). De monsters van het uitstromende water van Noord en Zuid bevatte iets kleinere aantallen bacteriën dan het bovenstroomse monster van de Grootte Beerze. Dit toont aan dat natuurlijke beekwater niet per se lagere concentraties bacteriën bevat, juist de microbiële samenstelling bepaalt de kwaliteit van het water.

Bij de beoordeling van de NGS-analyses betekent dit bovendien dat wanneer er grote toe- of afnames zijn gevonden in de percentages microbiële groepen tussen de monsters, ook de daadwerkelijke concentraties zijn toe- of afgenomen.

Het RWZI-microbioom

In het RWZI-effluent zijn met ORVldecode NGS veel verschillende bacteriëngroepen aangetroffen. Een aantal hiervan is dominant aanwezig en onderscheidend voor het RWZI-effluent ten opzichte van de andere zeven monsters. Ze hebben een duidelijke oorsprong in het behandelde rioolwater of de zuivering zelf (het actiefslib). Dit zijn bijvoorbeeld fecale bacteriegroepen als *Bacteroides* en *Faecalibacterium*, maar ook de bacteriegroep *Ca. Accumulibacter* die in het RWZI-actiefslib een centrale rol speelt in het zuiveringsproces. De bacteriegroep *Arcobacter* is ook dominant aangetroffen. Onlangs is bekend geworden dat deze potentiële pathogeen niet goed wordt verwijderd door een RWZI [2]. Het is daarom waardevol om te beoordelen of het waterpark dit verwijderingsrendement kan verbeteren.

De resultaten van de ORVldecode-analyses laten zien dat veel van de in het RWZI-effluent dominant aanwezige bacteriegroepen na het waterpark nagenoeg zijn verdwenen. Zoals *Bacteroides*, dat 7,4 procent uitmaakt van de microbiële biodiversiteit in het RWZI-effluent en in het uitstromende water van Noord nog maar 0,04 procent. *Ca. Accumulibacter* laat eenzelfde trend zien. Deze vormt 5,6 procent van de microbiële biodiversiteit in het RWZI-effluent en nog maar 0,08 procent van het uitstromende water van Noord (zie afbeelding 2).



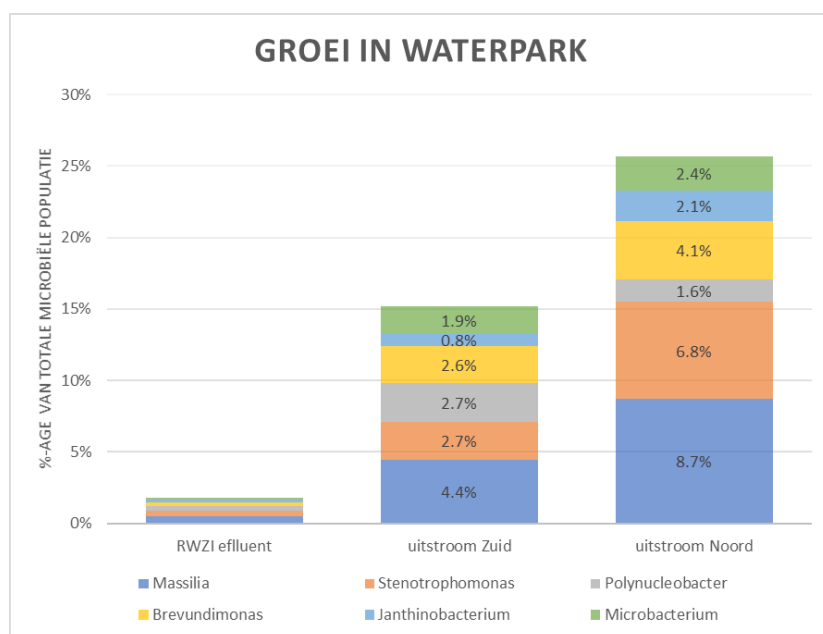
Afbeelding 2. Percentages van drie bacteriegroepen in de monsters van het RWZI-effluent, het waterpark en de beek. *Bacteroides* is de meest talrijke darmbacterie in zoogdieren en daarmee een belangrijke fecale indicatorbacterie in water. *Arcobacter* is een potentiële pathogeen die niet efficiënt wordt verwijderd door RWZI's. De groep *Enterobacteriaceae* is een verzameling van veel bekende darmbacteriën als *E. coli*, *Citrobacter* en *Salmonella*

Het aandeel van twee bacteriegroepen die dominant (>1%) zijn in het RWZI effluent is weinig veranderd in het uitstromende water. Dit geeft aan dat ze mogelijk niet efficiënt worden verwijderd in de nazuivering. Zo is bijvoorbeeld in het RWZI-effluent het aandeel *Acinetobacter* (2,0%) en *Flavobacterium* (3,5%) vergelijkbaar met het aandeel in het uitstromende water van Zuid (respectievelijk 1,3% en 3,1%) en Noord (1,7% en 2,7%). Een andere opvallende bacteriegroep is *Pseudomonas*, die dominant is in het RWZI-effluent (3,6%), maar in aandeel is toegenomen in het uitstromende water van Zuid (9,2%) en Noord (19,3%). Op dit moment is niet bepaald in hoeverre de

samenstelling op soortniveau binnen deze bacteriegroepen is gewijzigd. Een verdere verdieping in de microbiële data zal moeten uitwijzen of deze bacteriegroepen niet goed worden verwijderd. Of dat de soortensamenstelling als gevolg van de nazuivering wel significant is veranderd. Deze soorten zouden dan niet afkomstig zijn uit het RWZI-effluent, maar aangroeien in het waterpark.

Het waterparkmicrobioom

Het waterpark is effectief in het verregaand verwijderen van micro-organismen uit riool en RWZI. Maar welke bacteriële groepen komen hiervoor in de plaats? Bepaald is welke bacteriegroepen dominant (>1%) zijn geworden in het uitstromende water van het waterpark ten opzichte van het RWZI-effluent (afbeelding 3). Dit geeft een beeld van welke bacteriegroepen aangroeien in het waterpark. Dit zijn bijvoorbeeld *Stenotrophomonas* en *Polynucleobacter*, die vooral bekend zijn uit milieuecosystemen als bodem en zoetwater [3], [4]. Het is dan ook aannemelijk dat juist deze groepen in het ecosysteem van het waterpark dominant zijn geworden. De microbiële samenstelling van waterpark Noord en Zuid zijn op hoofdlijnen vergelijkbaar: dezelfde groepen zijn dominant geworden. Dit geeft aan dat het natuurlijke nazuiveringsproces op hoofdlijnen voor beide delen vergelijkbaar is.

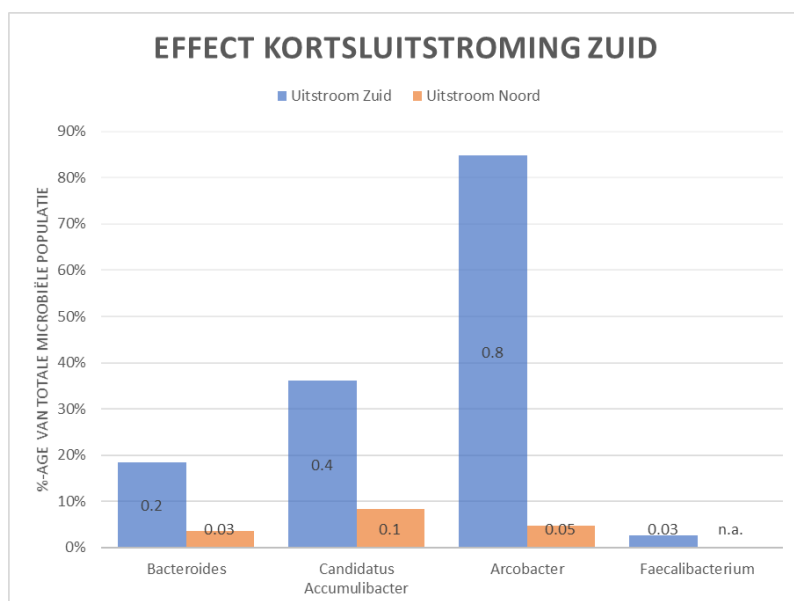


Afbeelding 3. Bacteriegroepen die als gevolg van de nazuivering in het waterpark dominant zijn geworden in het uitstromende water

Tijdens de monsternamen is opgemerkt dat bij Zuid een bypass in werking was (oranje pijl in afbeelding 1). Een relatief klein deel van het RWZI-effluent is daardoor niet door de bezinkvijver, over het UV-plateau, door de rietsloot en door een deel van de waterplantenvijver gegaan, maar vrijwel direct naar het einde van het waterplantencompartiment. Een groot deel van het waterpark is daarmee overgeslagen.

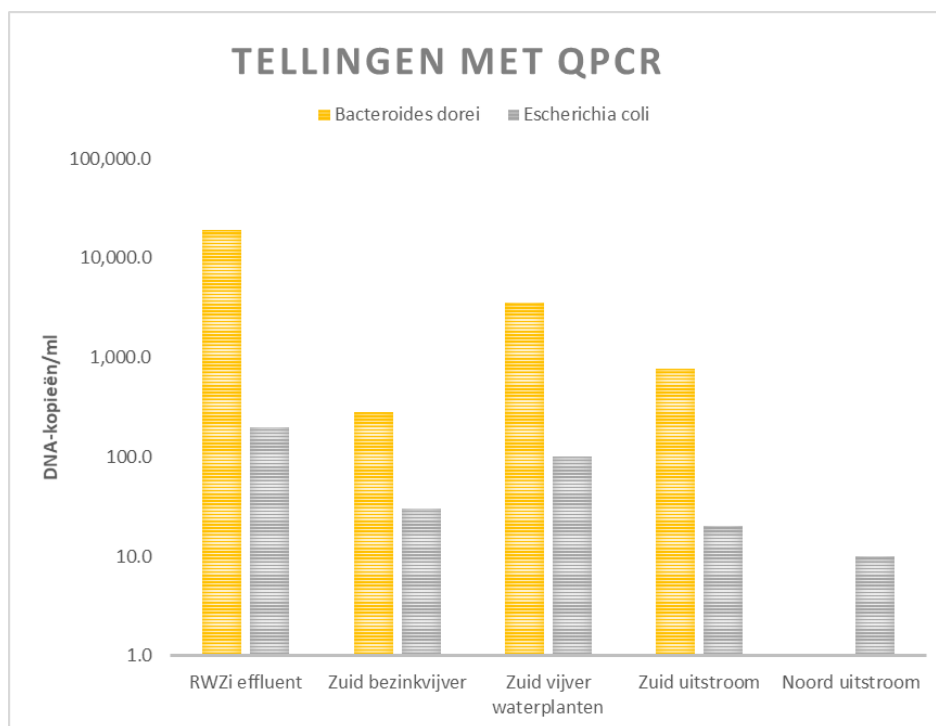
De microbiële data laten duidelijk het effect van de kortsluitstroming zien. Het uitstromende water van Zuid heeft voor een aantal RWZI-micro-organismen een minder efficiënte verwijdering dan Noord (afbeelding 4). Met name de verwijdering van *Arcobacter* lijkt baat te hebben bij een langere

verblijftijd en de additionele zuiveringsstappen; de verwijdering hiervan is in Noord 16 keer zo hoog als in Zuid.



Afbeelding 4. Bacteriegroepen uit het RWZI-effluent die minder effectief worden verwijderd in Zuid (met kortsluitstroming) dan in Noord. (n.a. = niet aangetoond)

Dit wordt bevestigd door de qPCR-tellingen van de fecale indicatorbacteriën *Bacteroides dorei* en *E. coli* (afbeelding 5). De grootste afname in deze aantallen vind plaats na de bezinkvijver en het UV-plateau. Doordat een deel van het water deze stap niet heeft doorlopen maar direct naar het einde van de vijver met waterplanten stroomt, is in dit monster de concentratie hoger. In het uitstromende water van Zuid is daarom nog *B. dorei* in verhoogde aantallen teruggevonden, terwijl dit in het uitstromende water van Noord niet meer is aangetoond.



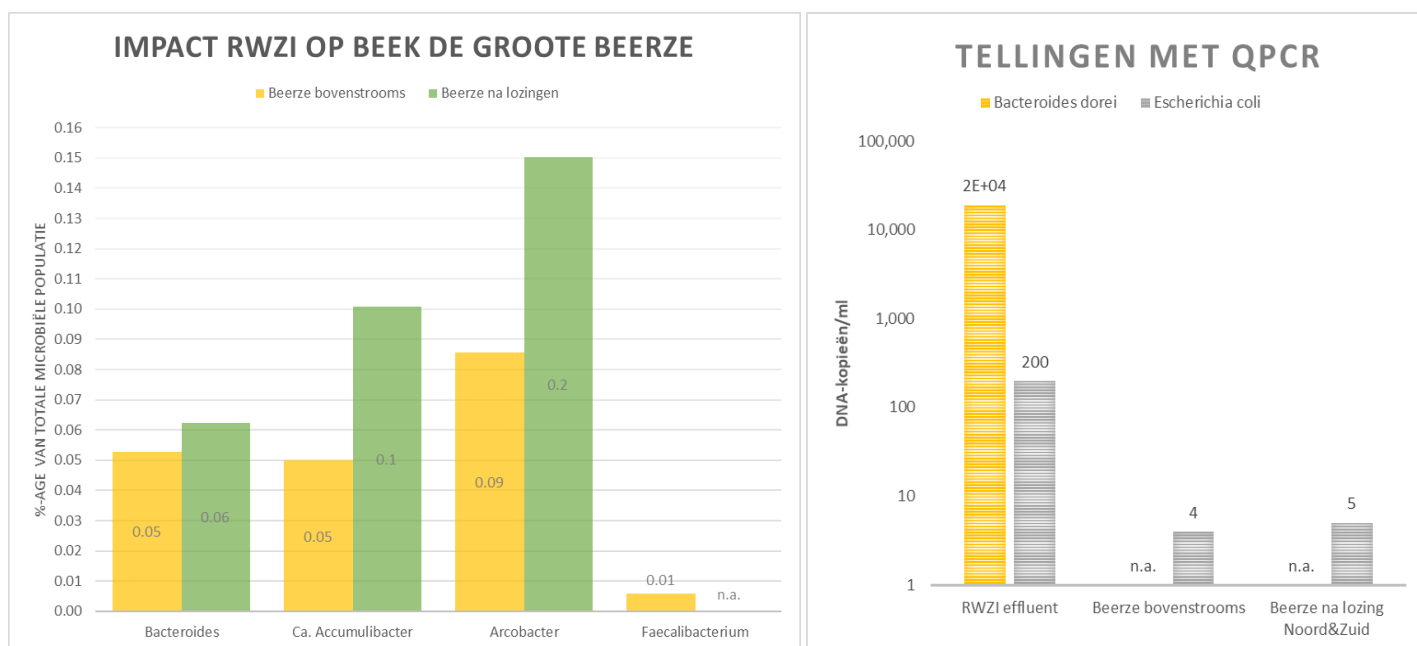
Afbeelding 5. Aantallen van twee fecale indicatorbacteriën in de verschillende monsters

De beschikbare data kunnen niet allemaal worden behandeld. Zo is bijvoorbeeld gebleken dat in de verschillende compartimenten specifieke bacteriegroepen dominant worden. In de bezinkvijver zijn bijvoorbeeld specifiek de groepen *Porphyrobacter*, *Pseudanabaena* en *Oscillatoria* dominant, of *Nitrospira* in de waterplantenvijver. Dergelijke informatie kan op termijn worden gebruikt om de rol van de verschillende zuiveringsstappen op microbiel niveau beter te begrijpen en hierop te sturen met beheer en onderhoud.

Effect van de lozing op de beek de Grote Beerze

Uiteindelijk moet het waterpark de impact van de RWZI op de Grote Beerze minimaliseren. Om te beoordelen hoe effectief dit op microbiologisch niveau is, is een bovenstrooms monster (geen effect van de RWZI) vergeleken met een benedenstrooms monster na de lozingspunten van waterpark Noord en Zuid. Beoordeeld is of het aandeel van bacteriegroepen die dominant aanwezig zijn in het RWZI-effluent na de lozingen is toegenomen (afbeelding 6).

Uit de resultaten blijkt dat van deze bacteriegroepen reeds een laag achtergrondaandeel aanwezig is in het referentiemonster (0,01% tot 0,09%). Te zien is dat het aandeel na de lozingen licht verhoogd is, behalve voor *Faecalibacterium*. Zo neemt het aandeel *Arcobacter* toe van 0,09 procent in het bovenstroomse referentiemonster tot 0,2 procent in het stroomafwaartse monster. Duidelijk is echter dat de verhoging vele malen groter zou zijn als het RWZI-effluent direct op de beek zou worden geloosd. Het aandeel van een aantal andere bacteriegroepen is ook na de lozingen toegenomen, zoals *Stenotrophomonas* en *Massilia* (beide vooral geassocieerd met planten [3], [5]). Deze bacteriegroepen zijn afkomstig uit de natuurlijke omgeving van het waterpark en de verwachting is daarom dat deze minder (of geen) negatieve impact hebben op de beek in vergelijking met het RWZI-effluent.



Afbeelding 6. Links: aandelen van enkele bacteriegroepen in de Beerze die enkel in het RWZI-effluentmonster dominant (>1%) aanwezig zijn. Rechts: tellingen van fecale indicatorbacteriën. (n.a. = niet aangetoond)

De qPCR-tellingen laten zien dat *B. dorei* benedenstrooms niet wordt aangetoond in het water van de beek (afbeelding 6, rechts). Deze indicator is specifiek voor humane fecale contaminatie dan *E. coli* en heeft daarom minder last van fecale besmettingen afkomstig van vogels of andere warmbloedige dieren. Dit laat nogmaals zien dat de impact van het RWZI-effluent op de beek na verdere zuivering in het waterpark minimaal is.

Nazuivering in waterpark ter voorkoming microbiële verontreiniging van het milieu

Ondanks het hoge zuiveringsrendement bevat het effluent van RWZI Hapert, net als bij andere RWZI's, nog altijd hoge concentraties bacteriën uit het behandelde rioolwater. Dit is bijvoorbeeld terug te zien in het hoge aandeel fecale bacteriën en potentiële pathogenen als *Arcobacter*.

Met DNA-technieken is aangetoond dat de nazuivering van het RWZI-effluent in waterpark Groote Beerze de microbiële kwaliteit van het water vergaand verbetert. De microbiële impact van het effluent op het ontvangende water, de beek de Groote Beerze, wordt nauwelijks terug gemeten. Het is belangrijk om te beseffen dat de uitgevoerde metingen een momentopname zijn. Het effect van seizoensinvloeden of andere natuurlijke variaties op de microbiële verwijderingsrendement is nog niet beoordeeld.

De microbiële samenstelling van het water verandert aanzienlijk in de nazuivering. Vooral bacteriegroepen die worden geassocieerd met zoetwater, planten en bodem worden dominant. Metingen in de verschillende stappen van de nazuivering hebben aangetoond dat de voornaamste verwijdering van het RWZI-microbioom plaatsvindt in de bezinkvijver en het UV-plateau.

De data laten duidelijk het effect van de korstluitstroming in waterpark Zuid zien. Dit toont ook het belang van beheer en onderhoud aan voor het goed functioneren van het nazuiveringssysteem. De kortsluitstroming is inmiddels verholpen en het zou waardevol zijn om te beoordelen of het

microbiële zuiveringsrendement daardoor is verbeterd en de impact op de beek nog verder is verminderd.

Uit de data is gebleken dat met name *Arcobacter* minder efficiënt wordt verwijderd als het waterpark suboptimaal presteert. Een meer routinematige monitoring van *Arcobacter*, *B. dorei* en 'universeel bacteriën', zou daarom nuttig zijn om kwantitatief te beoordelen hoe de natuurlijke nazuivering presteert en of/hoe deze kan worden geoptimaliseerd.

Met de gebruikte DNA-methoden is het mogelijk de verwijdering van antibioticaresistentiegenen (ARG) door het waterpark te beoordelen. RWZI-effluenten zijn ARG-hotspots en zorgen voor een toename in ARG in het watermilieu [6]. Het minimaliseren van deze instroom voorkomt de verspreiding en ontwikkeling van antibioticaresistentie. ARG kunnen door bacteriën onderling worden uitgewisseld en daarom is de verwijdering van de RWZI-bacteriën mogelijk niet direct te relateren aan de verwijdering van ARG. Data over ARG in de acht monsters is beschikbaar in de gegenereerde ORVidecode-resultaten en zouden nader onderzocht kunnen worden.

De toegepaste analysemethoden hebben de benodigde data geleverd om de effectiviteit van de natuurlijke nazuivering van RWZI-effluent inzichtelijk en meetbaar te maken. De onzichtbare wereld van de onderwatermicroben is zichtbaar gemaakt en daarmee ook de meerwaarde van waterpark Groote Beerze in het verbeteren van de microbiologische waterkwaliteit.

Referenties

1. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (2012). *Waterharmonica, onderzoek naar zwevende stof en pathogenen*, deelstudierapport 4
2. Kristensen, J.M., Nierychlo, M., Albertsen, M., Nielsen, P.H. (2020). 'Bacteria from the Genus *Arcobacter* Are Abundant in Effluent from Wastewater Treatment Plants'. *Appl. Environ. Microbiol.* 86.
3. Ryan, R.P. et al. (2009). 'The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*'. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 514–525.
4. Jezberová, J. et al. (2010). 'Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* ssp. *asymbioticus* in lentic freshwater habitats of a heterogeneous 2000 km² area'. *Environ. Microbiol.* 12, 658–669.
5. Ofek, M., Hadar, Y., and Minz, D. (2012). 'Ecology of Root Colonizing Massilia (*Oxalobacteraceae*)'. *PLOS ONE* 7, e40117.
6. Sabri, N.A. et al. (2020). 'Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands'. *J. Environ. Chem. Eng.* 8, 102245.