

ADVIESRAPPORT PATHOGENEN IN STRUVIET

ENERGIE
EN
Grondstoffen
FABRIEK

stowa

has
hogeschool

Auteurs: Bob Schalk en Thijs Koenraad

Opleiding: Milieukunde

Leerjaar: 4

Projectbegeleiders: Sebastiaan Morre en René Schoorl

Opdrachtgever: Werkgroep Nutriënten van de Energie- en Grondstoffenfabriek; en STOWA

Datum: 07-07-2021

HAS Hogeschool
Onderwijsboulevard 221
Postbus 90108
5200 MA 's-Hertogenbosch
Telefoon: 088 890 36 00

Documenttitel: Pathogenen in struviet
Projectcode: 21200185

Opdrachtgever: STOWA en Werkgroep Nutriënten van de Energie- en Grondstoffenfabriek

Contactpersoon: Ruud Schemen

Projectleider: Sebastiaan Morre

Inhoudelijk expert: René Schoorl

Projectteam: Bob Schalk
Thijs Koenraad

Plaats: 's-Hertogenbosch
Datum: 7 juli 2021

Voorwoord

Dit project is uitgevoerd als beroepsopdracht voor de werkgroep Nutriënten van de Energie- en Grondstoffenfabriek (EFGF) en STOWA (Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer). Hierbij was Ruud Schemen het aanspreekpunt namens de hierboven genoemde partijen. Vanuit HAS Hogeschool zijn Sebastiaan Morre en René Schoorl, docenten Milieukunde, aangesteld om het project te begeleiden.

Wij willen Ruud Schemen bedanken voor de prettige samenwerking gedurende het project. Ook willen we Sebastiaan Morre en René Schoorl bedanken voor de goede begeleiding. Verder willen we Judith van den Thillart-van Eijk, Angelique Epping en Mark van Lokven, van het microbiologie lab op HAS Hogeschool, bedanken voor de begeleiding en samenwerking tijdens de experimenten. Als laatste willen we Rob de Jonge, werkzaam bij het RIVM, bedanken voor het meedenken bij het opstellen van de juiste opzet van de experimenten.

Samenvatting

Dit project is uitgevoerd in opdracht van STOWA en de Werkgroep Nutriënten van de Energie- en Grondstoffenfabriek. Struviet dat momenteel door verschillende RWZI's in Nederland wordt geproduceerd wordt op dit moment verkocht op basis van een "eigen verklaring". Hierdoor is de economische waarde en de afzet beperkt. Om dit te vergroten wordt de voorkeur gegeven aan een rechtsoordeel (van de overheid) waarin wordt aangegeven dat struviet aan criteria van de einde-afvalstatus voldoet. In de Kaderrichtlijn afvalstoffen staat beschreven dat een product onder andere niet schadelijk mag zijn voor mens en milieu om aan de norm voor einde-afvalstatus te voldoen.

In het verleden is het aantal pathogenen op struviet bepaald, waarbij in sommige gevallen relatief hoge aantallen pathogenen zijn aangetroffen. Op dit moment is de reden hiervan onbekend. Daarom is het doel van dit onderzoek om handvatten te creëren waarmee struviet van constante kwaliteit geproduceerd kan worden, kijkend naar pathogenen.

Dit onderzoek is uitgevoerd bij de volgende RWZI's: Amersfoort, Amsterdam-West, Apeldoorn, Land van Cuijk, 's-Hertogenbosch en Tiel. Allereerst zijn de verschillende struviet productie methoden met de omliggende zuiveringsprocessen in kaart gebracht. Ook zijn de eigenschappen van het geproduceerde struviet per onderzoekslocatie onderzocht. Daarna is de overleving van *E. coli* op struviet onderzocht door struviet monsters van RWZI Apeldoorn en 's-Hertogenbosch te spiken. De overleving van *E. coli* is in een open en gesloten opslag onderzocht. In beide methoden van opslag is een afname van *E. coli* waargenomen, om deze reden is de invloed van organisch stof op struviet voor de overleving van *E. coli* onderzocht. Ook is het verloop van *E. coli* en *C. perfringens* in en rondom het struviet productieproces in beeld gebracht.

Uit de resultaten is naar voren gekomen dat de a_w -waarde van vers struviet boven de overlevingswaarde van *E. coli* ligt, voor de zes onderzochte locaties. Verder vindt minimaal 2 log reductie plaats van *E. coli* op struviet na 18 dagen en minimaal 4 log reductie na 29 dagen. Het verloop van *E. coli* tussen een monster dat gespoeld is en hierdoor minder CZV bevat en een niet gespoeld monster is gelijk. De hoogst gemeten *E. coli* waarde op vers geproduceerd struviet hoeveelheid is 230 kve/gram. Verder is gemeten dat de hoeveelheid *E. coli* na een thermofiele vergisting van boven de 50 °C ver onder het meetbereik is, dus nagenoeg 0 kve/gram. Het aantal *C. perfringens* is op elke zuivering voor de slibvergisting rond de $1 \cdot 10^5$ kve/gram, welke langzaam afneemt gedurende het proces.

Aan de hand van de resultaten blijkt dat de hoge a_w -waarde van struviet ($>0,95$) gunstig is voor de overleving van *E. coli*. Daarnaast is bevonden dat de mate waarin organisch stof aanwezig is op struviet, net als de wateractiviteit, geen effect heeft op de mate waarin *E. coli* kan overleven op struviet. Uit de resultaten blijkt dat *E. coli* zowel in een open als gesloten opslag afsterft door middel van tijd. De afname van *E. coli* na thermofiele vergisting kan verklaard worden doordat de maximale overlevingstemperatuur van *E. coli* 45 °C is.

Afhankelijk van het struviet productieproces en de omliggende zuiveringsprocessen wordt de opslagtijd van struviet bepaald. Door middel van deze opslag worden onverwachte pieken van *E. coli* op struviet verlaagd waardoor een veilig product geleverd wordt. Aanbevolen wordt om het struviet minimaal 18 dagen op te slaan wanneer gebruik gemaakt wordt van een mesofiele slibvergisting, zodat een 2 log reductie van *E. coli* plaatsvindt. Deze opslagtijd kan verkleind worden wanneer het struviet in big bags wordt opgeslagen of wordt gedroogd door middel van een droogstap. Wanneer gebruik gemaakt wordt van een thermofiele slibvergisting is geen opslag nodig voor de reductie van *E. coli* op struviet.

Geadviseerd wordt de overleving van *E. coli* bij verschillende temperaturen, gebaseerd op seizoenen, te onderzoeken. Daarnaast wordt aanbevolen op meerdere momenten *E. coli* en *C. perfringens* van verse monsters te meten, zodat de variatie hiervan in beeld gebracht kan worden. Als laatste wordt geadviseerd de overleving van *E. coli* op struviet monsters van verschillende locaties te onderzoeken, zodat verschillen in afnamesnelheid inzichtelijk gemaakt worden.

Inhoud

1.	Inleiding.....	1
2.	Struviet.....	3
2.1	Wat is struviet?.....	3
2.2	Hoe wordt struviet geproduceerd op een RWZI?.....	5
3.	<i>Escherichia Coli</i>	8
4.	<i>E. coli</i> overleving bij verschillende struviet productieprocessen	10
4.1.	Methode	10
4.2.	Resultaten	11
4.3.	Discussie.....	13
4.4.	Conclusie.....	13
5.	Eigenschappen struviet monsters.....	14
5.1.	Methode	14
5.2.	Resultaten	15
5.3.	Discussie.....	18
5.4.	Conclusie.....	19
6.	Effect opslag van struviet op overleving <i>E. coli</i>	20
6.1.	Methode	20
6.2.	Resultaten	22
6.3.	Discussie.....	26
6.4.	Conclusie.....	27
7.	Invloed organisch stof op struviet voor overleving <i>E. coli</i>	28
7.1.	Methode	28
7.2.	Resultaten	28
7.3.	Discussie.....	29
7.4.	Conclusie.....	29
8.	Verloop <i>E. coli</i> en <i>C. perfringens</i> bij processen op een RWZI	30
8.1.	Methode	30
8.2.	Resultaten	31
8.3.	Discussie.....	36
8.4.	Conclusie.....	36
9.	Conclusie en advies.....	37
	Literatuurlijst.....	39
	Bijlage 1: Ruwe meetdata	1

Bijlage 2: Berekening theoretische oplosbaarheid struviet	5
Bijlage 3: Resultaten Hygiëne swaptest.....	7
Bijlage 4: <i>Clostridium Perfringens</i>	8
Bijlage 5: Informatietabel verschillen onderzochte RWZI's	9

1. Inleiding

Struviet, een grondstof bestaande uit ammonium, fosfaat en magnesium, heeft in de meeste EU-staten een afvalstatus. Dit betekent dat moet worden aangetoond dat het voldoet aan de einde-afvalcriteria uit de Kaderrichtlijn afvalstoffen voordat het als grondstof verkocht mag worden (Huygens et al., 2019). In Nederland worden door een aantal rioolwaterzuiveringen struviet geproduceerd. Dit struviet wordt verkocht aan bedrijven om dit te verwerken tot producten, zoals kunstmest. Zolang dit struviet een afvalstatus heeft moeten afnemers in hun vergunning opgenomen hebben dat ze afvalstoffen mogen verwerken. Dit beperkt zowel de afzet als de economische waarde van struviet.

De afzet en economische waarde kan vergroot worden door het behalen van de einde-afvalstatus voor struviet. In de Kaderrichtlijn afvalstoffen staat beschreven dat een product onder andere niet schadelijk mag zijn voor mens en milieu om aan de norm voor einde-afvalstatus te voldoen (Europees Parlement, 2008). Voor de einde-afvalstatus voor struviet wordt in de meeste EU-staten de STRUBIAS (STRUvite, Blochar en AShes) criteria aangehouden. Op dit moment wordt in Nederland struviet verhandeld op basis van een eigen verklaring (van de struviet producent) dat het geen afvalstof is. Omdat een oordeel van de overheid meer waarde heeft hebben de waterschappen in de Green Deal grondstoffen uit 2014 gevraagd of het ministerie een uitspraak kan doen over de inzet van struviet uit afvalwater. Hierop heeft het ministerie van infrastructuur en waterstaat het RIVM om advies gevraagd. Het RIVM heeft diverse modules ontwikkeld waaraan wordt getoetst. Hierbij moet gedacht worden aan zware metalen, Zeer Zorgwekkende Stoffen (ZZS), medicijnresten en pathogenen. Op al deze modules scoorde struviet goed, enkel voor de module van pathogenen is nader onderzoek benodigd.

Aan de hand van de analyses die in het verleden zijn uitgevoerd om het aantal pathogenen op het geproduceerde struviet te bepalen, is gebleken dat een batch struviet niet altijd aan de STRUBIAS criteria voldoet (Jong de et al., 2019). Op dit moment is de reden hiervoor onbekend en wordt er gezocht naar een methode om de kwaliteit van het geproduceerde struviet te waarborgen kijkend naar pathogenen. Vanuit de werkgroep Nutriënten van de Energie- en Grondstoffenfabriek (EFGF) en STOWA (Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer) is om deze reden dit project opgestart. Dit project is mogelijk gemaakt door de bijdrage van STOWA.

Allereerst is een inventarisatie van de verschillende struviet productieprocessen gemaakt waarin de hoeveelheid *E. coli*, als indicatororganisme voor pathogenen, gedurende het proces gemeten is. Ook is onderzocht welke handvatten beschikbaar zijn om het aantal *E. coli* op struviet te verlagen. Dit onderzoek is gefocust op de aanwezigheid van *E. coli* als indicator voor de mogelijke pathogenen. Ook is in het geproduceerde struviet de hoeveelheid *C. perfringens* bepaald, als indicator voor sporenvormende bacteriën. Het advies dat wordt uitgebracht is gebaseerd op het struviet van de rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) van Amersfoort; Amsterdam-West; Apeldoorn; Land van Cuijk; 's-Hertogenbosch en Tiel. De resultaten van dit onderzoek kunnen gebruikt worden

als stap richting het opzetten van een kwaliteitssysteem om struviet met een constante kwaliteit te produceren.

Aan de hand van deze doelstelling is de volgende hoofdvraag opgesteld: Op welke wijze kan struviet geproduceerd worden met een constante bacteriologische kwaliteit dat voldoet aan een toekomstige norm, gebaseerd op de STRUBIAS criteria?

Om deze hoofdvraag te beantwoorden zijn de volgende onderzoeksvragen opgesteld:

1. Hoe ziet het struviet productieproces op de verschillende onderzoekslocaties eruit?
2. Welke methode is geschikt om *E. coli* zowel in het proces als bij de opslag van struviet te meten?
3. Hoe verhoudt de *E. coli* overleving zich binnen het struviet productieproces en tussen de verschillende onderzoekslocaties?
4. Is het mogelijk door middel van opslagomstandigheden van het struviet, de concentratie *E. coli* op het struviet te verlagen?
5. Hoe verhoudt de hoeveelheid *C. perfringens* zich tussen de verschillende onderzoekslocaties?

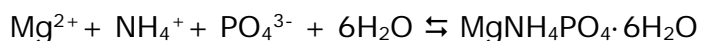
Deze onderzoeksvragen zijn beantwoord door middel van literatuuronderzoek en verschillende experimenten. Deze experimenten zijn onderbouwd met literatuur en de expertise van deskundigen, zoals laboratoriumbeheerders en voedingsmiddelentechnologen. De resultaten van ieder experiment zijn gebruikt voor het opzetten van het opvolgende experiment. De gebruikte methode is per experiment verder toegelicht.

2. Struviet

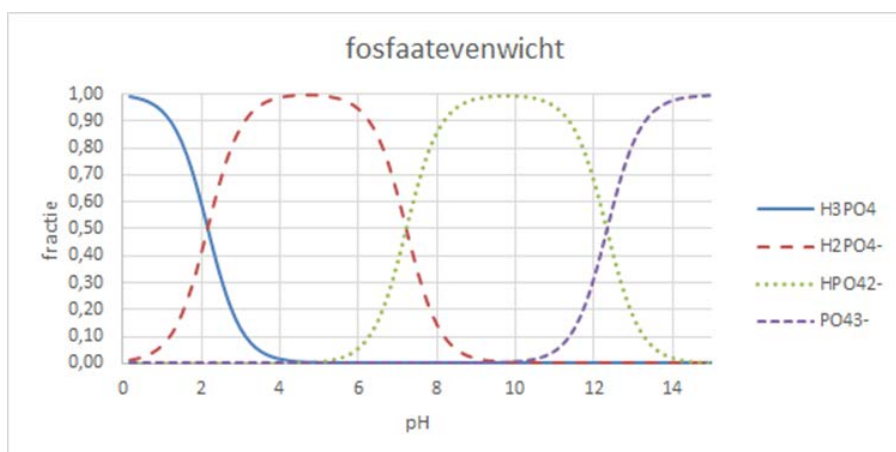
In dit hoofdstuk wordt de achtergrondinformatie over struviet beschreven. Dit hoofdstuk bestaat uit de volgende paragrafen: wat is struviet; en hoe wordt struviet geproduceerd op een RWZI.

2.1 Wat is struviet?

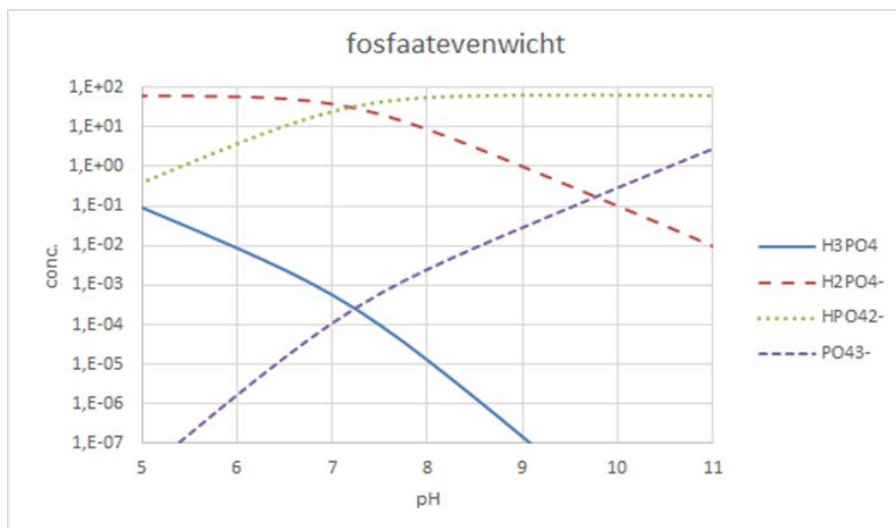
Struviet is een kristal bestaande uit de volgende mineralen: magnesium (Mg^{2+}), ammonium (NH_4^+) en fosfaat (PO_4^{3-}), en dit wordt gevormd volgens de volgende reactievergelijking:



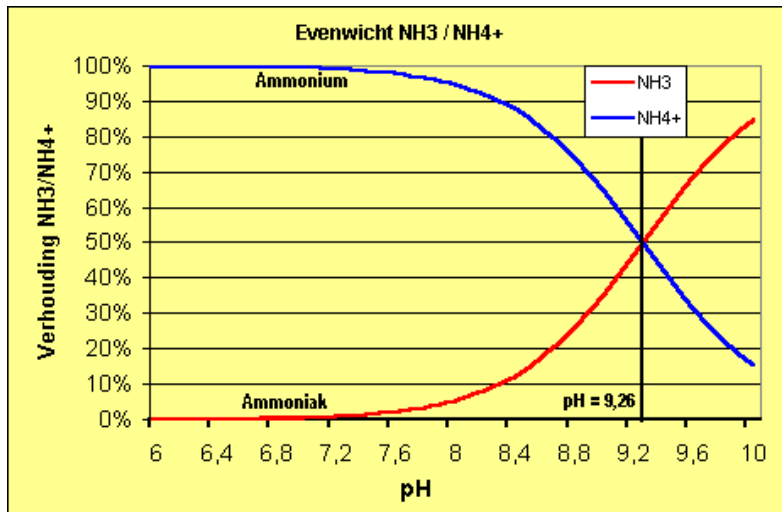
De vorming van struviet is afhankelijk van de pH, aangezien de vorm waarin ammonium en fosfaat aanwezig zijn, pH afhankelijk is. Het fosfaat evenwicht is weergegeven in figuur 1a en 1b. In figuur 1a is de fractie weergegeven van de verschillende fosfaat vormen bij bepaalde pH waarden. Hierin is te zien dat fosfaat vooral in de juiste vorm aanwezig is bij een pH boven de 10,5. In figuur 1b is de concentratie van de verschillende fosfaat vormen weergegeven bij bepaalde pH waarden. Hierin is te zien dat ook bij een lagere pH PO_4^{3-} voorkomt, maar enkel in een lage concentratie. Het ammonium evenwicht is weergegeven in figuur 2. Het ammonium is in de juiste vorm aanwezig bij een pH tot 10 (AqualInfo, z.d.). In de praktijk wordt struviet geproduceerd bij een pH rond de 8,0 (STOWA, 2012).



Figuur 1a: fosfaatevenwicht



Figuur 1b: fosfaatevenwicht



Figuur 2: ammonium evenwicht (AqualInfo, z.d.)

Deze neerslag vindt plaats in de verwerking van afvalwater. Dit proces kan ongewenst plaatsvinden in de leidingen van de afvalwaterzuivering waar het verstoppingen veroorzaakt. Of het kan gecontroleerd plaatsvinden in een reactor, waar het ook gewonnen kan worden, en afgezet kan worden als grondstof in de kunstmestproductie (STOWA, 2012).

Het struviet kan in verschillende vormen, kleuren en maten kristalliseren, onder andere bruine en witte piramidevormige kristallen, plaatjes, naaldjes en balletjes. Tijdens deze reactie zijn de volgende parameters sturend: oververzadiging van fosfaat, ammonium en magnesium; pH en temperatuur (STOWA, 2012).

Met behulp van het programma Visual Minteq is berekend dat de maximale geleidbaarheid van struviet 332 $\mu\text{S}/\text{cm}$ is bij een pH van 8,7. De geleidbaarheid van drinkwater ligt tussen 300-800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Logisticon, z.d.). Dit betekent dat struviet een slecht oplosbaar zout is, aangezien er weinig ionen oplossen in het water. De oplosbaarheid hiervan is 169 mg/l bij 25 °C (Bhuiyan et al., 2007).

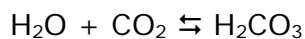
2.2 Hoe wordt struviet geproduceerd op een RWZI?

Er zijn meerdere technieken om struviet te produceren uit afvalwater. De vier technieken die toegepast worden bij de te onderzoeken RWZI's zijn in tabel 1 weergegeven. In deze paragraaf worden de vier verschillende technieken kort beschreven.

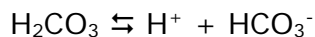
Tabel 1: gebruikte technieken struviet productie

Waterschap	RWZI	Techniek
Aa en Maas	's-Hertogenbosch	AnPhos
	Land van Cuijk	NuReSys
Rivierenland	Tiel	AnPhos
Vallei en Veluwe	Amersfoort	Pearl
	Apeldoorn	NuReSys
Waternet	Amsterdam-West	Airprex

Bij de technieken AnPhos, NuReSys en Airprex vindt CO₂ stripping plaats door middel van beluchting. CO₂ wordt door middel van beluchting verwijderd uit het water, doordat het in evenwicht wil zijn met de concentratie die aanwezig is in de lucht. CO₂ vormt samen met water koolzuur volgens onderstaande reactievergelijking:



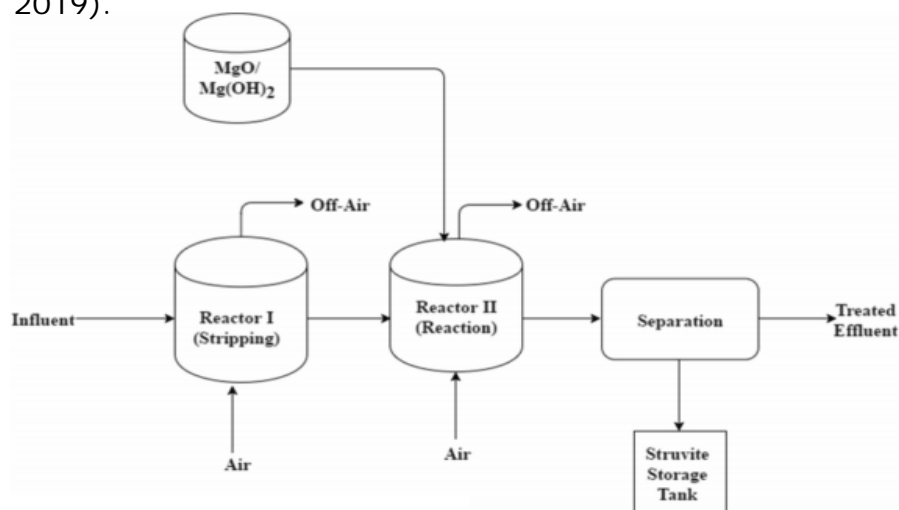
Dit koolzuur is weer in evenwicht met de concentratie waterstofcarbonaat, waarbij een H⁺ ion gevormd wordt en dit leidt tot verzuring. Dit is weergegeven in onderstaande reactievergelijking:



Kortom als minder CO₂ in het water aanwezig is zal er minder koolzuur aanwezig zijn en hierdoor ook minder H⁺ ionen, doordat beide evenwichten naar links verschuiven. Hierdoor stijgt de pH door middel van beluchting.

AnPhos

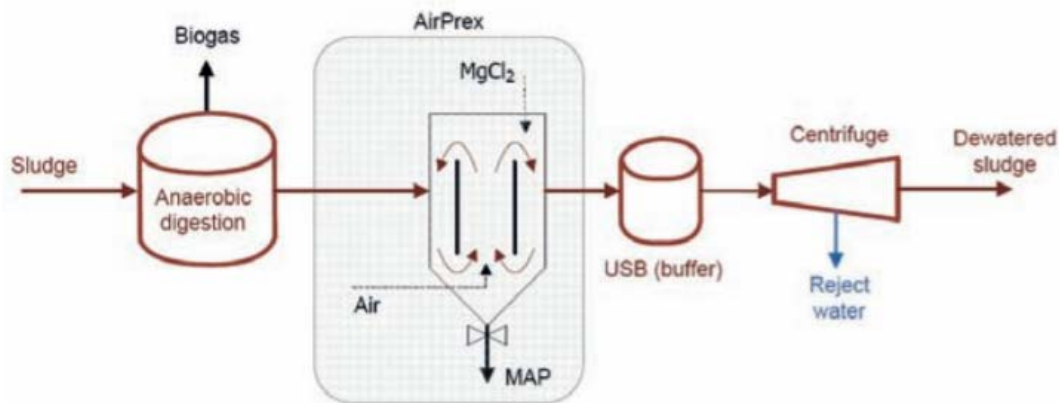
Het proces bestaat uit twee gescheiden reactoren: de eerste reactor wordt gebruikt voor de beluchting van het afvalwater (CO₂ strippen) en de tweede reactor wordt gebruikt voor de kristallisatie van struviet door het toevoegen van magnesiumhydroxide (Mg(OH)₂). In figuur 3 is het proces weergegeven (Ghosh et al., 2019).



Figuur 3: AnPhos processchema (Ghosh et al., 2019).

Airprex

Het Airprex systeem is een proces ontwikkeld door het Berliner Wasserbetriebe. En heeft als hoofddoel het ontwateringsproces van vergist slib te optimaliseren en produceert tijdens dit proces ook struviet. Het proces vindt plaats in een continuous stirred-tank reactor (CSTR-reactor). Het proces is schematisch weergegeven in figuur 4 (Ghosh et al., 2019), (STOWA, 2012).

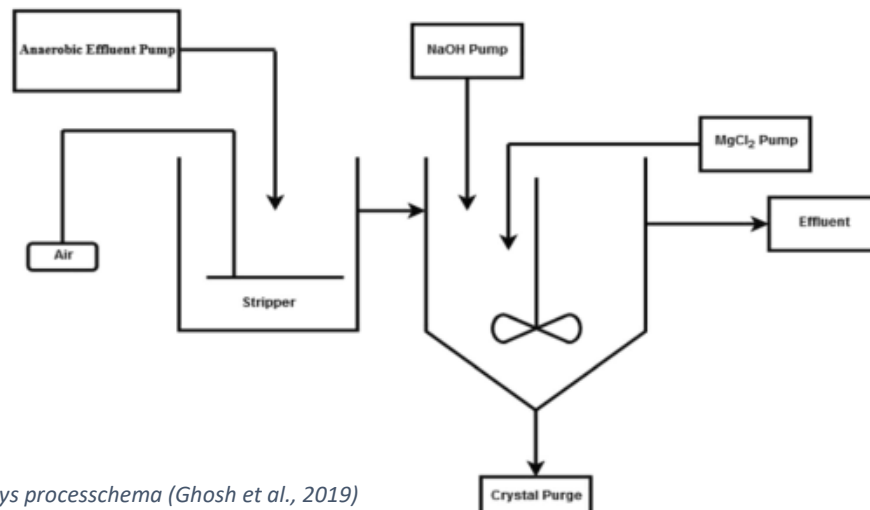


Figuur 4: Airprex processchema (STOWA, 2012).

Te zien is dat de Airprex reactor gevoed wordt met vergist slib uit een anaerobe vergistingstank. Aan deze stroom wordt magnesiumchloride ($MgCl_2$) gedoseerd voordat het in de Airprex reactor terecht komt. In het Airprex systeem wordt door de beluchting in het midden van de reactor de CO_2 gestript, hierdoor zal de pH stijgen en zal het neerslaan van struviet kunnen plaatsvinden. Door middel van deze beluchting wordt tevens het slib gecirculeerd in de reactor. Het neergeslagen struviet wordt constant geogst aan de onderkant van de reactor. Dit struviet wordt op RWZI Amsterdam-West gewassen met bedrijfswater voordat het opgeslagen wordt in een container (Ghosh et al., 2019), (STOWA, 2012).

NuReSys

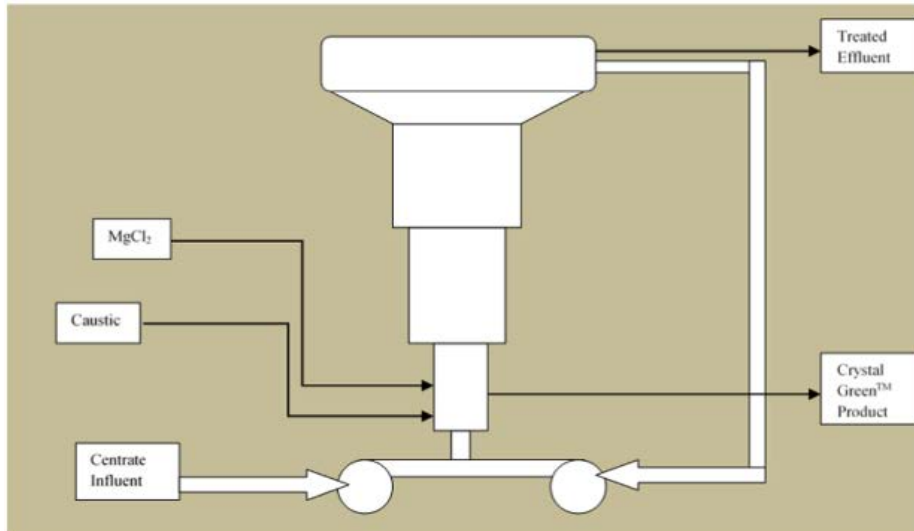
NuReSys (Nutrient Recycle Systems) is een systeem waar batchgewijs struviet geproduceerd wordt. De pH wordt tussen de 8,5 en 8,7 gehouden door het toevoegen van NaOH. Het systeem kan zowel voor centraat als slib gebruikt worden. Op RWZI Land van Cuijk en Apeldoorn wordt centraat gebruikt als voeding voor de struviet reactor. In figuur 5 is het proces weergegeven (Ghosh et al., 2019).



Figuur 5: NuReSys processchema (Ghosh et al., 2019)

Pearl

Het Pearl proces van Ostara is ontworpen door de University of British Columbia. En wordt hoofdzakelijk gebruikt voor het verwijderen van fosfaat uit stromen als centraat uit slibontwatering. Dit proces vindt plaats in een Pearl reactor en is schematisch weergegeven in figuur 6 (Ghosh et al., 2019).



Figuur 6: Pearl processchema (Ghosh et al., 2019).

In de Pearl reactor wordt struviet gevormd in een up-flow-fluidized bed reactor. Voordat de te behandelen stroom in deze reactor terecht komt wordt magnesiumchloride ($MgCl_2$) gedoseerd. Daarnaast kan om de pH te sturen natronloog ($NaOH$) gedoseerd worden (in figuur 6 weergegeven als "caustic"). Als gevolg van het up-flow systeem worden bolvormige struviet korrels geproduceerd. Bovenin de struviet reactor zijn de korrels nog klein, deze zullen naarmate ze aangroeien bezinken. Onderin de reactor worden de bezonken grote korrels geoogst (Ghosh et al., 2019).

3. *Escherichia Coli*

Escherichia Coli ofwel *E. coli* is een gramnegatieve staafvormige bacterie en is familie van Entrobacteriaceae. Van nature komt de bacterie voor in de darmen van warmbloedige dieren zoals mensen (RIVM, 2018). *E. coli* wordt vaak als indicatororganisme gebruikt voor het mogelijk aanwezig zijn van pathogenen.

Het is een facultatief anaerobe bacterie, wat betekent dat het micro-organisme zowel met als zonder zuurstof kan overleven (WFC, z.d.). *E. coli* groeit echter het beste in een aeroob milieu, aangezien door het gebruik van zuurstof bij de afbraak van voedingsstoffen meer energie gewonnen kan worden. Wanneer *E. coli* terecht komt in een anoxisch milieu zal het zijn metabolisme aanpassen. In dit proces wordt zuurstof vervangen met een andere elektronenacceptor als nitraat (NO_3^-). Tijdens dit proces komt iets minder energie vrij en zal de groei iets verminderen. Wanneer er geen elektronenacceptoren aanwezig zijn zal de cel overgaan tot gisting. Dit proces levert veel minder energie op dan anaerobe respiratie (Wiersema, I., z.d.-a).

De mate van overleving van *E. coli* is afhankelijk van een aantal factoren, zoals temperatuur, pH, wateractiviteit en beschikbare voedingsstoffen. De maximale groei van *E. coli* vindt plaats tussen 36-40 °C met een optimum van 37 °C (Albrecht, J. A., z.d.) (Doyle et al., 1984). De bacterie kan echter overleven in een range van 4-45 °C, waar afsterving sneller zal gaan bij hoge temperaturen dan lage temperaturen (Jang et al., 2017).

Daarnaast is de zuurtegraad (pH) van de omgeving ook zeer belangrijk voor de overleving van *E. coli*. De minimale pH voor de groei van *E. coli* is 4,4 met een optimale groei bij 7,0. Echter kan *E. coli* overleven in de range van 3,8-8,5 (Lieverloo et al., 2018). In een onderzoek waarin de overleving van *E. coli* in bodemmonsters is bepaald, is gevonden dat *E. coli* beter kan overleven bij lage pH waardes dan relatief hoge pH waardes (Jang et al., 2017)(Lieverloo et al., 2018).

De beschikbaarheid van water is ook een belangrijke factor voor de overleving van *E. coli*. Deze beschikbaarheid wordt gemeten door middel van wateractiviteit (a_w), de laagste waardes waar *E. coli* bij kan groeien is 0,95, waarin de maximale a_w -waarde 1 is (Lieverloo et al., 2018). Dit laat zien dat de wateractiviteit cruciaal is voor *E. coli* overleving.

De beschikbaarheid van voedingsstoffen als koolstof, stikstof en fosfor zijn belangrijk voor *E. coli* groei en overleving. *E. coli* kan verschillende vormen van organisch koolstof afbreken waardoor het flexibel is voor zijn overleving (Jang et al., 2017). Uit het onderzoek van Huygens et al. blijkt dat neergeslagen fosfaat-zouten met een laag gehalte aan organisch stof als struviet, ook een lage concentratie pathogenen bevatten. Dit kan betekenen dat de overleving en zeker groei van *E. coli* op struviet mogelijk geremd worden door de beschikbaarheid van voedingsstoffen (Huygens et al., 2019).

Bovenstaande parameters hebben individueel effect op de overleving van *E. coli*. Echter zal de combinatie van de parameters samen een ander beeld opleveren

van de mate waarin *E. coli* kan overleven en groeien (hurdle effect). Mede hierdoor is de overleving en groei van *E. coli* op struviet momenteel niet bekend.

***E. coli* in de bodem**

E. coli kan van nature in de bodem voorkomen door onder andere het toepassen van dierlijke mest op landbouwgrond. Afhankelijk van het type mest dat gebruikt wordt is gemiddeld $1,4 \cdot 10^6$ kve *E. coli*/gram aanwezig in de mest (Morgenschweis, 2015). Uit onderzoek is gebleken dat *E. coli* kan overleven op de aanwezige voedingsstoffen in de bodem. Na 24 dagen is een lichte daling geconstateerd in de hoeveelheid *E. coli*. Echter is bekend dat *E. coli* tot 200 dagen kan overleven in de bodem onder natuurlijke omstandigheden. En tot 500 dagen onder koude omstandigheden, aangezien de cel onder deze omstandigheden in een 'slapende' staat terecht komt (Nandakafle et al., 2018) (Biocunus, z.d.).

***E. coli* in rioolwaterzuivering**

Het influent dat een rioolwaterzuivering (RWZI) binnengaat bevat 10^3 - 10^7 kve *E. coli*/ml (Grinten van der, et al., 2017). Binnen de zuivering van het rioolwater zal het gehalte van deze bacteriën niet significant veranderen aangezien *E. coli* onder zowel aerobe als anoxische en anaerobe omstandigheden kan overleven. De vergisting van het slib vindt plaats onder anaerobe omstandigheden, met temperaturen verschillend van 35 °C (mesofiele vergisting) of 55 °C (thermofiele vergisting). Mesofiele vergisting zal geen negatieve effecten hebben op de overleving van *E. coli*. Thermofiele vergisting zal dit wel hebben aangezien de maximale overleving temperatuur van *E. coli* 45 °C is. Na het vergisten wordt het slib ingedikt, in deze stap zal de *E. coli* grotendeels met het slib afgevoerd worden als slibkoek. Vervolgens wordt dit slib extern verbrand.

4. *E. coli* overleving bij verschillende struviet productieprocessen

Dit experiment geeft inzicht in de hoeveelheid *E. coli* en die aanwezig is in het eindproduct en tijdens de processtappen voor de vorming van struviet.

4.1. Methode

Dit is onderzocht door op locatie, op verschillende plaatsen in en rondom het struviet productieproces, een steekmonster te nemen en hiervan de hoeveelheid *E. coli* te bepalen. Dit is uitgevoerd op de locaties:

- RWZI Land van Cuijk;
- RWZI 's-Hertogenbosch;
- RWZI Apeldoorn;
- RWZI Amersfoort.

Nadat de monsters genomen zijn, zijn deze koel bewaard om verandering van biologische activiteit te beperken. Bij de bovengenoemde vier RWZI's zijn 4 of 5 monsters genomen. De volgende monsters zijn genomen op iedere locatie: slib (voor vergisting), uitgegist slib, centraat en vers struviet. Wanneer op locatie filtraat wordt verwerkt binnen de struviet productie is dit monster ook meegenomen in het onderzoek.

De volgende RWZI's zijn niet meegenomen, omdat de struviet installatie niet draaide, waardoor geen vers monster genomen kon worden.

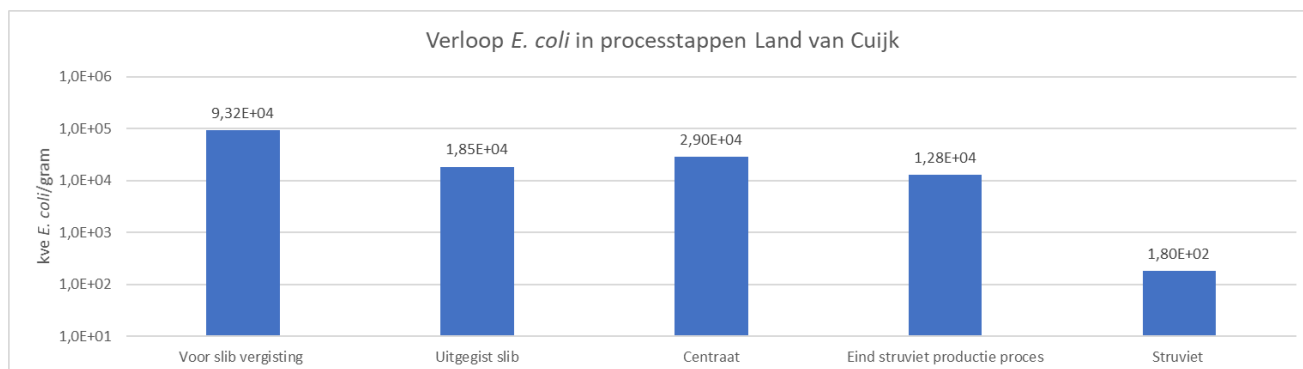
- RWZI Tiel;
- RWZI Amsterdam-west.

***E. coli* bepalen**

Voor de bepaling van *E. coli* is 20 gram van het monster genomen en 180 ml PFZ-vloeistof (Pepton fysiologisch zout, 0,9% NaCl, 1% pepton), dit is een vloeistof waar micro-organismen beter in kunnen overleven dan water (verdunding van 10x) (Wiersema, I., z.d.). Dit is door middel van stomacheren gehomogeniseerd. *E. coli* is bepaald volgens ISO 16649-2, "*Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Horizontale methode voor de bepaling van β -glucuronidase-positieve *E. coli* - Deel 2: Bepaling van het koloniegetal bij 44 °C met behulp van 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide.*" Tijdens het experiment is gebruikt gemaakt van een TBX-voedingsbodem (Tryptone Bile X-glucuronide) en hierop is 1 ml van de homogene oplossing gepipetteerd. De benodigde verdunningsreeks is tijdens het experiment nader bepaald. Deze verdunningen zijn in duplo ingezet. TBX-voedingsbodems zijn hiervoor gebruikt, omdat dit selectief is voor *E. coli* (Oxoid, z.d.). In plaats van het inzetten van de platen bij 44 °C, zoals beschreven in de ISO norm, is ervoor gekozen om het in te zetten bij 37 °C. Hiervoor is gekozen, omdat dit de optimale temperatuur is voor *E. coli* om te groeien (Doyle et al., 1984). Het afvalwater heeft een temperatuur tussen de 8 en de 20 °C, afhankelijk van het seizoen (Hartman et al., 2015). Hierdoor kan een vals negatieve meting ontstaan als de kweektemperatuur boven het optimum van *E. coli* ligt. Na 18-24 uur zijn de petrischalen uit de broedstoof gehaald en de kolonies geteld. Voor een statistisch betrouwbaar resultaat zijn enkel de platen meegenomen waar tussen de 10 en 150 kolonies geteld zijn (Dijk et al., 2015).

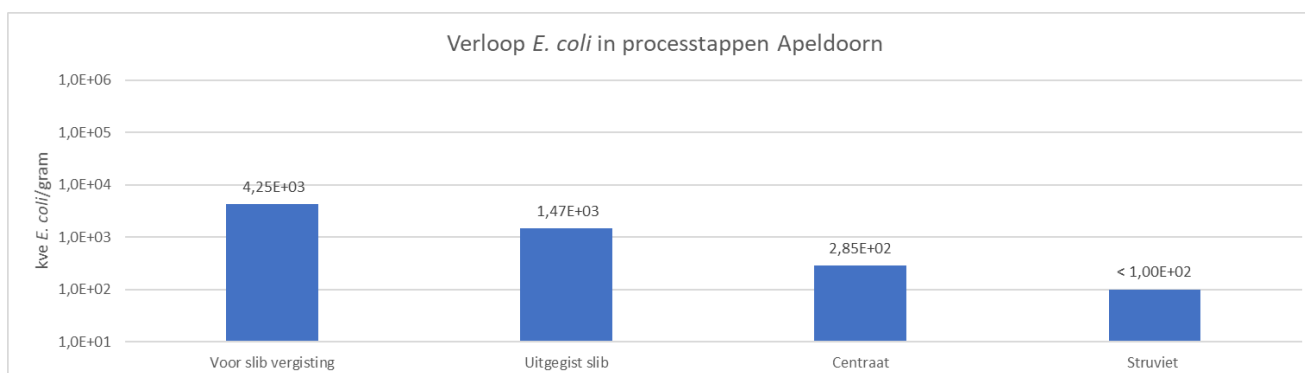
4.2. Resultaten

Onderstaand zijn de resultaten weergegeven van het aantal *E. coli* bij verschillende processtappen bij vier RWZI's. De ruwe data van het experiment is terug te vinden in bijlage 1.



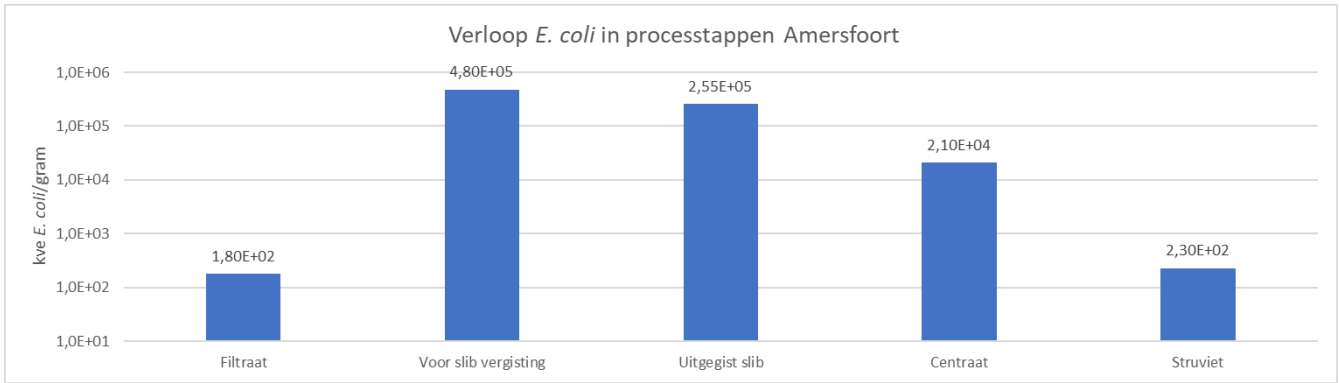
Figuur 7: verloop *E. coli* in processtappen RWZI Land van Cuijk

In bovenstaande figuur 7 zijn de gemeten hoeveelheden aan *E. coli* weergegeven. Hierin is te zien dat de hoeveelheid aan *E. coli* gedurende het proces boven $1 \cdot 10^4$ kve/gram ligt en in het gevormde struviet $1,80 \cdot 10^2$ kve/gram. Het monster "Eind struviet productieproces" is genomen voordat het water van het geproduceerde struviet wordt gescheiden.



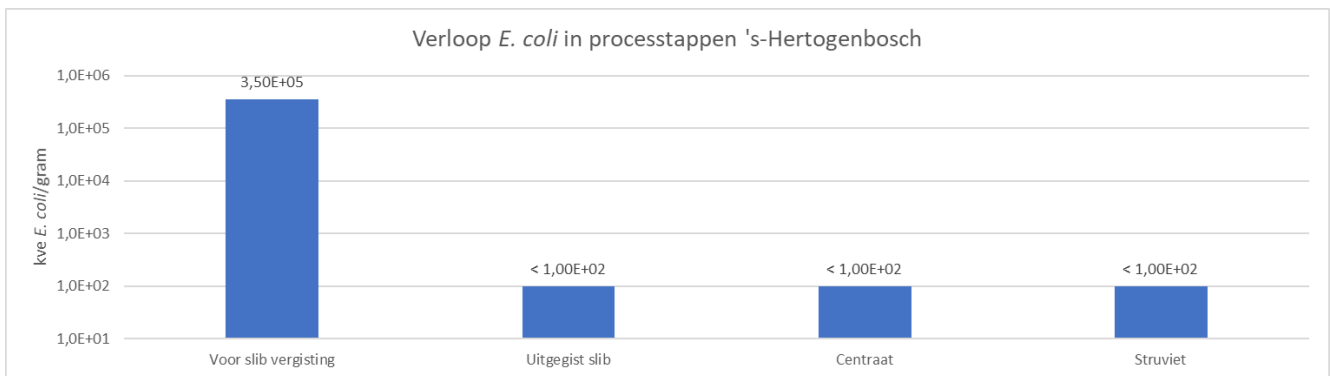
Figuur 8: verloop *E. coli* in processtappen RWZI Apeldoorn

In bovenstaande figuur 8 is de gemeten hoeveelheden aan *E. coli* weergegeven. Hierin is te zien dat de hoeveelheid aan *E. coli* gedurende het proces boven $1 \cdot 10^4$ kve/gram ligt en in het gevormde struviet < 100 kve/gram (onder meetbereik, er zijn 0 kolonies geteld bij verdunning -1).



Figuur 9: verloop *E. coli* in processtappen RWZI Amersfoort

In bovenstaande figuur 9 is de gemeten hoeveelheden aan *E. coli* weergegeven. Het filtraat, afkomstig vanuit een zeefbandpers voorafgaand aan de slibvergisting, bevat $1,80 \cdot 10^2$ kve/gram *E. coli*. Dit filtraat wordt niet vergist, maar wordt evenals het centraat (waterfractie afkomstig uit slibontwatering), verwerkt als voeding van de Pearl reactor. Het aantal *E. coli* in het gevormde struviet is $2,3 \cdot 10^2$ kve/gram.



Figuur 10: verloop *E. coli* in processtappen RWZI 's-Hertogenbosch

In bovenstaande figuur is te zien dat de hoeveelheid aanwezig *E. coli* na de thermofiele vergisting van 53 °C verminderd wordt van $3,5 \cdot 10^5$ kve/ gram tot < 100 kve/g (onder meetbereik, er is 1 kve/g geteld bij verdunning -1). Bij de opvolgende monsters is geen *E. coli* meer op de plaat aangetroffen.

4.3. Discussie

Aan de hand van dit experiment is gebleken dat het aantal *E. coli* in vers geproduceerd struviet niet boven $2,30 \cdot 10^2$ kve/gram uitkomt. Deze metingen zijn op de volgende zuiveringen uitgevoerd: RWZI Land van Cuijk, Apeldoorn, Amersfoort en 's-Hertogenbosch. Aangezien deze locaties respectievelijk NuReSys (Land van Cuijk en Apeldoorn), Pearl en AnPhos in bedrijf hebben zullen deze gehalten *E. coli* zich ook voordoen op deze locaties. Het gehalte aan *E. coli* voor RWZI Apeldoorn en Amersfoort neemt geleidelijk af vanaf de slib vergisting tot het geproduceerde struviet. Aangezien *E. coli* grotendeels aanwezig zal zijn in de waterfractie (Grinten van der, et al., 2017). Dit is na de slibontwatering het centraat, en in de struviet reactor de waterfractie die afgevoerd wordt naar de Demon of direct de biologische zuivering in. Te zien is dat het aantal *E. coli* op RWZI 's-Hertogenbosch in het slibvergisting proces afneemt van $3,50 \cdot 10^5$ kve/gram tot <100 kve/gram (onder meetbereik). Op deze locatie wordt gebruik gemaakt van een thermofiele vergisting dat plaatsvindt bij $53 \text{ }^\circ\text{C}$ gedurende 18 dagen. Aangezien de maximale temperatuur voor de overleving van *E. coli* $45 \text{ }^\circ\text{C}$ is zullen deze organismen in dit proces sterven. Deze vergelijkbare afname is niet te zien bij de RWZI's die gebruik maken van mesofiele vergisting (Land van Cuijk, Amersfoort en Apeldoorn). De resultaten van RWZI Land van Cuijk laten zien dat *E. coli* tijdens het struviet productieproces niet afsterft. Wel is de het aantal *E. coli* op het struviet met een factor 100 lager nadat het afgescheiden is van de waterfractie.

4.4. Conclusie

Uit dit experiment kan geconcludeerd worden dat het aantal *E. coli* in vers struviet bij de vier onderzochte RWZI's onder $3 \cdot 10^2$ kve/gram is. Dit betekent dat deze resultaten aan de STRUBIAS norm voor *E. coli*, onder de 1000 kve/gram, zouden voldoen. Echter zal in Nederland waarschijnlijk een strengere norm voor *E. coli* gehanteerd gaan worden, wat betekent dat een methode onderzocht moet worden om het aantal *E. coli* op struviet te verlagen. Verder kan geconcludeerd worden dat het vergisten van slib bij een temperatuur van boven de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ervoor zorgt dat alle *E. coli* sterft. Hierdoor is de hoeveelheid *E. coli* in het geproduceerde struviet nagenoeg nul.

5. Eigenschappen struviet monsters

Tijdens dit experiment is de mate waarin pathogenen kunnen overleven op verschillende struviet monsters onderzocht. Hiervoor zijn de volgende parameters onderzocht: wateractiviteit (a_w), zuurtegraad (pH), geleidbaarheid (EC). Voor deze parameters is gekozen, omdat dit belangrijke parameters zijn voor de overleving van organismen. Verder is de hypothese gesteld dat de a_w -waarde van het struviet te laag is voor de meeste micro-organismen om te kunnen overleven (Jong de et al., 2019).

5.1. Methode

In dit experiment is van iedere te onderzoeken zuivering een struviet monster genomen (RWZI Amersfoort, Amsterdam-West, Apeldoorn, Land van Cuijk, 's-Hertogenbosch en Tiel). De monsters zijn indien mogelijk van vers struviet genomen en bewaard in afgesloten bakjes met een inhoud van 150 ml. Wanneer het productieproces bestaat uit een drogingsstap is er ook een monster genomen van het gedroogde product. Deze monsters zijn bij een temperatuur van 20 °C bewaard.

Metten van a_w -waarde

De a_w -waarde staat voor de wateractiviteit in een product, dit is een maat voor de hoeveelheid vrij water in het product. Het is een dimensie-loze eenheid en bestaat uit een waarde tussen 0 en 1, waarbij met een waarde dicht bij de 1 veel vrij water aanwezig is. De a_w -waarde kan gebruikt worden om de groeipotentie van micro-organismen te bepalen. Zo is het voor micro-organismen lastig om te groeien bij een lage a_w -waarde. Wanneer de a_w -waarde lager wordt zullen minder type micro-organismen kunnen groeien of zelfs zullen afsterven. De a_w -waarde wordt bepaald door de relatieve luchtvochtigheid van de lucht rondom het product te meten. Wanneer deze waarde gedurende vijf minuten stabiel is, is het water van het product in evenwicht met de lucht (Nutrilab, z.d.). De a_w -waarde van het struviet is bepaald volgens de norm: ISO 18787:2017, "Voedingsmiddelen-Bepaling van wateractiviteit." De a_w -waarde is bepaald met de Novasina Labmaster Standaard in het microbiologie laboratorium van HAS Hogeschool. Deze is eerst gekalibreerd met de kalibratiezouten, zodat deze geschikt is om de a_w -waarde van struviet te bepalen. De a_w -meter is gebruikt op de stand [average] en voor ieder monster in enkelvoud uitgevoerd.

Metten van pH en geleidbaarheid

Daarnaast zijn zowel de pH en geleidbaarheid (EC) van ieder monster in enkelvoud gemeten. pH is een belangrijke parameter in de mate waarin micro-organismen kunnen overleven en groeien. De geleidbaarheid van het monster laat zien in welke mate struviet op kan lossen. Aangezien het monster in een vaste vorm aanwezig is, is het opgelost in gedemineraliseerd water. Dit is uitgevoerd in een verhouding 1 deel monster en 5 delen gedemineraliseerd water. Deze methode is afgeleid vanuit de norm: ISO 10390:2005, "Bodem- Bepaling van de pH waarde." Voorafgaand aan de pH meting is de pH electrode geijkt. Voor zowel de pH electrode (HACH PHC101-01) als de EC electrode (HACH CDC401-01) is een multimeter gebruikt (HACH HQ40D), zodat beide parameters gelijktijdig gemeten zijn.

5.2. Resultaten

Bij dit experiment is de a_w -waarde, de pH, en de EC van de struviet monsters bepaald. Ook is informatie verkregen over de verschillende struviet productieprocessen van de RWZI's die deelnemen aan dit onderzoek. Deze resultaten zijn weergegeven in tabel 2. De foto's die genomen zijn van het struviet zijn weergegeven onder tabel 2. Uit deze resultaten is gebleken dat de a_w -waarde van alle verse struviet monsters dicht bij de 1 liggen. De pH van deze monsters ligt tussen de 8,4 en de 9,3. De EC ligt tussen de 240 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en de 2100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en wijkt dus in de meeste gevallen niet ver af van de theoretische EC waarde van 332 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Deze waarde is berekend door middel van Visual Minteq, welke nader beschreven staat in bijlage 2. Bij het struviet waar significant hogere waardes gemeten zijn dan de theoretische waarde is het struviet monster waarschijnlijk vervuild met andere stoffen als Na^+ en Cl^- .

Tabel 2: resultaten experiment inventarisatie struviet

Monster	Monsterlocatie	Foto	Struviet productie proces	Te verwerken stroom	Mg toevoeging	a _w -waarde	pH	EC (µS/cm)	Opmerkingen monster
RWZI Tiel	Voor schoefpers	1	AnPhos	Centraat	Mg(OH) ₂	0,984	8,54	994	Installatie stond maand stil
RWZI Amsterdam-west	Eindproduct	2	AirPrex	Slib	MgCl ₂	0,977	8,81	434	Installatie staat 2 weken stil
RWZI Land van Cuijk	Eindproduct	3	NuReSys	Centraat	MgCl ₂	0,984	8,91	376	Vers monster
RWZI 's-Hertogenbosch	Eindproduct	4	AnPhos	Centraat	Mg(OH) ₂	0,983	8,60	548	Vers monster
RWZI Apeldoorn (1)	Vers product	5	NuReSys	Centraat	MgCl ₂	0,967	8,69	2076	Vers monster
RWZI Apeldoorn (2)	Eindproduct	6	NuReSys	Centraat	MgCl ₂	0,642	9,22	263	Gedroogd in buitenlucht
RWZI Amersfoort (1)	Vers product	7	Pearl	Centraat+ filtraat	MgCl ₂	0,983	9,15	240	Vers monster
RWZI Amersfoort (2)	Eindproduct	8	Pearl	Centraat+ filtraat	MgCl ₂	0,353	8,48	421	Gedroogd onder 70 °C

Onderstaand zijn de foto's van de verschillende monsters struviet weergegeven in afbeelding 1, welke vermeld staan in bovenstaande tabel. Te zien is dat het product van de AnPhos reactoren (foto 1&4) het fijnste is. Het product van RWZI Land van Cuijk (foto 3) is vergelijkbaar met het uiterlijk van zand. Struviet vanuit de Airprex reactor (foto 2) bestaat uit grote kristallen. Tussen foto 5 & 6 en 7 & 8 zijn de verschillen weergegeven tussen een nat en droog product. Het struviet van RWZI Apeldoorn is groter dan dat van RWZI Land van Cuijk, terwijl beide RWZI's gebruik maken van een NuReSys reactor. Het struviet afkomstig uit de Pearl reactor heeft de grootste korrels.

Foto 1:



Foto 2:



Foto 3:



Foto 4:



Foto 5:



Foto 6:



Foto 7:

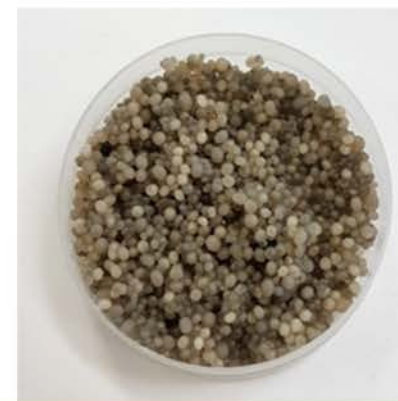


Foto 8:



Afbeelding 1: foto's struviet monsters van verschillende RWZI's

5.3. Discussie

Voorafgaand aan dit onderzoek was de verwachting dat de a_w -waarde van het struviet te laag was voor de overleving van pathogenen, in dit geval *E. coli*. Een lage a_w -waarde voor een zout resulteert namelijk in een hoge ionenconcentratie. Tijdens dit experiment is gebleken dat de a_w -waarde van alle vers genomen monsters tussen 0,967- 0,984 liggen. De minimale a_w -waarde voor de groei van *E. coli* is 0,95; dit betekent dat de eventueel aanwezige *E. coli* op het struviet kan overleven. Deze a_w -waarde kan verlaagd worden door het struviet te drogen, wat binnen de te onderzoeken RWZI's gebeurt op RWZI Amersfoort en Apeldoorn. Met een droogstap van 70 °C en respectievelijk het in de buitenlucht opslaan. Uit deze metingen is gebleken dat een verlaging haalbaar is tot ten minste 0,353 op RWZI Amersfoort en 0,642 op RWZI Apeldoorn. Deze waardes liggen beiden onder de overlevingsgrens voor *E. coli*, en zullen een afnemend effect hebben op de hoeveelheid *E. coli* op het struviet.

pH is een andere belangrijke parameter voor de overleving van *E. coli*. De gemeten pH waardes van het struviet van de onderzochte locaties verschillen van 8,48 tot 9,22. De maximale pH voor de overleving van *E. coli* is 8,5 met een optimum pH voor groei op 7,0. Dit betekent dat het struviet op alle onderzochte locaties een negatieve werking zal hebben op de overleving van *E. coli*.

De elektrische geleidbaarheid (EC) van ieder struviet monster is bepaald. Deze waardes verschillen van 240 tot 2076 $\mu\text{S}/\text{cm}$, waarin het verse struviet monster van Apeldoorn het enige monster is met een waarde boven de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Wanneer deze waarde vergeleken wordt met de EC van drinkwater wat tussen 300-800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ligt, zal deze concentratie geen negatief effect hebben op de groei/ overleving van *E. coli* (Logisticon, z.d.). Uit onderzoek van Bhuiyan et al. is gebleken dat struviet een slecht oplosbaar zout is met een oplosbaarheid van 169 mg/l bij 25 °C. Doordat struviet slecht oplosbaar is in water zal het niet snel een toxische werking hebben op de micro-organismen, als gevolg van de lage osmotische druk. De theoretisch berekende EC van struviet, 332 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ligt hoger dan de gemeten waardes van de struviet monsters RWZI Apeldoorn gedroogd (263 $\mu\text{S}/\text{cm}$) en RWZI Amersfoort vers (240 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Tijdens de opslag van kristalvormige producten als struviet kan de oplosbaarheid hiervan veranderen, waardoor de monsters in mindere mate opgelost kunnen zijn (Garcia-Ruiz et al., 2015). Waarschijnlijk waren deze monsters nog niet volledig opgelost.

De grootte van struviet korrels/ kristallen bepaalt de poriegrootte van het product. Wanneer het struviet een kleine poriegrootte heeft zal het langzamer drogen dan wanneer het een grotere poriegrootte heeft. De volgende struviet monsters hebben een oplopende poriegrootte: Tiel/ 's-Hertogenbosch, Land van Cuijk, Apeldoorn, Amsterdam-west en Amersfoort.

5.4. Conclusie

Vanuit dit experiment is gebleken dat de a_w -waarde van vers struviet, van alle onderzochte RWZI's, hoog genoeg is voor de overleving van *E. coli*. Het struviet dat gedroogd wordt (RWZI Amersfoort) of in de buitenlucht in big bags wordt opgeslagen neemt genoeg in a_w -waarde af voor de afsterving van *E. coli*. Het geproduceerde struviet van RWZI Tiel, 's-Hertogenbosch, Land van Cuijk en Amsterdam-West wordt opgeslagen in een gesloten container. Hierin zal de a_w -waarde minder snel afnemen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de manier waarop struviet opgeslagen wordt een belangrijke rol speelt in de overleving van *E. coli* op struviet.

Het struviet van RWZI Amersfoort en Amsterdam-west heeft de grootste poriegrootte en zal hierdoor sneller afnemen in a_w -waarde. Het struviet van RWZI Tiel en 's-Hertogenbosch heeft de kleinste poriegrootte en zal met de kleinste snelheid afnemen in a_w -waarde.

De pH waarde van het geproduceerde struviet ligt boven de overlevingsgrens van *E. coli*, namelijk een pH van 8,5. Wanneer dit gecombineerd wordt met een a_w -waarde lager dan 0,95 zal er een hurdle effect optreden. Hierdoor zal de afsterving sneller verlopen wanneer beide parameters individueel ook resulteren in afsterving. Aangezien struviet een slecht oplosbaar zout is, zal de zoutconcentratie geen effect hebben op de overleving van *E. coli*.

6. Effect opslag van struviet op overleving *E. coli*

Uit de inventarisatie is gebleken dat de manier van opslaan effect heeft op de a_w -waarde van het struviet. En op deze manier ook op de mate waarin *E. coli* kan overleven. In dit hoofdstuk staat beschreven hoe de overleving van *E. coli* op struviet is onderzocht voor twee opslagmethoden. Deze resultaten kunnen gebruikt worden om een eerste stap te zetten naar een kwaliteitssysteem om struviet te produceren dat constant voldoet aan de toekomstige *E. coli* criteria.

6.1. Methode

Tijdens dit experiment zijn verschillende onderwerpen onderzocht namelijk:

- Overleving van *E. coli* bij een open systeem
- Overleving van *E. coli* bij een gesloten systeem

Het experiment is twee keer uitgevoerd, de eerste keer voor het inzichtelijk krijgen van het verloop, om zo te kunnen zien of het aantal *E. coli* stijgt of daalt op het struviet en hoe snel dit ongeveer verloopt. Hierna is het experiment herhaald, maar dan met de kennis van de eerste keer voor een geschikte tijd tussen de meetmomenten en een juiste duur van het experiment.

Aangezien de overleving van *E. coli* bacteriën bepaald is, is in een steriele omgeving gewerkt. Daarnaast is het materiaal dat gebruikt is om monsters te nemen ook gesteriliseerd.

Deel 1: inventarisatie overleving *E. coli* op struviet

Dit deel van het experiment is uitgevoerd om een eerste inzicht te krijgen in het verloop van *E. coli* op struviet. Hierbij waren enkel 2 meetmomenten, dag 0 en dag 5. Voor dit onderdeel is 200 gram struviet gebruikt per pot en zijn zowel gespikede monsters, als blanco (ongespikede) monsters onderzocht. Verderop in dit hoofdstuk, onder het kopje "Monster spiken" wordt ingegaan over de methode voor het spiken. Bij de blanco monsters is in plaats van de *E. coli* rijke vloeistof dezelfde hoeveelheid aan gedemineraliseerd water toegevoegd. Voor dit experiment zijn twee typen struviet gebruikt (vers struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en vers struviet van RWZI Apeldoorn). Deze twee typen struviet verschillen in fysieke eigenschappen en is geproduceerd volgens een ander type struviet reactor: RWZI Apeldoorn beschikt over NuReSys en RWZI 's-Hertogenbosch over AnPhos. Deze productieprocessen zijn respectievelijk aanwezig op RWZI's Land van Cuijk en Tiel, hierdoor zijn op het vlak van productieprocessen vier locaties vergeleken. Op dag 5 zijn van elke pot 3 monsters genomen, welke vervolgens in duplo zijn uitgeplaat. Dit is uitgevoerd om inzicht te verkrijgen in de mate van homogenisatie van het struviet in de potten. De O-meting is in enkelvoud uitgevoerd.

Deel 2: Overleving *E. coli* op struviet bij verschillende opslagen

Dit experiment is uitgevoerd om een gedetailleerder beeld te verkrijgen van de overleving van *E. coli* op struviet. Daarnaast is deze overleving ook vergeleken tussen twee verschillende opslagen, namelijk een open pot en een gesloten pot. Zodat de overleving bepaald is voor een omgeving waarin de a_w -waarde gelijk blijft (gesloten pot) en waarin deze afneemt (open pot). Voor dit experiment is opnieuw vers struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en RWZI Apeldoorn gebruikt. De twee typen struviet is per 500 gram opgeslagen in zowel de open als gesloten pot. Om een gedetailleerder beeld te verkrijgen van de overleving zijn meer meetmomenten gebruikt dan in deel 1, namelijk dag 0, 3, 7, 10, 21 en 29. Op ieder meetmoment is zowel de a_w -waarde als de hoeveelheid *E. coli* per gram struviet gemeten. De hoeveelheid *E. coli* is bepaald volgens de methode beschreven in hoofdstuk 4.1. onder het kopje "*E. coli* bepalen" de monsters zijn in enkelvoud genomen. Aangezien uit de resultaten van deel 1 is gebleken dat de betrouwbaarheid van monstername in enkelvoud voldoende is.

Monster spiken

Voor het spiken van het monster is 1 ml *E. coli* rijk water met een concentratie van $1 \cdot 10^8$ kolonievormende eenheden toegevoegd per 100 gram struviet. Voor deze concentratie aan kve is gekozen, omdat dit de helft van de maximale concentratie is die gemeten kan worden en de verandering van *E. coli* met een hoge concentratie het snelst zichtbaar is. Dit struviet is gehomogeniseerd door het te kneden gedurende vijf minuten in een stomacherzak. Hiervan is vervolgens de a_w -waarde en de hoeveelheid *E. coli* per gram bepaald als 0-meting. De a_w -waarde is bepaald volgens de methode beschreven in hoofdstuk 5.1. onder het kopje "meten van a_w -waarde" en wordt gemeten nadat het monster gehomogeniseerd is. De hoeveelheid struviet dat gebruikt is voor de opslag experimenten is afhankelijk van de hoeveelheid meetmomenten. Aangezien 25 gram struviet benodigd is per meting en genoeg struviet moet overblijven, zodat het effect van monstername geminimaliseerd wordt. De hoeveelheid struviet waarvoor gekozen is, is per experiment verder toegelicht.

Opslag monsters en monstername

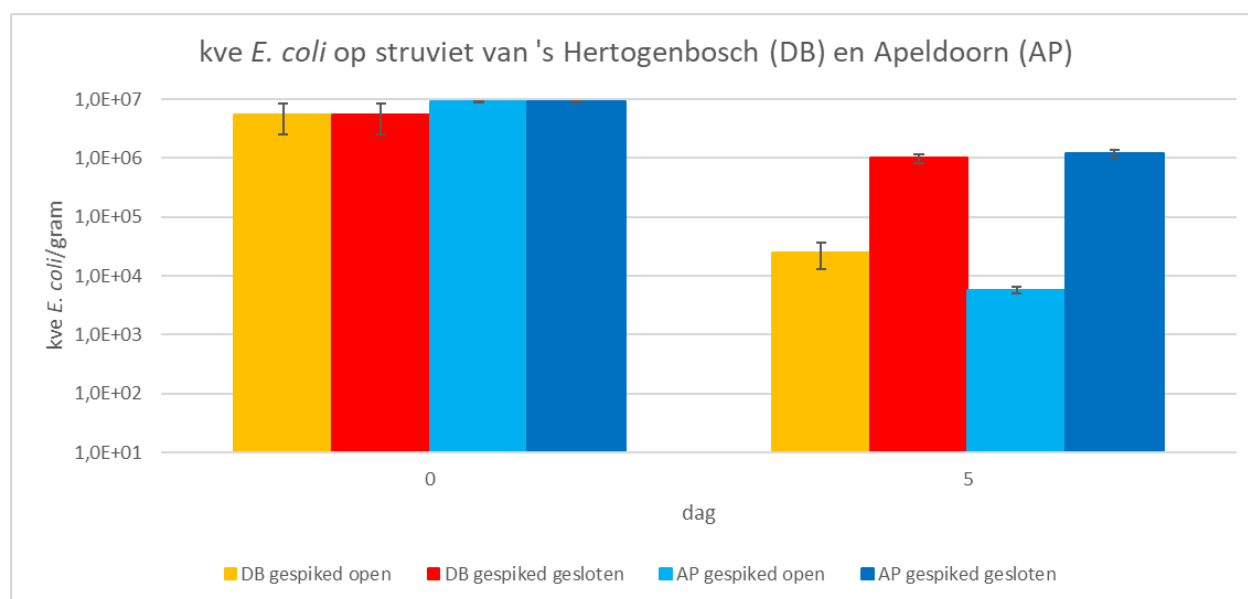
De proefopstelling is geplaatst in een broedstoof met een constante temperatuur van 20 °C, om de buitenlucht na te bootsen. In de broedstoof wordt de lucht gecirculeerd, echter wordt deze lucht niet ververst. De monstername vanuit de potten is uitgevoerd door het struviet te homogeniseren door middel van een steriele lepel. Op deze wijze is een representatief monster genomen van de gehele pot.

6.2. Resultaten

Zoals in hoofdstuk 6.1 aangegeven is dit experiment opgedeeld in 2 delen: inventarisatie van het verloop; en het verloop van *E. coli* bij verschillende opslagen. De ruwe data van het experiment is terug te vinden in bijlage 1.

Deel 1: inventarisatie van het verloop van *E. coli* op struviet

De overleving van *E. coli* op het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en RWZI Apeldoorn is voor een periode van 5 dagen onderzocht als inventarisatie op het verloop van *E. coli* op struviet. Deze resultaten zijn weergegeven in figuur 11.



Figuur 11: verloop *E. coli* op struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en Apeldoorn

In bovenstaande figuur 11 is te zien dat bij zowel de open als gesloten pot het aantal *E. coli* op het struviet is gedaald na 5 dagen. De twee open potten tonen een sterkere daling ten opzichte van de twee gesloten potten.

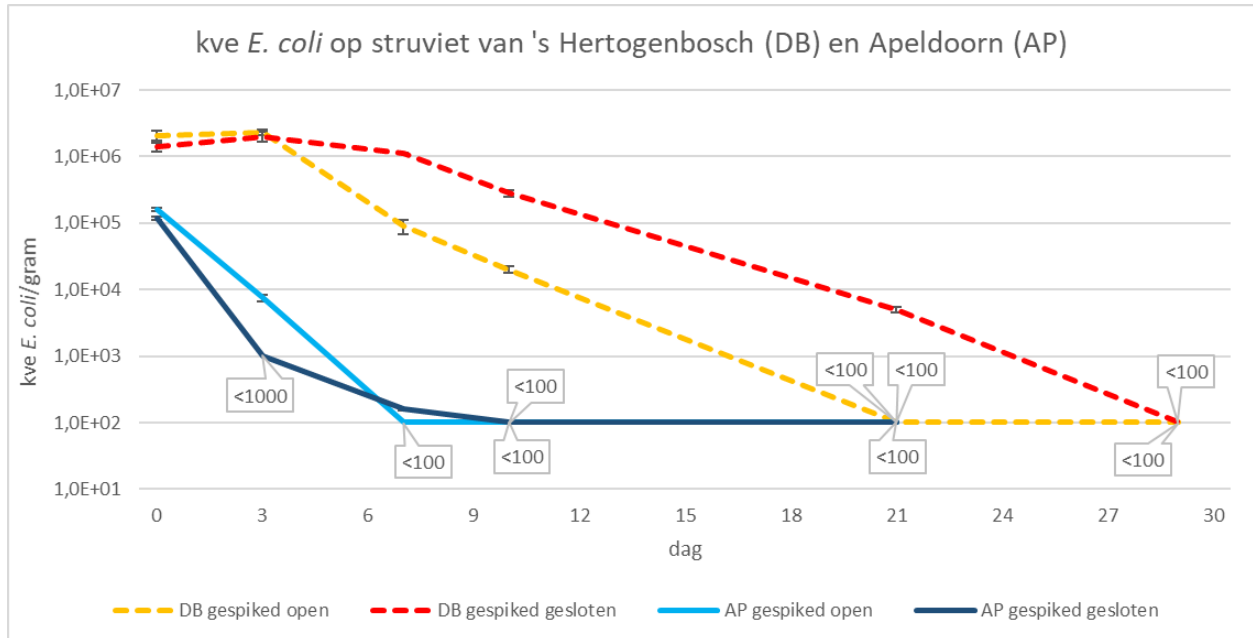
In onderstaande tabel is de a_w -waarde te zien op dag 0 en na 5 dagen. Hierin is te zien dat het struviet van RWZI Apeldoorn voor de twee open potten na 5 dagen onder de 0,85 ligt. Het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch heeft na 5 dagen nog een a_w -waarde boven de 0,94.

Tabel 3: a_w -waarde struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en Apeldoorn

Dag	a_w -waarde							
	's-Hertogenbosch				Apeldoorn			
	Blanco		Gespiked		Blanco		Gespiked	
	open	gesloten	open	gesloten	open	gesloten	open	gesloten
0	0,986	0,986	0,986	0,986	0,965	0,965	0,965	0,965
5	0,956	0,992	0,971	0,986	0,833	0,973	0,775	0,973

Deel 2: overleving *E. coli* op struviet bij open en gesloten opslag

De overleving van *E. coli* op het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en Apeldoorn is voor een periode van 29 dagen onderzocht. Deze resultaten zijn weergegeven in figuur 12. De resultaten zijn weergegeven op een logaritmische schaal, een lineair verloop in deze grafiek is in werkelijkheid een exponentieel verloop van groei of in dit geval afsterving van *E. coli*.



Figuur 12: verloop *E. coli* op struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en struviet van RWZI Apeldoorn

In bovenstaande figuur 12 is te zien dat bij zowel de open als gesloten pot het aantal *E. coli* op het struviet daalt in de loop van de tijd. De open pot toont een sterkere daling ten opzichte van de gesloten pot. Bij het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch is de eerste 2/3 dagen het aantal *E. coli* gelijk gebleven. Na deze 3 dagen is een exponentieel daling van het aantal *E. coli* waargenomen. Bij het struviet van RWZI Apeldoorn is wel vanaf de eerste dag een daling van het aantal *E. coli* zichtbaar. De procentuele afname in *E. coli* voor ieder meetpunt is weergegeven in bijlage 1.

In tabel 4 is de reductie van *E. coli* van ieder struviet monster weergegeven. Hierin is te zien dat het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch in een open omgeving sneller daalt waarop na 20 dagen een 4 log reductie (afname van factor 10000) heeft plaatsgevonden. Tegenover 29 dagen in de gesloten pot. Uit de grafiek is af te lezen dat na 18 dagen minimaal een 2 log reductie plaatsvindt, ongeacht de manier van opslaan. De reductie van *E. coli* op struviet van Apeldoorn verloopt in de eerste dagen gelijkmatig. Het struviet in een open pot heeft na 7 dagen 3 log reductie en het struviet in een gesloten pot behaalt deze reductie na 10 dagen. Een 4 log reductie is niet haalbaar op deze monsters aangezien de beginwaarde hiervoor te laag is.

Tabel 4: reductie *E. coli* bij de opslag van struviet RWZI 's-Hertogenbosch en Apeldoorn

Aantal dagen opslaan voor het behalen van de betreffende reductie aan <i>E. coli</i>				
Reductie	DB gesloten	DB open	AP gesloten	AP open
1 log	12	6	2	2
2 log	18	10	3	4
3 log	24	15	10	7
4 log	29	20	-	-

In tabel 5 is de gemiddelde afname van *E. coli* per dag weergegeven tussen de twee meetmomenten voor het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch. Hierin is te zien dat er geen afname tussen het meetmoment op dag 21 en 29 bij de open opslag heeft plaatsgevonden. Dit komt doordat op dag 21 het onderste meetbereik van 100 kve/gram bereikt is.

Tabel 5: gemiddelde afname *E. coli* per dag struviet RWZI 's-Hertogenbosch

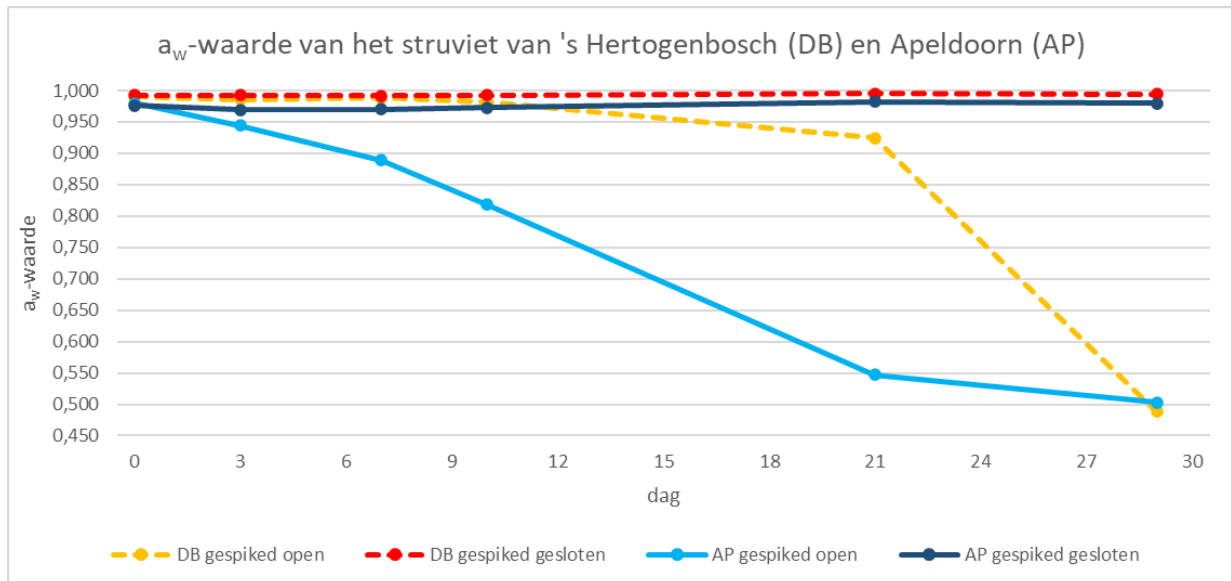
Procentuele afname <i>E. coli</i> (gem/dag)		
Dagen	DB open	DB gesloten
0-3	-3,175%	-14,286%
3-7	24,033%	11,250%
7-10	25,843%	24,848%
10-21	9,045%	8,929%
21-29	0,000%	12,250%

In tabel 6 is de gemiddelde afname van *E. coli* per dag weergegeven tussen de twee meetmomenten voor het struviet van RWZI Apeldoorn. Te zien is dat de afname het grootst is tussen dan 0-3. Deze neemt af tussen dag 3-7. In de open opslag is er na 7 dagen <100 kve *E. coli*/gram aanwezig, voor de gesloten opslag geldt dit na 10 dagen.

Tabel 6: gemiddelde afname *E. coli* per dag struviet RWZI Apeldoorn

Procentuele afname <i>E. coli</i> (gem/dag)		
Dagen	AP open	AP gesloten
0-3	31,750%	33,056%
3-7	24,671%	21,000%
7-10	0,000%	12,500%
10-21	0,000%	0,000%

In onderstaande figuur 13 is het verloop van a_w -waarde weergegeven van de open en gesloten opslag van struviet afkomstig van RWZI 's-Hertogenbosch en Apeldoorn.



Figuur 13: verloop a_w -waarde van struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en Apeldoorn

Wateractiviteit is bepalend in de groei en overleving van micro-organismen zoals *E. coli*. Het verloop van de wateractiviteit voor het struviet van 's-Hertogenbosch en Apeldoorn in zowel de open als gesloten opslag zijn weergegeven in figuur 13. In beide gesloten potten is de a_w -waarde gelijk gebleven. De a_w -waarde van beide open potten daalde wel in de loop van de tijd, waarbij deze van het struviet van RWZI Apeldoorn een sterkere daling vertoonde. De a_w -waarde ligt van beide open potten na 29 dagen rond de 0,5.



Afbeelding 2: struviet 's-Hertogenbosch dag 0



Afbeelding 3: struviet 's-Hertogenbosch dag 3



Afbeelding 4: struviet 's-Hertogenbosch dag 10

6.3. Discussie

Aan de hand van dit experiment is gebleken dat *E. coli* na verloop van tijd sterft op struviet. Individueel hebben deze omstandigheden effect op de afsterving van *E. coli* echter zal de combinatie van deze omstandigheden een "hurdle effect" veroorzaken. Oorzaken voor de afsterving van *E. coli* op struviet kunnen zijn:

1. Beperkte voedingstoffen op het struviet:

Struviet is een fosfaat-zout dat over het algemeen weinig organisch stof bevat waardoor er ook weinig voedingstoffen aanwezig zijn. Het organisch stof dat aanwezig is op struviet is grotendeels vergist tijdens de slibgisting. Tijdens dit proces zullen eerst de makkelijk afbreekbare voedingstoffen verbrand worden, en blijven de complexere organische verbindingen over. *E. coli* zal deze complexe organische verbindingen niet kunnen afbreken, hierdoor zal het op struviet kunnen overleven door zijn resterende voedingstoffen die in zijn cel aanwezig zijn. Dit is terug te zien in de resultaten van het struviet vanuit RWZI 's-Hertogenbosch. In de open opslag overleeft *E. coli* nog drie dagen op zijn resterende voedingstoffen, en in de gesloten opslag voor zes dagen, aangezien de hoeveelheid *E. coli* in deze periode niet afneemt. Het verschil in deze overlevingstijd is te verklaren door het wel/ niet aanwezig zijn van zuurstof zoals onderstaand staat beschreven.

2. Wateractiviteit:

De a_w -waarde van gesloten potten is gedurende 29 dagen gelijk gebleven boven de overlevingsgrens van *E. coli*, 0,95. Zowel op struviet van RWZI 's-Hertogenbosch en Apeldoorn sterft *E. coli* af in de gesloten potten. Het aantal *E. coli* op het struviet van de open pot van RWZI 's-Hertogenbosch daalt significant sneller dan bij de gesloten pot. Ondanks dat de a_w -waarde van dit struviet gedurende 10 dagen boven de overlevingswaarde van *E. coli* zit is dit verschil vanaf 3 dagen al zichtbaar. Doordat enkel het bovenste laagje van het struviet droogt en waarna het struviet gehomogeniseerd wordt, neemt de a_w -waarde over het geheel gezien nauwelijks af. Echter zal de *E. coli* op het bovenste laagje gestorven zijn dus is het aantal *E. coli* in de pot lager.

3. Aan/ afwezigheid zuurstof:

In afbeelding 2 is te zien dat struviet van RWZI 's-Hertogenbosch in een open opslag, een waterlaag aanwezig is op het struviet. Deze waterlaag resulteert in een anaeroob milieu voor *E. coli* op het struviet. Deze waterlaag verdampt in de open opslag na 3 dagen zoals te zien is in afbeelding 3. Hierdoor zal het milieu in het struviet langzaam veranderen van anaeroob naar aerob wanneer het struviet verder opdroogt. Deze laag water verdampt echter niet in de gesloten opslag, waardoor een anaeroob milieu blijft bestaan. Als gevolg hiervan zal *E. coli* in de open opslag sneller afsterven dan de gesloten opslag, aangezien het sneller al zijn voedingstoffen verbrand zal hebben. Dit proces verloopt namelijk sneller bij een aerob milieu dan een anaeroob milieu. *E. coli* in de open opslag is na

20 dagen 4 log gereduceerd, terwijl *E. coli* in de gesloten opslag na 29 dagen 4 log is gereduceerd.

Het struviet van RWZI Apeldoorn heeft een grotere poriegrootte dan het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch. Hierdoor is er zuurstof beschikbaar voor *E. coli* in het struviet van RWZI Apeldoorn dan RWZI 's-Hertogenbosch. Het struviet van Apeldoorn heeft geen waterlaag gehad, hierdoor heeft het niet in een anaeroob milieu verkeerd. *E. coli* op struviet van RWZI Apeldoorn zal om deze reden ook sneller afsterven dan op struviet van RWZI 's-Hertogenbosch.

4. Zuurtegraad:

In het experiment dat beschreven staat in hoofdstuk 5 is te zien dat de pH van struviet boven de overlevingsgrens van *E. coli* ligt. Dit zal in combinatie met de bovenstaande parameters een reden zijn voor de afsterving van *E. coli*.

Het struviet van Apeldoorn is ontvangen met een a_w -waarde (0,85) lager dan de minimale overlevingsgrens van *E. coli*. Om deze reden is het struviet nadat het gespiked was nog verhoogd in a_w -waarde door middel van leidingwater. Dit zal geen negatieve werking gehad hebben op de overleving van *E. coli* aangezien struviet een slecht oplosbaar zout is (169 mg/l). Waardoor de eventueel toegenomen zoutconcentratie geen rol speelt.

Tijdens dit experiment is ook een alternatieve methode onderzocht voor de telling van *E. coli*. De methode die onderzocht is zijn de swaptests van Hygiena (Hygiena Microsnap coliform enrichment swaptest in combinatie met Hygiena Microsnap *E. coli* detection swaptest). Deze swaptests zijn gemeten met de Hygiena EnSure Touch ATP luminometer. De resultaten hiervan zijn vergeleken met de resultaten van de telplaat methode. Deze alternatieve methode is niet betrouwbaar gebleken, de resultaten hiervan zijn terug te vinden in bijlage 3.

6.4. Conclusie

Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat *E. coli* sterft bij de opslag van struviet. Dit is zowel het geval bij een open als gesloten pot, waarbij een open pot het aantal *E. coli* sneller daalt, omdat de a_w -waarde hier ook een rol heeft in de afname van *E. coli*. Na het opslaan van struviet gedurende 18 dagen is een minimale 2 log reductie en bij het opslaan gedurende 29 dagen een minimale 4 log reductie. Afhankelijk van het aantal *E. coli* dat op vers geproduceerd struviet zit kan aan de hand van deze resultaten bepaald worden hoelang het opgeslagen moet worden.

7. Invloed organisch stof op struviet voor overleving *E. coli*

In dit experiment is de invloed van organisch stof op de overleving van *E. coli* op struviet onderzocht. Dit is onderzocht zodat kennis verkregen wordt van de mate waarin voedingsstoffen, in de vorm van organisch stof, dat op struviet aanwezig is de overleving van *E. coli* beïnvloed. De concentratie chemisch zuurstof verbruik (CZV) is gebruikt als maat voor organisch stof op struviet.

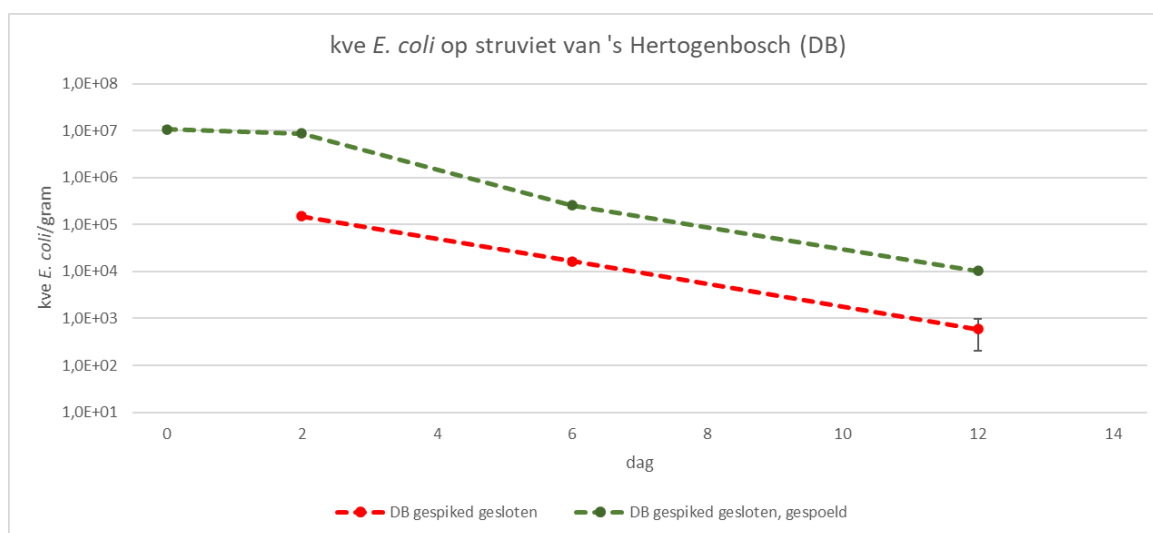
7.1. Methode

Tijdens dit experiment is het struviet van RWZI 's-Hertogenbosch gebruikt en enkel gesloten potten. Het struviet in de ene pot is eerst gespoeld met leidingwater om een deel van het CZV te verwijderen. Dit is gedaan door het struviet in een pot te plaatsen, te vullen met leidingwater, goed te schudden en hierna het water af te gieten (dit is 3x herhaald). Het andere monster is niet gespoeld met leidingwater, maar daar is enkel 60 ml leidingwater aan toegevoegd om beide monsters te voorzien van een a_w -waarde boven de overlevingsgrens (0,95) van *E. coli*, om invloed van a_w -waarde uit te sluiten. Hierna is van beide struviet monsters in enkelvoud het CZV gehalte bepaald door middel van Hach Lange kuvettentesten (LCK514 & LCK1414). Hiervoor is 10 ml van beide monsters 1:5 verdund met gedemineraliseerd water.

Beide monsters zijn hierna gespiked met *E. coli* zoals beschreven staat in hoofdstuk 6.1 onder het kopje "Monster spiken". Tijdens dit experiment is *E. coli* gemeten op dag 0, 2, 6 en 12 zoals beschreven staat in hoofdstuk 4.1. onder het kopje "*E. coli* bepalen". De monsters zijn opgeslagen en bemonsterd zoals beschreven staat in hoofdstuk 6.1 onder het kopje "Opslag monsters en monstername."

7.2. Resultaten

De invloed van CZV op struviet voor de overleving van *E. coli* is voor een periode van 12 dagen onderzocht. Deze resultaten zijn weergegeven in figuur 14. De ruwe data van het experiment is terug te vinden in bijlage 1.



Figuur 14: invloed organisch stof op overleving *E. coli*

Te zien is dat de afname van *E. coli* in zowel het gespoelde als niet gespoelde monster met een vergelijkbare snelheid plaatsvinden. De standaardafwijking is voor de meeste meetpunten dusdanig klein dat deze niet zichtbaar is in de grafiek. De concentratie *E. coli* in het niet gespoelde monster op t= 0 dagen is niet opgenomen als gevolg van een meetfout.

De procentuele afname van *E. coli* is weergegeven in tabel 7. Hierin is te zien dat na 12 dagen 99% van de beginconcentratie *E. coli* is afgestorven in beide monsters.

Tabel 7: procentuele afname *E. coli*

Procentuele afname <i>E. coli</i>		
Dag	DB niet gespoeld	DB gespoeld
0		0,000%
2	0,000%	18,981%
6	89,000%	97,593%
12	99,603%	99,904%

In onderstaande tabel 8 is de a_w -waarde weergegeven van het struviet uit beide potten. Hierin is te zien dat voor beide monsters de a_w -waarde dichtbij de 1 ligt.

Tabel 8: a_w -waarde van het struviet

a_w -waarde opslag experiment		
Dag	niet gespoeld	gespoeld
0	0,999	1,000
12	1,000	0,999

7.3. Discussie

In de resultaten is opnieuw te zien dat de opslag van struviet ervoor zorgt dat het aantal *E. coli* exponentieel afneemt. De a_w -waarde van het struviet is voor beide monsters 0,999 of 1,000 waardoor dit geen negatief effect heeft gehad op de overleving van *E. coli*. Zowel het gespoelde als niet gespoelde monster zijn met vergelijkbare snelheden afgenomen in *E. coli* hoeveelheden. Desondanks deze met verschillende concentraties zijn geëindigd, gespoeld tot $1,04 \cdot 10^4$ kve/gram en niet gespoeld tot $5,95 \cdot 10^2$ kve/gram. Dit verschil is ontstaan doordat de monsters waarschijnlijk verschillende beginconcentraties *E. coli* bevatten. De exacte waarde van het entmateriaal kan met ongeveer 1 log waarde verschillen.

7.4. Conclusie

Het struviet van tevoren spoelen blijkt geen zichtbaar effect te hebben op de overleving van *E. coli*, want het verloop tussen beide monsters is gelijk. Opnieuw toont dit experiment aan dat ook bij een hoge a_w -waarde van 0,999 *E. coli* sterft op het struviet.

8. Verloop *E. coli* en *C. perfringens* bij processen op een RWZI

Dit experiment geeft inzicht in de hoeveelheid *E. coli* en *C. perfringens* die aanwezig is in het eindproduct en tijdens de processtappen voor de vorming van struviet.

8.1. Methode

Dit is onderzocht door op locatie, op verschillende plaatsen in en rondom het struviet productieproces, een steekmonster te nemen en hiervan de hoeveelheid *E. coli* en *C. perfringens* te bepalen. Dit is uitgevoerd op de locaties:

- RWZI Land van Cuijk;
- RWZI 's-Hertogenbosch;
- RWZI Apeldoorn;
- RWZI Amersfoort.

Nadat de monsters genomen zijn, zijn deze koel bewaard om verandering van biologische activiteit te beperken. Bij de bovengenoemde vier RWZI's zijn 4 of 5 monsters genomen. De volgende monsters zijn genomen op iedere locatie: slib (voor vergisting), uitgegist slib, centraat en vers struviet. Wanneer er op locatie filtraat wordt verwerkt binnen de struviet productie is dit monster ook meegenomen in het onderzoek.

De volgende RWZI's zijn niet meegenomen, omdat de struviet installatie niet draaide, waardoor geen vers monster genomen kon worden.

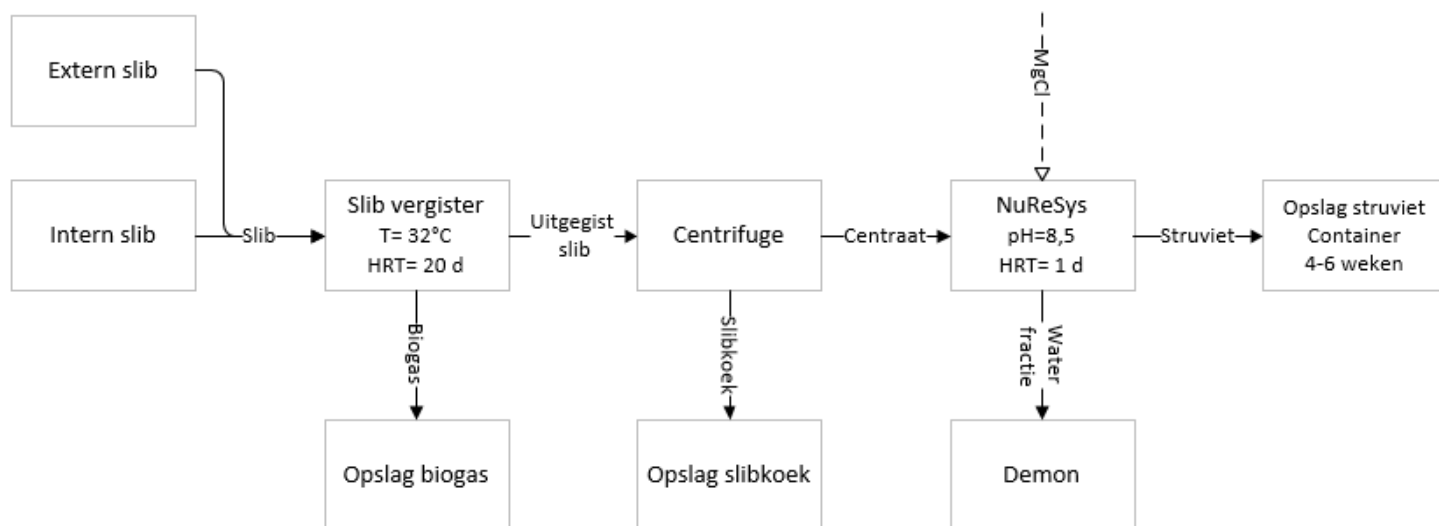
- RWZI Tiel;
- RWZI Amsterdam-west.

De hoeveelheid *E. coli* is bepaald, zoals in hoofdstuk 4.1 onder het kopje "*E. coli* bepalen" beschreven staat. *C. perfringens* is een indicatororganisme voor sporenvormende bacteriën. De hoeveelheid *C. perfringens* is aangetoond door middel van het kweken op TSC-agar voor 24 uur op 37 °C conform ISO 7937. Het stomacheren en de telling van kolonies is op identieke wijze uitgevoerd als beschreven staat in hoofdstuk 4.1 onder het kopje "*E. coli* bepalen".

8.2. Resultaten

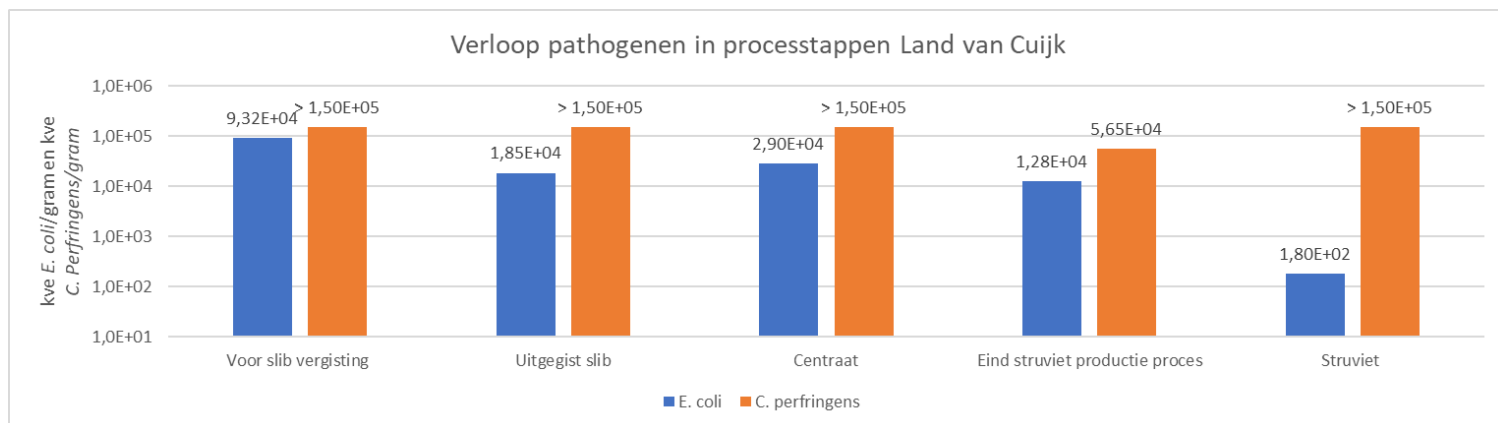
In dit hoofdstuk zijn de resultaten weergegeven van de overleving van *E. coli* en *C. perfringens*. Daarnaast is een uitleg van de verschillende struviet productieprocessen weergegeven en de omliggende processtappen. De ruwe data van het experiment is terug te vinden in bijlage 1.

RWZI Land van Cuijk



Figuur 15: processchema RWZI Land van Cuijk

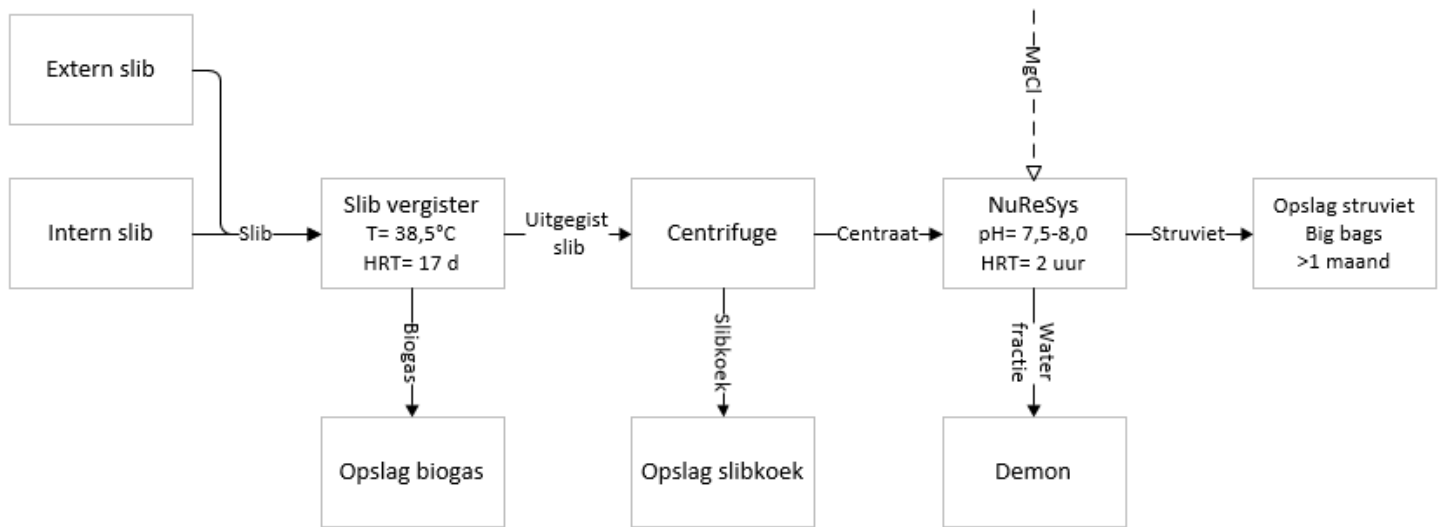
In bovenstaande figuur 15 is het processchema van de RWZI in Land van Cuijk weergegeven. Hier wordt het type struviet reactor genaamd, NuReSys, gebruikt voor de productie van struviet.



Figuur 16: verloop *E. coli* en *C. perfringens* in processtappen RWZI Land van Cuijk

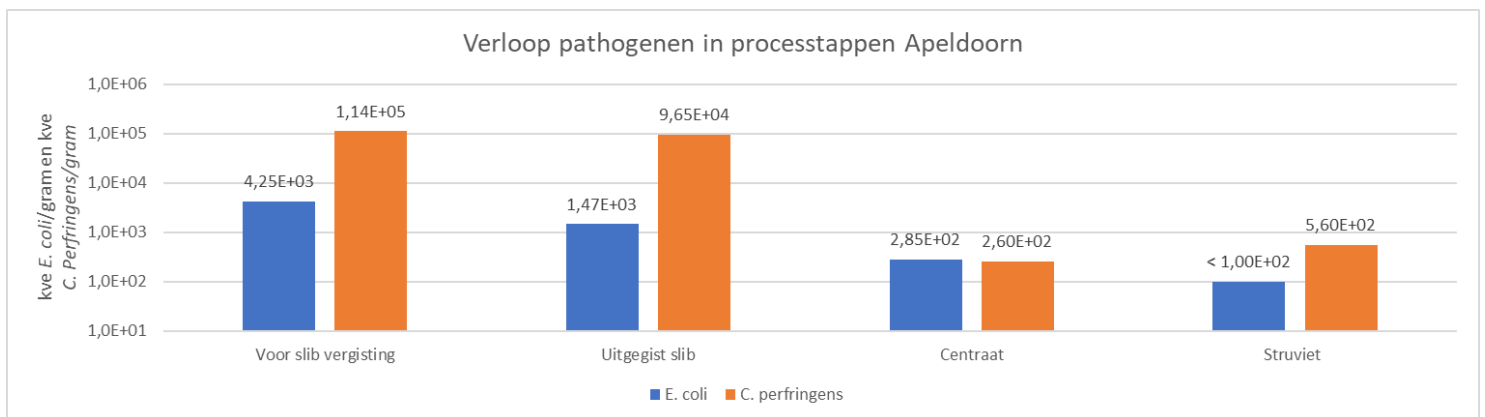
In bovenstaande figuur 16 is de gemeten hoeveelheden aan *E. coli* en *C. perfringens* weergegeven. Hierin is te zien dat de hoeveelheid aan *E. coli* gedurende het proces boven de $1 \cdot 10^4$ ligt en in het gevormde struviet $1,8 \cdot 10^2$ aan kve/gram. Het aantal *C. perfringens* is gedurende het proces en ook in het gevormde struviet boven de $5,0 \cdot 10^4$ aan kve/gram.

RWZI Apeldoorn



Figuur 17: processchema RWZI Apeldoorn

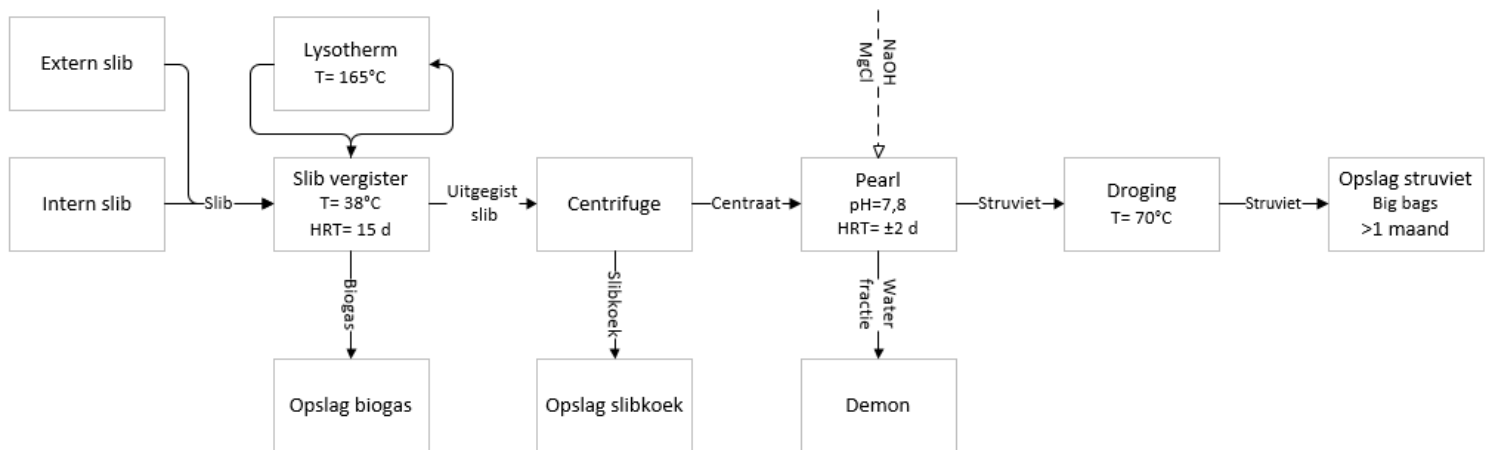
In bovenstaande figuur 17 is het processchema van de RWZI in Apeldoorn weergegeven. Hier wordt het type struviet reactor genaamd, NuReSys, gebruikt voor de productie van struviet.



Figuur 18: verloop *E. coli* en *C. perfringens* in processtappen RWZI Apeldoorn

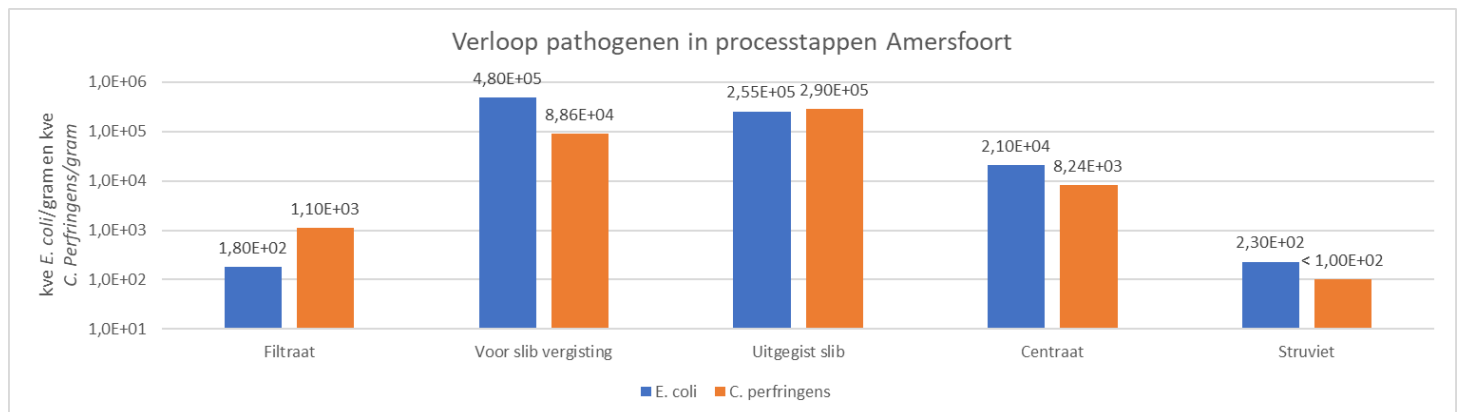
In bovenstaande figuur 18 is de gemeten hoeveelheden aan *E. coli* en *C. perfringens* weergegeven. Hierin is te zien dat de hoeveelheid aan *E. coli* gedurende het proces boven de $1 \cdot 10^4$ ligt en in het gevormde struviet < 100 aan kve/gram (onder meetbereik, er is geen enkele kolonie geteld bij verdunning -1). Het aantal *C. perfringens* is gedurende het proces boven de $1,1 \cdot 10^5$. In het gevormde struviet is dit $5,6 \cdot 10^2$ aan kve/gram.

RWZI Amersfoort



Figuur 19: processchema RWZI Amersfoort

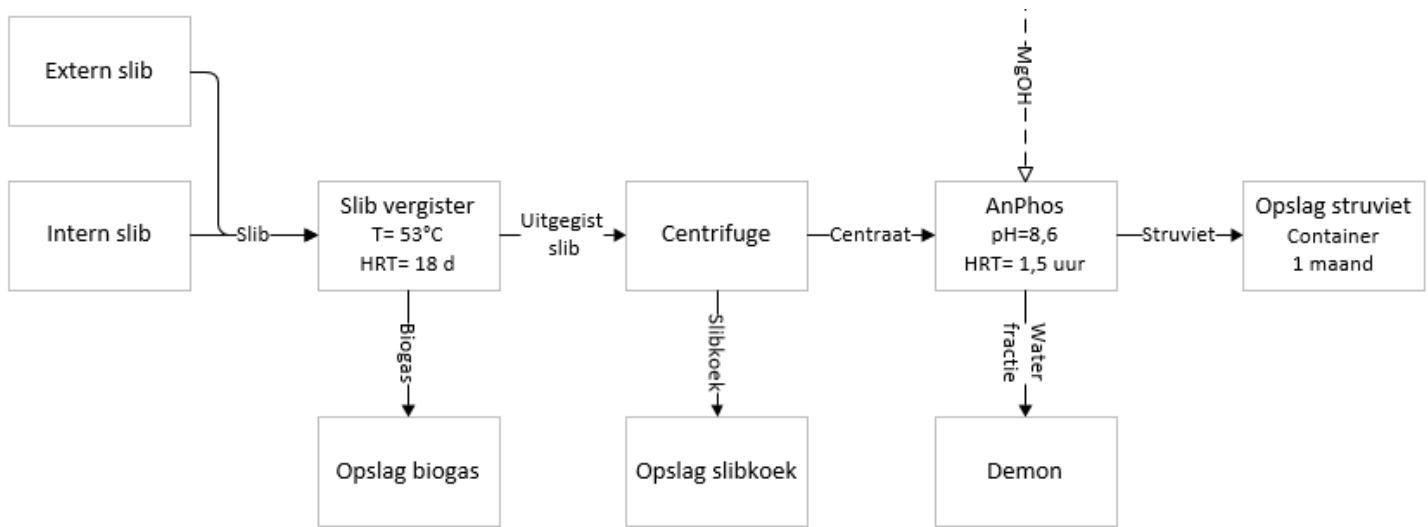
In bovenstaande figuur 19 is het processchema van de RWZI in Amersfoort weergegeven. Hier wordt het type struviet reactor genaamd, Pearl, gebruikt voor de productie van struviet.



Figuur 20: verloop *E. coli* en *C. perfringens* in processtappen RWZI Amersfoort

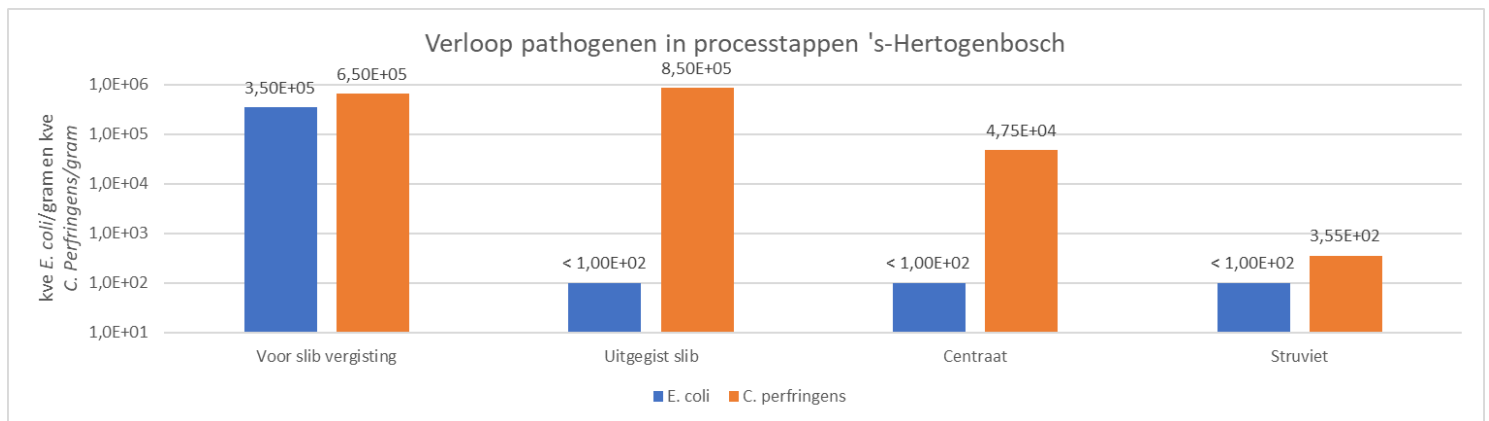
In bovenstaande figuur 20 is de gemeten hoeveelheden aan *E. coli* en *C. perfringens* weergegeven. Het filtraat, afkomstig vanuit een zeefbandpers voorafgaand aan de slibvergisting, bevat $1,8 \cdot 10^2$ kve/gram *E. coli* en $1,1 \cdot 10^3$ kve/gram *C. perfringens*. Dit filtraat wordt niet vergist, maar wordt evenals het centraat verwerkt als voeding van de Pearl reactor. In het gevormde struviet is het aantal *C. perfringens* < 100 (onder meetbereik, er zijn vijf en vier kolonies geteld bij verdunning -1). Voor het aantal *E. coli* is in het gevormde struviet $2,3 \cdot 10^2$ kve/gram gemeten.

RWZI 's-Hertogenbosch



Figuur 21: processchema RWZI 's-Hertogenbosch

Bovenstaand is in figuur 21 is een processchema van RWZI 's-Hertogenbosch weergegeven. In dit processchema is de struviet reactor, AnPhos, en de omliggende processtappen weergegeven. Hierin zijn de belangrijkste procesparameters weergegeven voor de overleving van *E. coli*. In bijlage 5 is meer informatie over de AnPhos reactor te vinden. De overleving van *E. coli* en *C. perfringens* is bepaald voor het bovenstaande processchema. Deze gegevens zijn weergegeven in figuur 22.

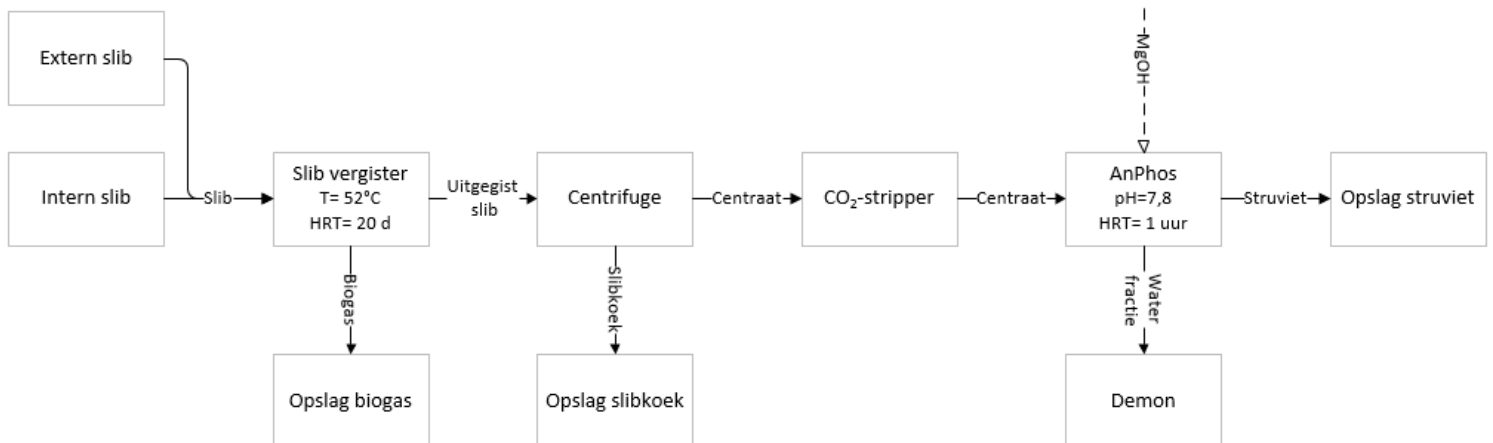


Figuur 22: verloop *E. coli* en *C. perfringens* in processtappen RWZI 's-Hertogenbosch

In bovenstaande figuur is te zien dat de hoeveelheid aanwezig *E. coli* na de thermofiele vergisting van 53 °C verminderd wordt van $3,5 \cdot 10^5$ kve/gram tot 0 kve/gram (onder meetbereik, er is één kve/g geteld bij verdunning -1). Bij de opvolgende monsters is er geen *E. coli* meer op de plaat aangetroffen. De hoeveelheid *C. perfringens* neemt in de figuur 22 genoemde processtappen af van $6,5 \cdot 10^5$ kve/gram tot $3,6 \cdot 10^2$ kve/gram.

RWZI Tiel

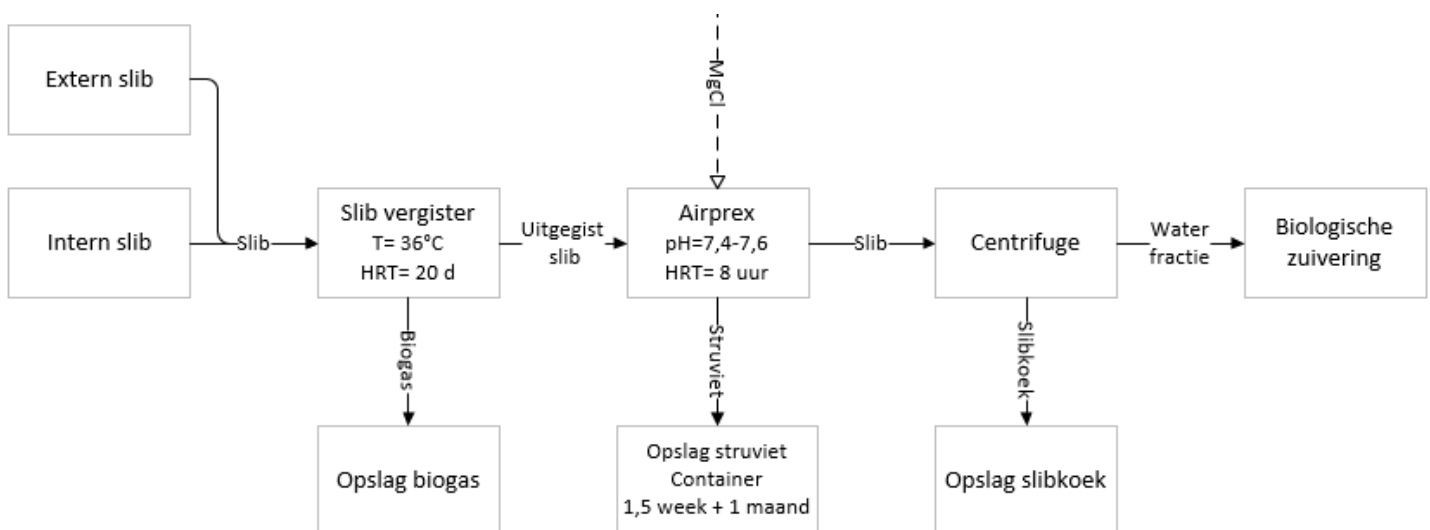
Onderstaand in figuur 23 is een processchema weergegeven van de AnPhos reactor op RWZI Tiel en de omliggende processtappen. Op RWZI Tiel wordt evenals op RWZI 's-Hertogenbosch gebruik gemaakt van een thermofiele vergisting, bij 52 °C. Voordat het centraat de AnPhos reactor in wordt gepompt wordt het door een CO₂-stripper geleid om de pH te verhogen. Meer informatie over het processchema van RWZI Tiel is te vinden in bijlage 5. Bij deze RWZI zijn zoals eerder vermeld geen monsters genomen.



Figuur 23: processchema RWZI Tiel

RWZI Amsterdam-west

In figuur 24 is een processchema van RWZI Amsterdam-West weergegeven. Hierin is de struviet reactor, Airprex, weergegeven met de omliggende productie stappen. Het slib wordt op RWZI Amsterdam-West vergist bij een temperatuur van 36 °C. Dit vergiste slib wordt direct in de Airprex reactor gepompt waar het struviet gevormd wordt, waarna het ontwaterd wordt. Meer informatie over dit processchema is te vinden in bijlage 5. Bij deze RWZI zijn zoals eerder vermeld geen monsters genomen.



Figuur 24: processchema RWZI Amsterdam-west

8.3. Discussie

De hoeveelheden aan *E. coli* en *C. perfringens* die gevonden zijn in de verse slib monsters (voor slibgisting) komen overeen met de verwachte hoeveelheid in rioolwater. De verwachting is dat deze bacteriesoorten niet beïnvloed worden door eerdere processen op een rioolwaterzuivering. *E. coli* kan namelijk overleven onder zowel anaerobe als aerobe omstandigheden.

De slibvergisting blijkt uit de metingen wel een significant effect te hebben op de hoeveelheid aanwezige *E. coli*. De monsters van RWZI 's-Hertogenbosch laten een afname zien van $3,5 \cdot 10^5$ kve/gram voor de slibgisting tot onder de meetgrens van 100 kve/gram na de slibgisting. Op deze RWZI wordt gebruik gemaakt van thermofiele vergisting, waarin het slib voor 18 dagen met 53 °C in de reactor aanwezig is. Dit is boven de maximale overleving temperatuur van *E. coli*, namelijk 45 °C, dit zal dus na 18 dagen vrijwel alle aanwezige *E. coli* doden. Deze thermofiele vergisting wordt ook gebruikt op de locatie RWZI Tiel onder 52 °C met een verblijfstijd van 20 dagen. Op de RWZI's waar een mesofiele slibgisting (35 °C) gebruikt wordt is geen zichtbaar verschil in de hoeveelheid *E. coli* voor en na de slibgisting.

In de hoeveelheid *C. perfringens* voor en na de slibgisting is geen duidelijk verschil te zien. Echter neemt de hoeveelheid net als *E. coli* af na de slibontwatering, hier zal een gedeelte afgevoerd worden in de vaste fractie. De hoeveelheid aanwezig *C. perfringens* neemt af van het centraat monster naar het verse struviet monster. Dit heeft als oorzaak dat het afgevoerd wordt met de waterfractie in de struviet reactor, aangezien deze gesuspendeerd zijn in water (Grinten van der, et al., 2017).

8.4. Conclusie

Uit dit experiment kan geconcludeerd worden dat een thermofiele slibvergisting een afstervende werking heeft op *E. coli*. Hierdoor zal op RWZI Tiel een vergelijkbaar beeld ontstaan van het verloop van *E. coli* als op RWZI 's-Hertogenbosch. Bij de RWZI's die gebruik maken van mesofiele slibvergisting is deze afname in *E. coli* na de slibvergisting niet aanwezig. *C. perfringens* toont geen afsterving in zowel mesofiele als thermofiele slibvergisting. Tijdens het proces neemt de hoeveelheid van zowel *E. coli* als *C. perfringens* af door het scheiden van de vaste- en waterfractie.

9. Conclusie en advies

In dit hoofdstuk worden de onderzoeksvragen en de hoofdvraag beantwoord. Op basis van deze antwoorden wordt een advies gegeven over de meest geschikte methode om de kwaliteit van struviet, kijkend naar *E. coli*, te waarborgen. Verder worden suggesties gegeven voor vervolg onderzoek.

Aan de hand van het aantal gemeten *E. coli* op vers struviet blijkt dat de hoogst gemeten waarde 230 kve *E. coli*/gram is. Uit de resultaten van het opslag experiment blijkt dat het opslaan van struviet gedurende 18 dagen leidt tot een minimale reductie van 2 log in een gesloten omgeving, bij 20 °C. Hieruit kan dus geconcludeerd worden dat het opslaan van struviet gedurende 18 dagen ertoe leidt dat nagenoeg geen *E. coli* meer aanwezig is. Ook is ook aangetoond dat alle *E. coli* sterft tijdens een thermofiel vergistingsproces van boven de 50 °C. Dit is te verklaren, doordat 45 °C de maximale overlevingstemperatuur is voor *E. coli*. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het opslaan van struviet niet nodig is zodra de RWZI gebruik maakt van thermofiele slibvergisting. Als laatste is onderzocht wat de invloed van de a_w -waarde is op de overleving van *E. coli*. Dit versnelt de verlaging van het aantal *E. coli* waardoor een RWZI die een droogstap na het struviet productieproces heeft een kortere opslag tijd kan toepassen. De verwachting is dat er na een droogstap bij 70 °C geen *E. coli* meer aanwezig is op het struviet. Ook het opslaan in een big bag zorgt voor een verlaging van de a_w -waarde, waardoor ook in dit geval een kortere opslag tijd toegepast kan worden.

Verder kan geconcludeerd worden dat *E. coli* niet sterft tijdens een mesofiel vergistingsproces. *C. perfringens* blijft zowel tijdens als mesofiel als een thermofiel vergistingsproces in leven. Echter daalt zowel de concentratie *C. perfringens* als *E. coli* gedurende het verloop op de RWZI, omdat deze micro-organismen zich ophopen in de waterfractie. Wanneer de vaste- en waterfractie gescheiden worden in de centrifuge en na de struviet reactor vindt deze afname plaats. De hoeveelheid *C. perfringens* op vers struviet ligt lager dan 1000 kve/gram, op RWZI Land van Cuijk na.

Afhankelijk van het struviet productieproces en de omliggende zuiveringsprocessen wordt de opslagtijd van struviet bepaald. Door middel van deze opslag worden onverwachte pieken van *E. coli* op struviet verholpen waardoor een veilig product geleverd wordt. Aanbevolen wordt om het struviet minimaal 18 dagen op te slaan wanneer gebruik gemaakt wordt van een mesofiele slibvergisting, zodat een 2 log reductie van *E. coli* plaatsvindt. Deze opslagtijd kan verkleind worden wanneer het struviet in big bags wordt opgeslagen of wordt gedroogd door middel van een droogstap. Wanneer gebruik gemaakt wordt van een thermofiele slibvergisting is geen opslag nodig voor de reductie van *E. coli* op struviet.

Voor het vervolg onderzoek is het noodzakelijk om onderzoek te doen naar de overleving van *E. coli* op struviet bij verschillende temperaturen, met de nadruk op de gemiddelde temperatuur per seizoen in Nederland. Aangezien de overlevingstijd van *E. coli* waarschijnlijk toeneemt bij lage temperaturen. Aan de hand van dit onderzoek kan inzicht verkregen worden in welke mate de opslagtijd van struviet beïnvloed wordt door de temperatuur.

Daarnaast wordt sterk aangeraden de overleving van *E. coli* op struviet van meerdere productielocaties uit te voeren. Zodat een beeld verkregen kan worden van de opslagtijd die nodig is voor iedere specifieke locatie. En zo de variaties hierin in beeld te krijgen.

Verder is het ook sterk aan te raden om meerdere keren het aantal *E. coli* en *C. perfringens* op het vers geproduceerde struviet te bepalen. Hierdoor wordt de variatie aan concentraties in beeld gebracht en kan nauwkeuriger de benodigde opslag tijd bepaald worden. Ook wordt aangeraden om de concentratie te bepalen nadat het een bepaalde tijd in de opslag gestaan heeft om te controleren of het opslaan van struviet hetzelfde resultaat geeft in de praktijk.

Als laatste is het interessant maar niet noodzakelijk om het aantal *E. coli* te meten in de twee stromen na de struviet reactor (het struviet en de waterfractie). Waarschijnlijk zit de *E. coli* in deze waterfractie en zijn ze niet dood gegaan tijdens het struviet productieproces.

Literatuurlijst

Albrecht, J. A. (z.d.). *Clostridium perfringens*. Geraadpleegd op 11 juni 2021, van [https://food.unl.edu/clostridium-perfringens#:~:text=Microorganism%20Characteristics%3A%20Gram%20positive%20spore,\(109%2D117%2C%20B0F\)](https://food.unl.edu/clostridium-perfringens#:~:text=Microorganism%20Characteristics%3A%20Gram%20positive%20spore,(109%2D117%2C%20B0F))

Albrecht, J. A. (z.d.). *Escherichia coli O157:H7 (E Coli)*. Geraadpleegd op 24 maart 2021, van <https://food.unl.edu/escherichia-coli-o157h7-e-coli>

AW-waarde. Nutrilab B.V. Geraadpleegd op 16 februari 2021, van <https://nutrilab.nl/nl/analyse/awwaarde#:~:text=De%20AW%2Dwaarde%20is%20een,is%20een%20dimensie%2Dloze%20eenheid>

Bhuiyan, M. I. H., Mavinic, D. S., & Beckie, R. D. (2007). *A solubility and thermodynamic study of struvite*. Geraadpleegd van <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17910254/>

Bioconus. (z.d.). *Overleven van Escherichia coli in het milieu: fundamentele en volksgezondheidsaspecten*. Geraadpleegd op 8 juni 2021, van <https://dut.bioconus.com/survival-escherichia-coli-environment-fundamental-408567>

Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R. A., Schets, F. M., & de Roda Husman, A. M. (2015). Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *PLOS ONE*, 10(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127752>

Dijk, R., Berg van den, D., Beumer, R. R., Boer de, E., Dijkstra, A. F., Mout, L., Veld in 't, S. (2015). *Microbiologie van Voedingsmiddelen* (5e druk). Capelle aan den IJssel, Nederland: Mybusinessmedia BV.

Doyle, M. P., & Schoeni, J. L. (1984). *Survival and Growth Characteristics of Escherichia coli Associated with Hemorrhagic Colitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 855–856. Geraadpleegd van <https://aem.asm.org/content/aem/48/4/855.full.pdf>

Europees Parlement. (2008, 19 november). *RICHTLIJN 2008/98/EG*. Geraadpleegd op 2 april 2021, van <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?uri=celex:32008L0098>

Garcia-Ruiz, J. M., & Otalora, F. (2015). *Crystal Growth in Geology: Patterns on the Rocks*. Geraadpleegd van https://www.researchgate.net/publication/283298550_Crystal_Growth_in_Geology_Patterns_on_the_Rocks

Grinten van der, E., & Spijker, J. (2017). *Medicijnresten, pathogenen en antibioticaresistentie in struviet uit Nederlands huishoudelijk afvalwater*. RIVM. Geraadpleegd van <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2017-0144.pdf>

Hartman, E. C., & Bloemendal, J. M. (2015). *Warm rioolwater: vergeten energie met potentie*. Geraadpleegd van <https://tvvlconnect.nl/?file=1681&m=1567205405&action=file.download#:~:te>

[xt=Riothermie%20is%20het%20principe%20waarmee, van%20de%20betreffende%20riolering%20staan.](#)

Hassan, K. A., Elbourne, L. D., Tetu, S. G., Melville, S. B., Rood, J. I., & Paulsen, I. T. (2015). Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes. *Research in Microbiology*, 166(4), 255–263.

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.003>

Huygens, D., Saveyn, H. G. M., Tonini, D., Elder, P., & Delgado Sancho, L. (2019). *Technical proposals for selected new fertilising materials under the Fertilising Products Regulation (Regulation (EU) 2019/1009)*. Publications Office of the European Union. Geraadpleegd van

https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC117856/jrc117856_jrc117856_electronic.pdf

Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. Geraadpleegd van

<https://doi.org/10.1111/jam.13468>

Jong de, A. E. I. (2003). *Clostridium perfringens: Spores & Cells Media & Modeling*. Geraadpleegd van <https://edepot.wur.nl/121470>

Jong de, A. L., & Vriend, P. P. C. (2019). *Pathogenen en medicijnresten in struviet uit communaal afvalwater (concept)*. Nieuwegein, Nederland: Aquaminerals/ Waternet.

Lieverloo van, H., Wildt de, G., & Hapert van, N. (2018). *Ziekteverwekkende micro-organismen in voedsel*. 's-Hertogenbosch, Nederland: HAS Hogeschool.

Logisticon. (z.d.). *Wat is gedemineraliseerd water of demiwater*. Geraadpleegd op 9 juni 2021, van <https://www.logisticon.com/over-ons/aquaclinics/gedemineraliseerd-water-of-demiwater>

Morgenschweis, C., Vergouwen, L., Schöll van, L., & Leenen, I. (2015). *Verkenning van de kwaliteit van struviet uit de communale afvalwaterketen*. STOWA. Geraadpleegd van

<https://www.stowa.nl/sites/default/files/assets/PUBLICATIES/Publicaties%202015/STOWA%202015-34.pdf>

Nandakafle, G., Christie, A. A., Vilain, S., & Brözel, V. S. (2018). *Growth and Extended Survival of Escherichia coli O157:H7 in Soil Organic Matter*.

Geraadpleegd van

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00762/full>

Nutrient Platform. (2017, oktober). *Struviet en de wet?* Geraadpleegd van

Nutrilab. (z.d.). <https://www.nutrientplatform.org/wp-content/uploads/2016/01/20171027-Factsheet-Hoe-zit-het-met-struviet-en-de-wet.pdf>

NZFSANZ. (2010). *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*. Geraadpleegd van

<https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/11021/direct>

Oxoid. (z.d.). *TRYPTONE BILE X-GLUCURONIDE MEDIUM (TBX)*. Geraadpleegd op 24 maart 2021, van http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0945&c=UK&lang=EN

RIVM. (2018, 12 december). *E.coli (Escherichia coli) | RIVM*. Geraadpleegd op 25 maart 2021, van <https://www.rivm.nl/e-coli-escherichia-coli>

Sorensen, D. L., Eberl, S. G., & Dicksa, R. A. (1989). Clostridium perfringens as a point source indicator in non-point polluted streams. *Water Research*, 23(2), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90043-2)

STOWA. (2012). *Struviet productie door middel van het airprex proces*. Geraadpleegd van <https://www.stowa.nl/sites/default/files/assets/PUBLICATIES/Publicaties%202012/STOWA%202012-27.pdf>

TU Delft. (2010). *Afvalwaterbehandeling*. Geraadpleegd van <https://ocw.tudelft.nl/wp-content/uploads/Afvalwaterbehandeling2008.pdf>

WFC. (z.d.). *Escherichia coli*. Geraadpleegd op 26 maart 2021, van <http://www.foodconsultant.nl/nl/haccp-database/42-kennis/76-escherichia-coli#:~:text=Doordat%20E.,onschuldige%20darmbewoners%20bij%20de%20mens>

Wiersema, I. (z.d.). *Verdunningen microbiologisch onderzoek*. Geraadpleegd op 23 maart 2021, van <https://www.microbiologie.info/verdunning%20aanleggen%20voor%20microbiologisch%20onderzoek.html>

Wiersema, I. (z.d.-a). *Aerobe en anaerobe ademhaling bacterie*. Geraadpleegd op 8 juni 2021, van <https://www.microbiologie.info/Ademhaling%20.html>

Wiersema, I. (z.d.-b). *Bacteriespore*. Geraadpleegd op 25 juni 2021, van <https://www.microbiologie.info/bacteriespore.html>

Bijlage 1: Ruwe meetdata

In deze bijlage is de ruwe data per experiment weergegeven.

Effect opslag van struviet op overleving *E. coli* deel 1:

Tabel 1: ruwe data opslag experiment deel 1 van 's-Hertogenbosch

's-Hertogenbosch																
Blanco					Gespiked											
Open		Gesloten			Open						Gesloten					
Dag	kve	a _w -waarde	kve	a _w -waarde	kve					aw-waarde	kve					a _w -waarde
					1	2	3	Gem	SD		1	2	3	Gem	SD	
0	0	0,986	0	0,986	5,4*10 ⁶	-	-	5,4*10 ⁶	2,9*10 ⁶	0,986	5,4*10 ⁶	-	-	5,4*10 ⁶	2,9*10 ⁶	0,986
5	0	0,956	0	0,992	1,3*10 ⁴	2,3*10 ⁴	3,7*10 ⁴	2,5*10 ⁴	1,2*10 ⁴	0,971	8,8*10 ⁵	1,0*10 ⁶	1,2*10 ⁶	1,0*10 ⁶	1,6*10 ⁵	0,986

Tabel 2: ruwe data opslag experiment deel 1 van Apeldoorn

Apeldoorn																
Blanco					Gespiked											
Open		Gesloten			Open						Gesloten					
Dag	kve	a _w -waarde	kve	a _w -waarde	kve					aw-waarde	kve					a _w -waarde
					1	2	3	Gem	SD		1	2	3	Gem	SD	
0	0	0,965	0	0,965	9,1*10 ⁶	-	-	9,1*10 ⁶	2,8*10 ⁵	0,965	9,1*10 ⁶	-	-	9,1*10 ⁶	2,8*10 ⁵	0,965
5	0	0,833	0	0,973	6,5*10 ³	5,1*10 ³	6,0*10 ³	5,8*10 ³	7,1*10 ²	0,775	1,3*10 ⁶	1,0*10 ⁶	1,0*10 ⁶	1,2*10 ⁶	1,7*10 ⁵	0,973

Effect opslag van struviet op overleving *E. coli* deel 2:

Tabel 3: ruwe data opslag experiment deel 2

Dag	's-Hertogenbosch						Apeldoorn					
	Open			Gesloten			Open			gesloten		
	kve	SD	aw-waarde	kve	SD	aw-waarde	kve	SD	aw-waarde	kve	SD	aw-waarde
0	2,1*10 ⁶	3,5*10 ⁵	0,990	1,4*10 ⁶	2,1*10 ⁵	0,993	1,6*10 ⁵	7,1*10 ³	0,980	1,2*10 ⁵	7,1*10 ³	0,976
3	2,3*10 ⁶	2,1*10 ⁵	0,986	2,0*10 ⁶	3,5*10 ⁵	0,993	7,6*10 ³	8,5*10 ²	0,944	1,0*10 ³		0,969
7	8,9*10 ⁴	2,1*10 ⁴	0,988	1,1*10 ⁶	2,1*10 ⁴	0,992	1,0*10 ²		0,889	1,6*10 ²	7,1	0,970
10	2,0*10 ⁴	2,1*10 ³	0,981	2,8*10 ⁵	3,5*10 ⁴	0,993	1,0*10 ²		0,818	1,0*10 ²		0,973
21	1,0*10 ²		0,924	5,0*10 ³	4,2*10 ²	0,995	1,0*10 ²		0,547	1,0*10 ²		0,982
29	1,0*10 ²		0,488	1,0*10 ²		0,994			0,503			0,980

Tabel 4: ruwe data opslag experiment deel 2, procentuele afname *E. coli* RWZI 's-Hertogenbosch

Procentuele afname <i>E. coli</i>		
Aantal dagen	DB open	DB gesloten
0	0,000%	0,000%
3	-9,524%	-42,857%
7	95,762%	21,429%
10	99,048%	80,000%
21	99,995%	99,643%
29	99,995%	99,993%

Tabel 5: ruwe data opslag experiment deel 2, procentuele afname *E. coli* RWZI Apeldoorn

Procentuele afname <i>E. coli</i>		
Aantal dagen	AP open	AP gesloten
0	0,000%	0,000%
3	95,250%	99,167%
7	99,938%	99,867%
10	99,938%	99,917%
21	99,938%	99,917%

Invloed organisch stof op struviet voor overleving *E. coli*:

Tabel 6: ruwe data, invloed organisch stof op overleving *E. coli*

s-Hertogenbosch gesloten								
Dag	Gespiked			Gespiked, gespoeld			Blanco	
	aw	<i>E. coli</i> (kve/gram)	SD	aw	<i>E. coli</i> (kve/gram)	SD	aw	<i>E. coli</i> (kve/gram)
0	0,999			1,000	$1,08 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^6$	0,999	<100
2		$1,50 \cdot 10^5$			$8,75 \cdot 10^6$	$1,06 \cdot 10^6$		<100
6		$1,65 \cdot 10^4$	$2,12 \cdot 10^3$		$2,60 \cdot 10^5$	$2,83 \cdot 10^4$		-
12	1,000	$5,95 \cdot 10^2$	$3,95 \cdot 10^2$	0,999	$1,04 \cdot 10^4$	$5,66 \cdot 10^2$	1,000	-

Verloop *E. coli* en *C. perfringens* bij processen op een RWZI

Tabel 7: ruwe data verloop *E. coli* en *C. perfringens* op RWZI Land van Cuijk

Land van Cuijk (NuReSys)		
Monster	<i>E. coli</i> (kve)	<i>Clostridium perfringens</i> (kve)
Voor slib vergisting	$9,32 \cdot 10^4$	$>1,5 \cdot 10^5$
Uitgegist slib	$1,85 \cdot 10^4$	$>1,5 \cdot 10^5$
Centraat	$2,90 \cdot 10^4$	$>1,5 \cdot 10^5$
Eind struviet productieproces	$1,28 \cdot 10^4$	$5,65 \cdot 10^4$
Struviet	$1,80 \cdot 10^2$	$>1,5 \cdot 10^5$

Tabel 8: ruwe data verloop *E. coli* en *C. perfringens* op RWZI Apeldoorn

Apeldoorn (NuReSys)		
Monster	<i>E. coli</i> (kve)	<i>Clostridium perfringens</i> (kve)
Voor slib vergisting	$4,25 \cdot 10^3$	$1,14 \cdot 10^5$
Uitgegist slib	$1,47 \cdot 10^3$	$9,65 \cdot 10^4$
Centraat	$2,85 \cdot 10^2$	$2,60 \cdot 10^2$
Struviet	<100	$5,60 \cdot 10^2$

Tabel 9: ruwe data verloop *E. coli* en *C. perfringens* op RWZI Amersfoort

Amersfoort (Pearl)		
Monster	<i>E. coli</i> (kve)	<i>Clostridium perfringens</i> (kve)
Filtraat	$1,80 \cdot 10^2$	$1,10 \cdot 10^3$
Voor slib vergisting	$4,80 \cdot 10^5$	$8,86 \cdot 10^4$
Uitgegist slib	$2,55 \cdot 10^5$	$2,90 \cdot 10^5$
Centraat	$2,10 \cdot 10^4$	$8,24 \cdot 10^3$
Struviet	$2,30 \cdot 10^2$	<100

Tabel 10: ruwe data verloop *E. coli* en *C. perfringens* op RWZI 's-Hertogenbosch

's-Hertogenbosch (AnPhos)		
Monster	<i>E. coli</i> (kve)	<i>Clostridium perfringens</i> (kve)
Voor slib vergisting	$3,50 \cdot 10^5$	$6,50 \cdot 10^5$
Uitgegist slib	< 100	$8,50 \cdot 10^5$
Centraat	< 100	$4,75 \cdot 10^4$
Struviet	< 100	$3,55 \cdot 10^2$

Bijlage 2: Berekening theoretische oplosbaarheid struviet

Visual Minteq is een programma dat gebruikt kan worden voor de berekening van chemische evenwichten van onder andere oplossingen die in contact zijn met gassen en vaste stoffen.

Tabel 11: ruwe data uit Visual Minteq voor berekening theoretische oplosbaarheid struviet

Berekend door Visual Minteq bij 20 °C en een pH van 8,67		
	Concentratie (mol/L)	Activiteit (mol/L)
Cl ⁻	8,98*10 ⁻⁴	8,38*10 ⁻⁴
H ⁺	2,28*10 ⁻⁹	2,13*10 ⁻⁹
H ₂ PO ₄ ⁻	2,22*10 ⁻⁵	2,07*10 ⁻⁵
H ₃ PO ₄	5,90*10 ⁻¹²	5,90*10 ⁻¹²
HPO ₄ ²⁻	7,97*10 ⁻⁴	6,04*10 ⁻⁴
Mg(NH ₃) ₂ ²⁺	3,18*10 ⁻¹¹	2,42*10 ⁻¹¹
Mg ²⁺	8,16*10 ⁻⁴	6,19*10 ⁻⁴
MgCl ⁺	2,15*10 ⁻⁶	2,01*10 ⁻⁶
MgHPO ₄ (aq)	2,17*10 ⁻⁴	2,17*10 ⁻⁴
MgOH ⁺	7,65*10 ⁻⁷	7,14*10 ⁻⁷
MgPO ₄ ⁻	2,95*10 ⁻⁶	2,75*10 ⁻⁶
NH ₃ (aq)	1,54*10 ⁻⁴	1,54*10 ⁻⁴
NH ₄ ⁺	8,85*10 ⁻⁴	8,26*10 ⁻⁴
OH ⁻	3,45*10 ⁻⁶	3,22*10 ⁻⁶
PO ₄ ³⁻	2,01*10 ⁻⁷	1,08*10 ⁻⁷

De theoretische geleidbaarheid van struviet is berekend door de concentraties bij het evenwicht te verrekenen met de molaire ion geleidbaarheden uit BINAS tabel 41.

Berekening geleidbaarheid [H⁺]:

$$[H^+]_{\text{tijdens evenwicht struviet}} = 2,13 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$$\text{Molaire geleidbaarheid } H^+ = 34,965 \text{ mS} \cdot \text{m}^2/\text{mol}$$

$$EC_{[H^+]} = ((2,13 \cdot 10^{-9}) \cdot 1000) \cdot 34,965 = 7,98 \cdot 10^{-5} \text{ mS/m}$$

Tabel 12: berekening theoretische EC waarde bij oplossing van struviet

Berekening totale EC met gewogen EC		
In BINAS (bij T=298 K)	In $10^{-3} \Omega^{-1} \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$	
Is hetzelfde als	mS*m ² /mol	
Molecuul	mS*m²/mol	EC (mS/m)
H ⁺	34,965	$7,98 \cdot 10^{-5}$
NH ₄ ⁺	7,35	6,51
½ Mg ²⁺	5,3	8,65
OH ⁻	19,8	$6,82 \cdot 10^{-2}$
Cl ⁻	7,631	6,85
½ Mg(NH ₃) ₂ ²⁺ *	6,03	$3,84 \cdot 10^{-7}$
MgCl ⁺ *	6,03	$1,30 \cdot 10^{-2}$
MgOH ⁺ *	6,03	$4,61 \cdot 10^{-3}$
H ₂ PO ₄ ⁻ **	6,83	$1,52 \cdot 10^{-1}$
½ HPO ₄ ²⁻ **	6,83	10,88
MgPO ₄ ⁻ **	6,83	$2,02 \cdot 10^{-2}$
⅓ PO ₄ ³⁻ **	6,83	$4,11 \cdot 10^{-3}$
EC totale oplossing		33,154 mS/m
EC totale oplossing		331,54 μS/cm
* = Aangezien deze moleculen niet staan in de BINAS is hier het gemiddelde van de positieve waardes uit de lijst in BINAS tabel 41, molaire iongeleidbaarheden, gebruikt (zonder de uitschieter H ⁺)		
** = Aangezien deze moleculen niet staan in de BINAS is hier het gemiddelde van de negatieve waardes uit de lijst in BINAS tabel 41, molaire iongeleidbaarheden, gebruikt (zonder de uitschieter OH ⁻)		

Bijlage 3: Resultaten Hygiëna swaptest

In deze bijlage zijn de resultaten van de Hygiëna *E. coli* swaptest weergegeven tegenover de resultaten van de telplaat methode gebaseerd op ISO 16649-2.

Tabel 13: ruwe data Hygiëna *E. coli* swaptest

Swap test dag 7 (verduunning 1:1)					Resultaten telplaten (TBX)
Verduunning	RLU/ CFU	<i>E. coli</i>	kve		kve
-1	508 ±152	60	6,00*10 ²	8,9*10 ⁴	
-3	35 ±10	7	7,00*10 ³		
-1	892 ±276	60	6,00*10 ²	1,1*10 ⁶	
-3	26 ±7	7	7,00*10 ³		

Tabel 14: ruwe data Hygiëna *E. coli* swaptest

Swap test dag 7 (verduunning 1:10)					Resultaten telplaten (TBX)
Verduunning	RLU/ CFU	<i>E. coli</i>	kve		kve
-1	4375 ±1312	180	1,80*10 ²	8,9*10 ⁴	
-3	175	20	2,00*10 ³		
-1	<5000	300	3,00*10 ²	1,1*10 ⁶	
-3	262 ±78	35	3,50*10 ³		

Tabel 15: ruwe data Hygiëna *E. coli* swaptest

Swap test dag 10 (verduunning 1:1)					Resultaten telplaten (TBX)
Verduunning	RLU/ CFU	<i>E. coli</i>	kve		kve
-1	298 ±89	35	3,50*10 ²	2,0*10 ⁴	
-2	35 ±10	7	7,00*10 ²		
-1	674 ±202	60	6,00*10 ²	2,8*10 ⁵	
-2	35 ±10	7	7,00*10 ²		

Tabel 16: ruwe data Hygiëna *E. coli* swaptest

Swap test dag 10 (verduunning 1:10)					Resultaten telplaten (TBX)
Verduunning	RLU/ CFU	<i>E. coli</i>	kve		kve
-1	2975 ±892	180	1,80*10 ²	2,0*10 ⁴	
-2	175 ±52	20	2,00*10 ²		
-1	>5000	300	3,00*10 ²	2,8*10 ⁵	
-2	612 ±183	60	6,00*10 ²		

Tabel 17: ruwe data Hygiëna *E. coli* swaptest

Swap test dag 10 (verduunning 1:100)					Resultaten telplaten (TBX)
Verduunning	RLU/ CFU	<i>E. coli</i>	kve		kve
-1	>5000	300	3,00*10 ¹	2,0*10 ⁴	
-2	3500 ±1050	180	1,80*10 ²		
-1	>5000	300	3,00*10 ¹	2,8*10 ⁵	
-2	3500 ±1050	180	1,80*10 ²		

Bijlage 4: *Clostridium Perfringens*

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) is een sporenvormende bacterie die groeit onder anaerobe omstandigheden. Echter kan deze bacterie ook groeien wanneer er zuurstof in geringe mate aanwezig is in zijn milieu. Deze bacterie komt voor in de bodem; mariene sedimenten; zoetwatersedimenten; en het maagdarmsstelsel van mensen en dieren (Hassan et al., 2015).

C. perfringens kan overleven bij een temperatuur range van 10-55 °C, met een optimum van 43 °C. Verder kan deze bacterie groeien bij een pH tussen de 5 en de 9. De minimale a_w -waarde waarbij deze kan groeien is 0,96 (NZFSA, 2010) (Albrecht, J. A., z.d.)

C. perfringens gaat sporen vormen wanneer de bacterie in een ongunstige overleving omstandigheid verkeerd als: hitte, droogte, radiatie, voedseltekort of toxische chemicaliën. De sporen die de cel maakt is een overlevingsmechanisme, deze spore zal in een ruststand blijven waar geen stofwisseling of deling plaatsvindt (Wiersema. -b, z.d.). De sporevorming kan plaatsvinden tussen 27-50 °C bij een pH van 6,0-8,0 en a_w -waarde van $>0,96$ (Jong de., 2003). Deze sporen kunnen onder zeer extreme omstandigheden overleven. De sporen zullen geactiveerd worden wanneer ze in een gunstig milieu verkeren, waar vaak genoeg voedingsstoffen aanwezig zijn.

In onderstaande tabel 18 is de hoeveelheid *E. coli* en *C. perfringens* weergegeven op verschillende plekken.

Tabel 18: aantal *E. coli* en *C. perfringens* (*Blaak et al., 2015) (oppervlaktewater, in en effluent RWZI); **Sorensen et al., 1989) (uitwerpselen mensen); ***Grinten van der, et al., 2017); ****(TU Delft, 2010))

	Aantal <i>E. coli</i>	Totale fecale bacteriën	Totaal <i>C. perfringens</i>
Uitwerpselen mensen		10^7 - 10^9 kve/gram**	10^3 - 10^7 kve/gram**
Influent RWZI	10^3 - 10^7 kve/ml***	10^4 - 10^6 kve/ml*	
Effluent RWZI	10^3 kve/ml****	10^1 - 10^4 kve/ml*	
oppervlaktewater		0 - 10^3 kve/ml*	

Bijlage 5: Informatietabel verschillen onderzochte RWZI's

In deze bijlage is verdere informatie weergegeven van de zes onderzoekslocaties. Deze gegevens zijn afkomstig uit verschillende interviews en gesprekken met procesoperators/ technologen en bedrijfsleiders van de verschillende RWZI's.

Tabel 19: informatie over de verschillende onderzochte RWZI's

Procesinformatie	RWZI Land van Cuijk	RWZI Apeldoorn	RWZI Tiel	RWZI 's-Hertogenbosch	RWZI Amsterdam-west	RWZI Amersfoort
Struviet productieproces	NuReSys	NuReSys	AnPhos	AnPhos	AirPrex	Pearl
Te verwerken stroom	Centraat	Centraat	Centraat	Centraat	Slib	Centraat+ filtraat
Mg toevoeging (poeder of oplossing)	MgCl ₂	MgCl ₂	Mg(OH) ₂	Mg(OH) ₂	MgCl ₂	MgCl ₂
Vergistingstemperatuur (°C)	32	38,5	52	53	36	38
Verblijfstijd vergister	20 dagen	17 dagen	20 dagen	18 dagen	20 dagen	15 dagen
Verblijfstijd struviet reactor	1 dag	2 uur	1 uur	1,5 uur	8 uur	2 dagen
pH struviet reactor	8,5	7,5-8,0	7,8	8,6	7,4-7,6	7,8
Waarmee wordt de pH veranderd?	-	-	CO ₂ strippen	-	-	NaOH
Type big bag/container + verblijfstijd	Container, 4-6 weken	Big bag, >1 maand	-	Container, 1 maand	Container, 1,5 week+ 1 maand	Big bag, >1 maand
Batch gewijs geproduceerd?	Continu	Continu	Batch	Batch	Continu	
Droging [ja/nee]	Nee	Nee	Nee	Nee	Nee	Ja [70 °C]