



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Bronnen van antibioticaresistentie in het milieu en mogelijke maatregelen

RIVM Rapport 2017-0058
H. Schmitt et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Bronnen van antibioticaresistentie in het milieu en mogelijke maatregelen

RIVM Rapport 2017-0058

Colofon

© RIVM 2017

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

DOI 10.21945/RIVM-2017-0058

H. Schmitt (auteur), RIVM
H. Blaak (auteur), RIVM
M. Kemper (auteur), RIVM
M. van Passel (auteur), RIVM
F. Hierink (auteur), RIVM
J. van Leuken (auteur), RIVM
A.M. de Roda Husman (auteur), RIVM
E. van der Grinten (auteur), RIVM
M. Rutgers (auteur), RIVM
J. Schijven (auteur), RIVM
H. de Man (auteur), Sanitas Water
P. Hoeksma (auteur), Wageningen UR, Livestock Research
T. Zuidema (auteur), RIKILT

Met dank aan:

Monique van der Aa (RIVM/DMG)
Mark Montforts (RIVM/VSP)
Marcel Mennen (RIVM/CIB)
Rebeca Pallares (WETSUS).

Contact:

Heike Schmitt
(heike.schmitt@rivm.nl)

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
Nederland
www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Bronnen van antibioticaresistentie in het milieu en mogelijke maatregelen

Het RIVM heeft in samenwerking met andere instituten onderzocht hoeveel resistente bacteriën via afvalwater in het Nederlandse oppervlaktewater terecht komen. Afvalwater is, naast mest, de belangrijkste bron waardoor antibioticaresistente bacteriën in het milieu belanden. In 60 tot 100% van het onderzochte afvalwater zitten bijzonder resistente micro-organismen (BMRO), zoals ESBL-producerende *E. coli* en carbapenemresistente Enterobacteriaceae. Daarnaast zijn resten van antibiotica in het afvalwater gevonden.

Mensen kunnen aan resistente bacteriën in het milieu worden blootgesteld, bijvoorbeeld als zij in contact komen met water waarop gezuiverd afvalwater wordt geloosd. Vooral nog is het onduidelijk hoe groot de bijdrage van deze blootstelling is ten opzichte van andere blootstellingsroutes, en wat de gevolgen daarvan voor de volksgezondheid zijn. Daarvoor wordt aanvullend onderzoek aanbevolen. Duidelijk is wel dat mensen naast blootstelling via het milieu, ook door andere bronnen kunnen worden blootgesteld aan antibioticaresistente bacteriën, bijvoorbeeld tijdens reizen naar landen in Azië of Zuid-Amerika.

Door de huidige behandeling van afvalwater nemen de concentraties van antibioticaresistente bacteriën af. Er bestaan aanvullende zuiveringstechnieken voor afvalwater die het aantal antibioticaresistente bacteriën in het oppervlaktewater nog verder kunnen verminderen. Ook de concentraties van resistente bacteriën in mest kunnen door aanvullende zuiveringstechnieken verminderd worden.

Kernwoorden: antibioticaresistentie, antibiotica, afvalwater, mest, milieu, maatregelen, volksgezondheid

Synopsis

Sources of antibiotic resistance in the environment and intervention measures

In collaboration with other institutions, RIVM investigated how many resistant bacteria enter Dutch surface waters from waste water treatment plants. Next to manure, waste water is the main source of resistant bacteria in the environment. Resistant bacteria of particular public health concern, including ESBL-producing *E. coli* and carbapenem resistant Enterobacteriaceae, have been found in 60-100% of all investigated waste water samples. Antibiotics themselves have also been found in waste water.

Human exposure to resistant bacteria is possible, for example, upon contact with surface water which receives waste water treatment plant effluent. So far, the contribution of this exposure to the total exposure to resistant bacteria is unknown, as are the effects of this exposure on public health. Additional research is therefore recommended. Humans can also be exposed to resistant bacteria via other routes, such as travel to Asian or Latin American.

The current treatment of waste water reduces the concentrations of resistant bacteria. Advanced techniques are available which can decrease the amounts of resistant bacteria further. Options for the reduction of resistant bacteria also exist for the treatment of manure.

Keywords: antibiotic resistance, antibiotics, waste water, manure, environment, interventions, public health

Inhoudsopgave

1	Samenvatting — 9
2	Summary — 15
3	Inleiding — 21
3.1	Aanleiding — 21
3.1.1	De rol van overdracht van antibioticaresistentie via het milieu — 21
3.2	Doel en focus — 22
3.3	Dit rapport — 22
3.4	Achtergrond — 23
3.4.1	Bronnen en verspreiding van ABR naar de mens — 23
3.4.2	Bijzonder resistente bacteriën — 25
3.4.3	Resistentiegenen — 26
3.4.4	Antibioticaresiduen — 27
4	ABR in het milieu in 2016 (nulmetingen) — 29
4.1	ABR in afvalwater — 29
4.1.1	Nulmetingen - resistente bacteriën — 30
4.1.2	Nulmetingen - resistentiegenen — 34
4.1.3	Nulmetingen - residuen van antibiotica — 35
4.1.4	Afvalwaterstromen in Nederland — 37
4.1.5	Totale lozing van ABR via afvalwater op het milieu — 38
4.2	ABR in mest — 41
4.2.1	Pilotmetingen 2016 en eerdere metingen — 41
4.2.2	Meststromen — 42
5	Beheersmaatregelen — 45
5.1	Afvalwater — 45
5.1.1	Wettelijke kaders afvalwater — 45
5.1.2	Conventionele zuiveringstechnieken — 47
5.1.3	Innovatieve technieken — 48
5.1.4	Effecten van huidige en innovatieve technieken op ABR — 49
5.2	Mest — 51
5.2.1	Bestuurlijke en wettelijke kaders mest — 51
5.2.2	Mestbewerkings- en verwerkingstechnieken — 52
5.2.3	Effecten van bewerkings- en verwerkingstechnieken op ABR — 52
6	Overzicht nationaal onderzoek ABR in het milieu — 57
6.1	Lopende onderzoeksprojecten — 58
7	Discussie en conclusie — 61
7.1	Nulmetingen: ABR in afvalwater en mest — 61
7.2	Beheersmaatregelen: vermindering van uitstoot van ABR naar het milieu — 64
7.3	Gevolgen van ABR in het milieu voor de volksgezondheid — 65
8	Referenties — 67
9	Bijlagen — 81

- 9.1 Bijlage A. Keuze van de onderzochte bijzonder resistente bacteriën, antibioticaresiduen en resistentiegenen — 81
- 9.2 Bijlage B - Meetplan en methoden nulmetingen — 81
- 9.3 Bijlage C - Resultaten pilotmetingen 2015 — 82
 - 9.3.1 VRE-bacteriën — 82
 - 9.3.2 CRE-bacteriën — 82
- 9.4 Bijlage D - Selectie RWZI's voor de nulmetingen in afvalwater — 83
- 9.5 Bijlage E - Methodes voor ABR in afvalwater — 85
 - 9.5.1 Verkrijgen watermonsters — 85
 - 9.5.2 Isolatie bacteriën — 85
 - 9.5.3 Analyses CRE — 85
 - 9.5.4 Analyses VRE — 86
 - 9.5.5 Analyses resistentiegenen — 86
 - 9.5.6 Analyses antibioticaresiduen — 87
- 9.6 Bijlage F - Uitkomsten ESBL-producerende *E. coli*, CRE en VRE in afvalwater in meer detail — 90
- 9.7 Bijlage G - Berekening van de voorspelde concentraties van antibiotica residuen in influent — 95
- 9.8 Bijlage H - Hoeveelheden afvalwater ziekenhuizen en verzorgingshuizen in Nederland — 96
- 9.9 Bijlage I - Meetplan en methodes voor ABR in mest — 97
 - 9.9.1 Meetplan — 97
 - 9.9.2 Drijfmestmonsters en isolatie van bacteriën — 97
- 9.10 Bijlage J - Literatuuronderzoek naar reductie van resistente bacteriën en resistentiegenen met conventionele en innovatieve technieken voor afvalwaterzuivering — 98
 - 9.10.1 Methodes literatuuronderzoek — 98
 - 9.10.2 Resultaten — 99
 - 9.10.3 Bronnen — 105
- 9.11 Bijlage K - Mest: Bestuurlijke en wettelijke kaders — 106
- 9.12 Bijlage L - Strategieën voor onderzoek naar ernst en impact van blootstelling aan resistente bacteriën in het milieu — 108
- 9.13 Bijlage M - Begrippenlijst — 110

1 Samenvatting

Om de dreiging van antibioticaresistentie aan te kunnen pakken is onder meer kennis nodig over het vóórkomen en de verspreiding van resistente bacteriën, resistentiegenen en residuen van antibiotica (samen ABR genoemd) in het milieu. Immers, mensen kunnen aan ABR in de leefomgeving worden blootgesteld, bijvoorbeeld door contact met water. Uit een eerdere kennissynthese is gebleken dat weinig gegevens voorhanden zijn over resistente bacteriën in het milieu (water, bodem en lucht).

De belangrijkste bronnen van ABR naar het milieu zijn naar verwachting afvalwater, grotendeels afkomstig van mensen, en mest van dieren. Daarom heeft het RIVM, in samenwerking met Sanitas Water, Wageningen University Research en RIKILT, onderzoek verricht naar de hoeveelheden ABR die met afvalwater en mest naar het milieu worden geloosd. Daarnaast is een inventarisatie gemaakt van mogelijke beheersmaatregelen om verspreiding naar het milieu tegen te gaan. Dit onderzoek is uitgevoerd als onderdeel van de Nationale Aanpak Antibioticaresistentie (VWS, 2015).

Dit rapport beschrijft de resultaten van dit onderzoek. Het onderzoek bestond uit de volgende drie onderdelen:

1. Het verrichten van nulmetingen van de aanwezigheid van ABR in afvalwater en mest;
2. Het maken van een overzicht van mogelijke beheersmaatregelen om de verspreiding van ABR naar het milieu tegen te gaan; en
3. Het in kaart brengen van de onderzoeksactiviteiten en kennispartners in Nederland op het terrein van ABR in het milieu.

Met antibioticaresistentie (ABR) worden in dit rapport bedoeld resistente bacteriën, resistentiegenen én residuen van antibiotica.

Resistentiegenen zijn gemeten omdat zij extra informatie geven over de omvang van de populatie van resistente bacteriën en over veranderingen in de concentraties in deze verspreidingsroute naar het milieu.

Nulmetingen in afvalwater

Aanpak

Resistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen komen in afvalwater door uitscheiding van mensen die bacteriën en genen bij zich dragen en antibiotica gebruiken. Afvalwater wordt via het rioleringsstelsel verzameld en getransporteerd naar rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's), waar het wordt gezuiverd van voedingsstoffen (nutriënten). Na zuivering wordt het water geloosd op het oppervlaktewater.

Om een eerste inzicht te krijgen in de hoeveelheid ABR die met afvalwater naar het milieu wordt geloosd werden concentraties gemeten van resistente bacteriën, antibioticaresistentiegenen en residuen van antibiotica in afvalwater bij RWZI's. De metingen werden uitgevoerd bij 100 van de in totaal 341 RWZI's in Nederland en er is in zowel inkomend als gezuiverd afvalwater gemeten. Om een zo goed mogelijke

steekproef te verkrijgen werd bij de selectie rekening gehouden met de verschillende zuiveringstechnieken die bij de RWZI's werden toegepast, de geografische spreiding en de hoeveelheden afvalwater afkomstig van ziekenhuizen, poliklinieken en/of verzorgingshuizen.

De volgende Bijzonder Resistente Micro-Organismen (BRMO) werden onderzocht: ESBL-producerende *Escherichia coli*, carbapenemresistente Enterobacteriaceae (CRE, en daaronder de carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae, CPE genoemd) en vancomycine-resistente enterokokken (VRE). Deze bacteriën zijn potentieel relevant voor de gezondheid. Daarnaast zijn resistentiegenen voor twee groepen antibiotica gemeten, en zijn de concentraties van residuen van een aantal antibiotica bepaald.

Resultaten: concentraties resistente bacteriën

In alle afvalmonsters werden ESBL-producerende *E. coli* aangetroffen. Dit is in overeenstemming met enkele eerdere onderzoeksresultaten. CRE werden in afvalwater van 90% van alle RWZI's aangetroffen. De concentraties CRE in afvalwater lagen ongeveer 250 keer lager dan de concentraties van ESBL-producerende *E. coli*. Dit komt overeen met het gegeven dat de prevalentie van CRE in de Nederlandse bevolking laag is in vergelijking met die van ESBL-producerende *E. coli* (zoals bekend uit ander onderzoek).

Er zijn verschillende typen CRE gevonden, waaronder carbapenemaseproducerende Enterobacteriaceae met de carbapenemasegenen OXA-48, maar ook NDM en KPC. Deze typen zijn eerder een enkele keer aangetroffen bij uitbraken in zorginstellingen, maar worden vooralsnog zelden bij patiënten in Nederlandse ziekenhuizen gezien. De mogelijke bijdrage vanuit ziekenhuizen aan de concentraties CRE in afvalwater is met deze data niet vast te stellen. Daarom wordt vervolgonderzoek aanbevolen. CRE werden ook gevonden in negen RWZI's die geen afvalwater van ziekenhuizen en verpleeghuizen behandelen. Dit zou kunnen wijzen op een bijdrage vanuit de algemene bevolking. Bekend is ook dat CRE voor kan komen bij reizigers. In de zorg wordt hierop gescreend om verspreiding onder risicogroepen te voorkomen.

VRE werden in afvalwater van 59% van de 100 RWZI's aangetroffen, waarvan 34 RWZI's waarop geen ziekenhuis was aangesloten. De concentraties VRE konden niet gekwantificeerd worden. VRE wordt geregeld aangetroffen bij uitbraken in ziekenhuizen en sporadisch bij de algemene bevolking.

Resultaten: concentraties resistentiegenen en residuen van antibiotica

Bij alle RWZI's zijn in het inkomende (influent) en uitgaande (effluent) afvalwater resistentiegenen gevonden en wel genen die zorgen voor resistentie tegen de antibioticatypen macroliden en sulfonamiden. Deze genen werden ook in andere studies in relatief hoge concentraties in afvalwater aangetroffen.

Ook werden residuen van meerdere groepen antibiotica aangetoond. De concentraties van residuen in het inkomende water kwamen overeen met verwachtingen gebaseerd op de verbruiksgegevens van deze

antibiotica. Er is nog onvoldoende kennis over in hoe verre residuen van antibiotica in het milieu tot ontwikkeling van resistente bacteriën kunnen leiden. Wel werden concentraties van antibiotica geschat waaronder geen selectie van resistentie meer te verwachten is. Voor enkele antibiotica liggen de gevonden concentraties in het uitgaande water hoger dan deze schattingen. Het is aan hand van deze gegevens nog niet duidelijk of in de afvalwaterzuiveringsinstallaties daadwerkelijk selectie van resistentie plaatsvindt.

Door in een representatieve steekproef van RWZI's periodieke metingen te verrichten van ABR in afvalwater kunnen op een niet invasieve manier veranderingen in het vóórkomen van (bijzonder) resistente bacteriën, resistentiegenen en residuen van antibiotica worden vastgesteld. Gezien de omvang en diversiteit van de meststromen in Nederland moet worden bezien of en op welke manier dit voor mest haalbaar zou zijn.

Afname van ABR door afvalwaterzuivering

De concentraties van resistente bacteriën namen in de zuivering gemiddeld ongeveer met een factor 100-1.000 af, waarbij de toegepaste zuivering bestond uit conventionele biologische zuivering, deels met fosfaatverwijdering en denitrificatie. De afname is van dezelfde orde van grootte als die voor niet-resistente bacteriën. De concentraties van de onderzochte resistentiegenen namen in de zuivering ongeveer met een factor 100 af. De afname van de concentraties van antibioticaresiduen varieerde per stof, gemiddeld wordt in het effluent tussen 34 en 87% van de concentraties in het influent gevonden. Resistente bacteriën en resistentiegenen worden dus beter (efficiënter) verwijderd uit het afvalwater dan antibioticaresiduen.

Afvalwaterstromen en vrachten ABR

In Nederland wordt het grootste deel (90%) van het geproduceerde afvalwater gezuiverd. Dit afvalwater is afkomstig van huishoudens, ziekenhuizen, verzorgingstehuizen en bedrijven. Verder komt er veel regenwater in het riool terecht. Het gezuiverde afvalwater wordt geloosd op het oppervlaktewater. Daarnaast komt er ongezuiverd afvalwater in het oppervlaktewater, afkomstig van overstorten en foutaansluitingen van gescheiden rioleringsystemen.

Ruwe schattingen op basis van deze stromen afvalwater en de in dit onderzoek in afvalwater gemeten concentraties wijzen op een totale vracht van ongeveer 10^{16} kolonievormende eenheden (kve) ESBL-producerende *E. coli* en 10^{13} kve¹ CRE die per jaar met afvalwater in het milieu gebracht wordt. Er bereikt daarnaast ten minste 900 kg antibiotica het oppervlaktewater. Daarbij is het aandeel van de vracht uit overstorten en hemelwateruitlaten naar schattingen mogelijk van dezelfde orde van grootte als dat van het gezuiverd afvalwater uit de RWZI's.

¹ Kolonievormende eenheden, of kve, is de standaard manier om aantallen bacteriën in uit te drukken; 1 kve wil zeggen: 1 met kweek detecteerbare bacterie, wat strikt genomen niet hetzelfde is als 1 levende bacterie.

Nulmetingen in mest

Aanpak

Een andere belangrijke bron van ABR naar het milieu is dierlijke mest. In de dierhouderij worden antibiotica toegepast. Ook kunnen dieren, zowel landbouwhuisdieren als gezelschapsdieren, resistente bacteriën en resistentiegenen bij zich hebben (dragerschap), overigens zonder er zelf ziek van te worden. Dieren scheiden deze bacteriën, genen en antibioticaresiduen uit en daarmee komen ze in de mest. Mest wordt op verschillende manieren gebruikt. Het grootste deel wordt uitgereden over land en dat vormt een belangrijke route van ABR naar het milieu (bodem, water, lucht). Over de hoeveelheden ABR die op deze wijze in het milieu terechtkomen is weinig bekend.

In een eerste proefonderzoek zijn tijdens transport naar de mestverwerker monsters genomen van varkens-, kalveren-, leghennen-, vleeskuikens-, moederdieren- en kalkoenmest. De monsters zijn onderzocht op de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli*.

Resultaten: resistente bacteriën in mest

In meer dan de helft van de mestmonsters van vleeskalveren en varkens, en in mindere mate ook in mest van vleeskuikens werden ESBL-producerende *E. coli* aangetroffen. Dit is in overeenstemming met eerdere bevindingen uit 2013/2014. Deze eerste (indicatieve) metingen wijzen daarom op een bijdrage van mest aan de introductie van BRMO (ESBL-producerende *E. coli*) naar het milieu.

Vervolgmetingen

In dit proefonderzoek zijn geen metingen verricht van resistentiegenen en antibioticaresiduen. In 2017 wordt het onderzoek voortgezet, waarbij een groter aantal mestmonsters zal worden genomen die gemeten zullen worden op ESBL-producerende *E. coli*, resistentiegenen en antibioticaresiduen. Daarmee zal de totale bijdrage van emissie van ABR uit mest nauwkeuriger worden bepaald en kan deze met andere stromen (zoals afvalwater) worden vergeleken.

Meststromen

De grootste meststroom in Nederland is afkomstig van de melkveehouderij (71% van de totale hoeveelheid mest in massa), ook vleeskalveren en varkens dragen bij aan de mestproductie. Ongeveer twee derde van de mest wordt onbewerkt op het land uitgereden, meestal op eigen land.

Beheersmaatregelen bij afvalwater en mest

De meeste RWZI's in Nederland passen conventionele afvalwaterzuiveringstechnieken toe. Deze technieken leiden volgens literatuuronderzoek, en in overeenstemming met de nulmetingen, tot een vermindering van de concentraties aan resistente bacteriën en resistentiegenen in het effluent met ongeveer een factor 100-1000 ten opzichte van het ingaande afvalwater. De concentraties antibioticaresiduen dalen ook, maar minder sterk.

Innovatieve technieken voor de nazuivering van effluent van RWZI's, zoals adsorptie aan actiefkool, geavanceerde ozonisatie of oxidatie, kunnen (op basis van huidige beperkte gegevens) mogelijk tot een verdere reductie van ABR in het uitgaande afvalwater leiden met een

factor 100-100.000. Daarbij lijkt ozonisatie of oxidatie voor verwijdering van resistente bacteriën iets effectiever dan adsorptie aan actieve kool.

Een aantal innovatieve technieken voor de bewerking en verwerking van mest worden op dit moment in Nederland ingezet (toegepast op 9% van het totale mestvolume). Dit zijn technieken zoals thermofiele vergisting, hygiënisatie, compostering, verbranding, reverse osmose van de natte fractie, en drogen. Door het toepassen van deze technieken kunnen aantallen bacteriën, en daarmee waarschijnlijk ook resistente bacteriën, aanzienlijk gereduceerd worden. Zo is gebleken dat aantallen ESBL-producerende *E. coli* door compostering en covergisting flink kunnen worden verminderd. Dit effect is afhankelijk van de temperatuur en duur van deze processen.

Overzicht van kennispartners op het gebied van ABR in het milieu

In Nederland wordt door een aantal kennisinstellingen onderzoek gedaan naar antibioticaresistentie in het milieu. Soms wordt onderzoek gedaan in een consortium van verschillende kennisinstellingen en soms in samenwerking met private partners, bijvoorbeeld op het gebied van innovatie in afvalwaterzuiveringstechniek of in het identificeren van ABR in het milieu.

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de diverse verrichte en lopende onderzoeksprojecten naar antibioticaresistentie in het milieu. Wij adviseren onderzoekspartners op dit terrein samen te brengen om tot een gezamenlijke aanpak voor het verminderen van en de omgang met kennisparten te komen.

Ernst en impact

Het vóórkomen en de verspreiding van ABR in het milieu (lucht, water, bodem en grondwater) draagt bij aan de blootstelling van mensen aan ABR. Hoe groot de bijdrage van deze blootstelling is, is op basis van de huidige kennis nog niet goed te bepalen. Om de gevolgen voor de volksgezondheid te onderzoeken, zullen meerdere wetenschappelijke methoden toegepast moeten worden. Deze omvatten epidemiologische studies naar dragerschap van ABR in mensen die via een bepaalde route zijn blootgesteld, kwantitatieve analyses van de blootstelling aan resistente bacteriën en ziektelastschattingen. Vooral studies naar het dragerschap van mensen die op specifieke wijze kunnen worden blootgesteld aan ABR in het milieu, zoals zwemmen in oppervlaktewater (blootstelling door inslikken van water), of werken in een afvalwaterzuiveringsinstallatie (blootstelling door inademing van ABR in zeer kleine druppeltjes ofwel aerosolen), kunnen een indruk geven van de rol van blootstelling aan ABR in het milieu voor dragerschap van resistente bacteriën. In 2017 zal hier verder onderzoek naar worden gedaan.

2 Summary

To address the threat of antibiotic resistance, more information is needed on the occurrence and spread of resistant bacteria, resistance genes and antibiotic residues (together referred to as AMR). Exposure to AMR in the environment, for example, can occur upon contact with waste water. A previous knowledge synthesis has shown that little data is available about resistant bacteria in the environment (water, soil and air).

The most important sources of AMR in the environment are wastewater, which originates predominantly from humans, and manure from farm animals. In a collaborative research project undertaken with Sanitas Water, Wageningen University and RIKILT as part of the National Antibiotic Resistance Approach, the quantities of AMR discharged with wastewater and manure were investigated. An inventory of the management measures which could be taken to prevent dispersion into the environment was also completed.

This report describes the results of this research, which consisted of the following three components:

1. Performing "zero measurements" of the presence of AMR in wastewater and manure;
2. Gathering possible management measures to counteract the spread of AMR to the environment; and
3. Mapping research activities and knowledge partners in the Netherlands working in the field of AMR in the environment.

In this report, antibiotic resistance (AMR) refers to resistant bacteria, resistance genes and residues of antibiotics. Resistance genes have been measured because they provide additional information about the extent of the population of resistant bacteria and about changes in concentrations in this route to the environment.

Zero measurements – wastewater

Approach

Resistant bacteria, resistance genes and antibiotic residues enter sewage through secretion from people carrying bacteria and genes and using antibiotics. Waste water is collected and transported through sewage systems to waste water treatment plants (WWTPs), where it is treated to reduce nutrient contents. After treatment, the water is discharged into surface water.

To get an initial insight into the amount of AMR discharged into the environment with wastewater, concentrations of resistant bacteria, antibiotic resistance genes and residues of antibiotics in waste water at WWTPs were measured. The measurements were performed at 100 out of the total 341 WWTPs in the Netherlands in both raw waste water (influent) and wastewater after treatment (effluent). To obtain a representative selection of the WWTP, the purification techniques applied, the geographical distribution and the quantities of waste water from hospitals, outpatient clinics and care homes were taken into account.

The following particularly Resistant Microorganisms (BRMO) were investigated: ESBL-producing *Escherichia coli*, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE, and the carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, CPE) and vancomycin resistant enterococci (VRE). These bacteria are all potentially relevant to human health. Resistance genes for two groups of antibiotics were also measured, and the concentrations of residues of a number of antibiotics were determined.

Results – concentrations of resistant bacteria

ESBL-producing *E. coli* were found in all waste water samples, which is consistent with the results of previous, more limited research projects. CRE were found in the waste water of 90% of all WWTPs. The concentrations of CRE in waste water were approximately 250 times lower than the concentrations of ESBL-producing *E. coli*. This concurs with the fact that the prevalence of CRE in the Dutch population is low compared to that of ESBL-producing *E. coli* (as known from other studies).

Various types of CRE were identified, including carbapenemase-producing Enterobacteriaceae carrying the carbapenemase genes OXA-48, but also genes belonging to the class of NDM and KPC. These types have occasionally been found in outbreaks at healthcare institutions but, to date, have rarely been seen in patients in Dutch hospitals. This dataset does not allow any possible contributions from hospitals to the CRE concentrations in wastewater to be specified. Therefore, follow-up research is recommended. CRE were also found in 9 WWTPs that do not treat wastewater from hospitals or care homes. This could indicate that there is a contribution being made by the general population. International travellers may also carry CRE; travellers are therefore screened for CRE carriage to prevent any spread among risk groups. VRE were found in the waste water of 59% of the 100 WWTPs, 34 of which were not affiliated with a hospital. The concentrations of VRE could not be quantified. VRE is occasionally found in outbreaks in hospitals and sporadically in the general population.

Results: concentrations of resistance genes and residues of antibiotics

Resistance genes, specifically genes that provide resistance to the antibiotic classes - macrolides and sulfonamides - have been detected in the influent and effluent of all the WWTPs. These genes were also found in other studies in relatively high concentrations in wastewater.

Residues of several classes of antibiotics were also detected. The concentrations of residues in the incoming waste water corresponded to estimates based on the consumption of these antibiotics. How far residues of antibiotics can promote the development of resistant bacteria in the environment is still unknown. However, concentrations of antibiotics have been estimated below which selection of resistance is not expected to occur. For some antibiotics, the concentrations found in effluent are higher than these estimates indicate. These findings do not allow one to conclude whether selection of resistance actually does take place in WWTPs.

Changes in the occurrence of (particularly) resistant bacteria, resistance genes and residues of antibiotics can be determined in a non-invasive

manner by performing periodic waste water measurements in a representative sample of WWTPs. In view of the size and diversity of the manure streams in the Netherlands, this might prove more difficult for manure.

Reduction of AMR by wastewater treatment

On average, the concentrations of resistant bacteria decreased 100-1000 fold during waste water treatment, which consisted of conventional biological treatment and partly included phosphate removal and denitrification. The reduction of bacterial concentrations is identical for resistant and non-resistant bacteria. The concentrations of the tested resistance genes decreased by a factor of approximately 100 during waste water treatment. The effect of waste water treatment on concentrations of antibiotic residues varied by substance. On average, between 34 and 87% of the influent concentrations were present in effluent.

Resistant bacteria and resistance genes are, therefore, removed more efficiently from the wastewater than antibiotic residues are.

Waste water volume and loads of AMR

In the Netherlands, most (90%) of the waste water produced is treated in WWTPs. This waste water comes from households, hospitals, care homes and industry. Furthermore, a substantial amount of rainwater enters the sewer. The treated wastewater is discharged into surface water. Untreated waste water can also enter surface water during overflows and caused by faulty connections in separate drainage systems.

Based on these waste water volumes and the AMR waste water concentrations measured in this study, crude estimates of the total load of AMR can be made. Approximately 1016 colony forming units (cfu²) of ESBL-producing *E. coli* and 1013 cfu CRE enter the environment via waste water. In addition, at least 900 kg of antibiotics enter surface water. The proportion of the total load from overflows and faulty connections is estimated to be of the same order as that of the purified wastewater from the WWTPs.

Zero measurements in manure

Approach

Another important source of AMR in the environment is animal manure. Antibiotics are used in animal husbandry. Also, animals, both farm animals and domestic pets, can carry resistant bacteria and resistance genes, without any adverse health effects. These bacteria, genes and antibiotic residues are then excreted by these animals and enter the manure. Manure is used in a range of ways. Most of it is used on agricultural land, which forms an important entry route for AMR into the environment (soil, water, air). Little is known about the total amounts of AMR that enter the environment via this route.

² Colony forming units, or cfu, are a standard unit of bacterial counts; 1 cfu represents 1 bacterium which can be detected through culturing (although, strictly speaking, this is not identical to 1 viable bacterium).

In a pilot investigation, manure samples were obtained from pigs, calves, poultry, (broiler) chickens, and turkeys during transport to the manure processor. These samples were examined for the presence of ESBL-producing *E. coli*.

Results: resistant bacteria in manure

ESBL-producing *E. coli* were found in more than half of the manure samples taken from pigs and veal calves and to a lesser extent in the chicken manure. This concurs with previous findings from 2013/2014. These first (indicative) measurements therefore suggest that manure contributes to the introduction of particularly resistant bacteria (ESBL-producing *E. coli*) to the environment.

Continuation of measurements

In this pilot, resistance genes and antibiotic residues were not analysed. In 2017, this study will be continued and larger numbers of manure samples will be obtained so that an analysis of ESBL-producing *E. coli*, resistance genes and antibiotic residues can be made. In this way, the total contribution of AMR emissions from manure can be determined more accurately and can be compared with other sources (such as wastewater).

Manure volumes

In the Netherlands, most of the manure originates from dairy farms (71% of total manure mass), but veal calves and pigs also contribute to manure production. Approximately two thirds of the manure is put on land (mostly on land owned by the animal farmer) without further processing.

Intervention measures for wastewater and manure

Most WWTPs in the Netherlands apply conventional wastewater treatment techniques which reduce the concentrations of resistant bacteria and resistance genes from influent to effluent by about 100-1000, according to a literature search and the zero measurements. The concentrations of antibiotic residues also decrease, but less strongly. Innovative techniques for the advanced treatment of waste water effluents, such as activated charcoal adsorption, advanced ozone or oxidation, may lead to a further reduction of AMR by a factor of 100-100,000 (based on current limited data). For the removal of resistant bacteria, ozone or advanced oxidation seems somewhat more effective than adsorption to activated carbon.

A number of innovative techniques for manure processing are currently in use in the Netherlands (applied to 9% of total manure volume). These include techniques such as thermophilic fermentation, hygienisation, composting, burning, reverse osmosis of the wet fraction, and drying. By applying these techniques, numbers of bacteria, and probably also of resistant bacteria, can be considerably reduced. For example, it has been found that concentrations of ESBL-producing *E. coli* can be reduced substantially by composting and cofermentation. The degree of reduction, however, depends on the temperature and duration of these processes.

Overview of knowledge partners in the field of AMR in the environment

In the Netherlands, a number of knowledge institutes investigate antibiotic resistance in the environment. Research is occasionally conducted in a consortium of different knowledge institutes and occasionally in collaboration with private partners, for example, in the field of waste water treatment technology innovations or in detecting AMR in the environment.

This report gives an overview of the various past and present research projects on antibiotic resistance in the environment. We recommend that research partners in this area are brought together to address knowledge gaps in a coordinated manner.

Impact of AMR on human health

The occurrence and spread of AMR in the environment (air, water, soil and groundwater) contributes to the human exposure to AMR. The extent of the contribution made by this exposure is currently not well established. To investigate the effects of AMR in the environment on public health, multiple scientific methods may be applied. These include epidemiological studies on AMR carriage amongst people exposed to a particular route, quantitative analyses of exposure to resistant bacteria and disease burden estimates. In particular, studies in cohorts of people who have had a specific exposure to AMR could yield information on the role that environmental exposure plays in AMR carriage. These include exposure during swimming in surface water (water ingestion), or through occupational exposure in WWTPs (exposure by inhalation of AMR in very small droplets or aerosols). Further research will be conducted in 2017.

3 Inleiding

3.1 Aanleiding

Wereldwijd worden op steeds grotere schaal infecties met resistente bacteriën gesignaleerd. In sommige gevallen is geen enkel antibioticum meer werkzaam tegen een bacteriële infectie. Dit geldt ook voor de antibiotica die als laatste redmiddel kunnen worden ingezet om een infectie doelmatig te bestrijden.

In Nederland heeft het ministerie van VWS samen met de ministeries van IenM en EZ in juni 2015 een integraal Actieplan Antibioticaresistentie³ gepresenteerd. Het hier gerapporteerde onderzoek naar het voorkomen van antibioticaresistentie en resten van antibiotica in het milieu, en naar beheersmaatregelen, maakt deel uit van dit actieplan.

3.1.1 *De rol van overdracht van antibioticaresistentie via het milieu*

Uit een recente kennissynthese in opdracht van het ministerie van VWS naar vóórkomen en verspreiding van antibioticaresistentie (ABR; zie tekstbox) in het milieu bleek dat nog geen onderzoek was gedaan naar de mogelijke gevolgen van blootstelling aan Bijzonder Resistente Micro-organismen (BRMO) in het milieu (Huijbers et al., 2015). Wel zijn BRMO in meerdere onderzoeken aangetoond in milieukompartimenten waaraan mensen worden blootgesteld.

Onder meer mest en afvalwater zijn belangrijke bronnen waaruit bacteriën – en daarmee ook BRMO – van mens en dier in het milieu terechtkomen. Systematisch onderzoek in het milieu werd niet gerapporteerd, gegevens waren afkomstig van incidentele metingen naar bepaalde resistente bacteriën in een compartiment. Uitkomsten waren veelal kwalitatief en/of niet goed met elkaar te vergelijken (door verschillende criteria en kwaliteitseisen). Een beeld over de verspreiding van hoeveelheden BRMO vanuit bronnen naar het milieu ontbrak, evenals de resistentiegenen en residuen, en de mogelijkheden om verspreiding te beheersen.

Aangezien BRMO's veelvuldig bleken voor te komen in het milieu – ook op plaatsen waar mensen ermee in aanraking kunnen komen – speelt het milieu mogelijk een rol in de verspreiding van BRMO's naar de mens. Deze uitkomst is aanleiding om systematisch onderzoek naar het voorkomen van ABR in het milieu (nulmetingen) en naar bestaande en mogelijke maatregelen om verspreiding tegen te gaan, te initiëren.

³ <https://www.rijksoverheid.nl/binaries/rijksoverheid/documenten/kamerstukken/2015/06/24/kamerbrief-over-aanpak-antibioticaresistentie/kamerbrief-over-aanpak-antibioticaresistentie.pdf>

Antibioticaresistentie (ABR) betreft in dit rapport resistente bacteriën, resistentiegenen en residuen van antibiotica in het milieu. Vaak worden bacteriën, genen en residuen gescheiden onderzocht. Dergelijk gescheiden onderzoek biedt echter geen volledig zicht op de herkomst en verspreiding van ABR. Daarom integreert dit rapport deze drie aspecten.

Onderzoek naar de verspreiding van een specifieke resistente bacterie in het milieu kan bijvoorbeeld een onvolledig beeld geven omdat andere resistente bacteriën zich in het milieu anders gedragen of in andere bronnen voorkomen. Omdat sommige resistentiegenen op verschillende bacteriën kunnen voorkomen, vult onderzoek naar resistentiegenen in de gehele bacteriegemeenschap het onderzoek naar enkele bacteriesoorten aan. Ten slotte is kennis van de concentraties van antibioticaresiduen nodig om een inschatting te maken in hoeverre de verspreiding van resistentie door de aanwezigheid van residuen in het milieu kan worden versterkt.

Resistente bacteriën die zijn onderzocht zijn ESBL-producerende *Escherichia coli* (ESBL-EC), carbapenemresistente Enterobacteriaceae (CRE) en vancomycineresistente enterococcen (VRE). Deze bacteriën zijn – naast enkele anderen – geclassificeerd als zogenaamde Bijzonder Resistente Micro-organismen (BRMO), een aparte groep binnen alle resistente bacteriën.

Resistentiegenen die zijn onderzocht zijn resistentiegenen voor macroliden, sulfonamiden, en voor beta lactam antibiotica.

Residuen van antibiotica die zijn onderzocht behoren tot de klasse van sulfonamiden, tetracyclines, chinolonen, aminoglycosiden, beta lactams en macroliden (onder andere de sulfonamiden sulfamethoxazol en sufapyridine, trimethoprim, het fluorochinoloon ciprofloxacine en het tetracycline doxytetracycline).

3.2 Doel en focus

In dit project staan vier onderzoeksactiviteiten centraal:

1. **Nulmetingen** om de aanwezigheid van ABR in gezuiverd en ongezuiverd afvalwater en mest vast te stellen en de totale stromen in kaart brengen;
2. Het beschrijven van mogelijke **beheersmaatregelen** die ingezet kunnen worden om de verspreiding van ABR naar het milieu tegen te gaan; en
3. Het **in kaart brengen** van de huidige onderzoeksactiviteiten en kennispartners in Nederland.

3.3 Dit rapport

Dit rapport omvat de volgende hoofdstukken:

- Nulmetingen (**hoofdstuk 4**): resultaten van de metingen die in 2015 en 2016 in afvalwater en mest zijn verricht, de hoeveelheden afvalwater en meststromen die jaarlijks in Nederland geproduceerd worden, en de totale vrachten van ABR;

- Een overzicht van huidig toegepaste (de zogenaamd conventionele) en mogelijke innovatieve beheersmaatregelen en hun effectiviteit voor de verwijdering van ABR (**hoofdstuk 5**);
- Een overzicht van de nationale onderzoeksactiviteiten en kennispartners op het gebied van ABR in het milieu (**hoofdstuk 6**);
- Discussie en conclusies (hoofdstuk 7);
- Referenties (**hoofdstuk 8**) en bijlagen met meer details over de gebruikte methoden en de uitkomsten en een begrippenlijst (**hoofdstuk 9**).

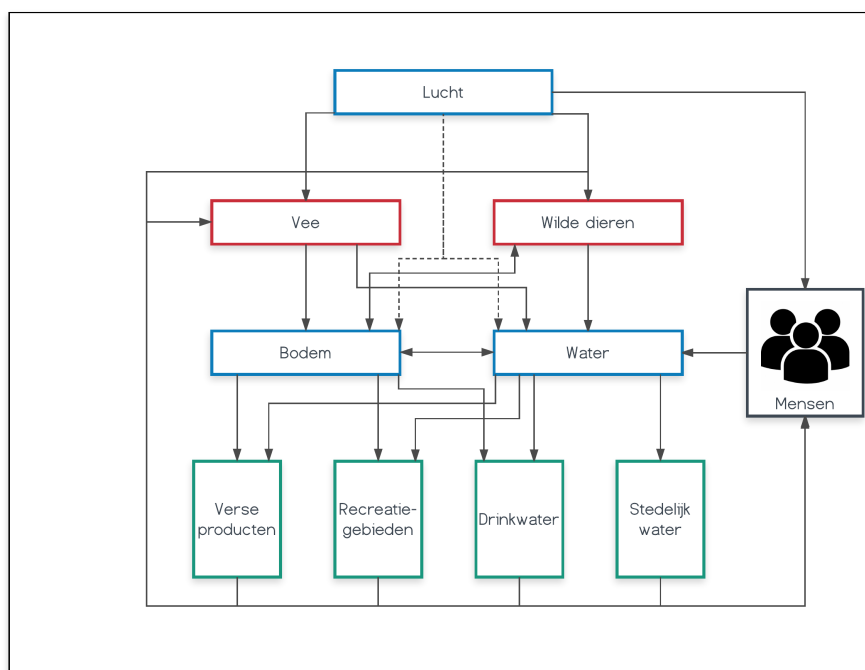
3.4 Achtergrond

De belangrijkste bronnen van antibioticaresistente bacteriën, resistentiegenen en residuen van antibiotica naar het milieu zijn afvalwater van rioolwaterzuiveringsinstallaties (humane feces), en dierlijke mest die op het land wordt uitgereden. Blootstelling van de mens kan bijvoorbeeld plaatsvinden door recreatie in oppervlaktewater.

Uit de internationale literatuur blijkt dat Bijzonder Resistente Micro-organismen (BRMO, bijvoorbeeld ESBL-producerende *E. coli*) en ook resistentiegenen en antibioticaresiduen regelmatig in afvalwater worden gevonden. Ook in mest (of te wel dierlijke feces) wordt ABR gevonden.

3.4.1 *Bronnen en verspreiding van ABR naar de mens*

Figuur 3-1 geeft een schematisch overzicht van de bronnen van ABR in het milieu (water, bodem en lucht) en de overdracht naar de mens. Belangrijke bronnen van ABR in het milieu zijn dierlijke mest en afvalwater (dit hoofdstuk en hoofdstuk 4), omdat langs deze wegen zowel antibioticumresiduen alsook resistente bacteriën en daarmee ook resistentiegenen via menselijke en dierlijke uitwerpselen uitgescheiden worden.



Figuur 3-1. De verspreiding van ABR vanuit dier (rood: vee, wild) en mens naar milieucompartimenten (blauw: water, bodem en lucht), waardoor naast direct contact met dieren, of bijvoorbeeld het nuttigen van besmet voedsel, extra blootstellingsroutes (groen) worden gecreëerd. Deze blootstelling kan uiteindelijk leiden tot een verhoogde ziektelast door ABR. Bron: Naar Huijbers et al. (2015).

Rioolwater (ruw afvalwater, oftewel 'influent') wordt na zuivering in RWZI's op het oppervlaktewater geloosd ('effluent'). Menselijke uitwerpselen bereiken vooral via deze route het milieu. Afvalwater kan echter ook dierlijke uitwerpselen bevatten (bijvoorbeeld na afspoeling van uitwerpselen van vogels en honden). Dierlijke mest van landbouwhuisdieren wordt uitgereden over weilanden en akkers, of verwerkt in mestverwerkers. Na behandeling van afvalwater en mest zullen nog resistente bacteriën, genen en residuen hierin aanwezig blijven. Hierdoor kan ABR in het oppervlaktewater, grondwater of de bodem terechtkomen. Door de aanwezigheid van antibioticaresiduen kunnen resistente bacteriën mogelijk beter overleven dan de niet-resistente bacteriën. Ook kan mogelijk overdracht plaatsvinden van resistentiegenen tussen resistente en niet-resistente bacteriën indien de concentraties van residuen hoog genoeg zijn.

Mensen kunnen blootgesteld worden aan ABR via het milieu door bijvoorbeeld te zwemmen in oppervlaktewater waarop gezuiverd rioolwater wordt geloosd. Een blootstelling kan leiden tot dragerschap en eventueel tot infectie. De mate van blootstelling aan ABR in het milieu is tot dusver echter grotendeels onbekend (Huijbers et al., 2015). Dat geldt ook voor de mogelijke gevolgen van blootstelling aan ABR voor de volksgezondheid, zoals dragerschap van resistente bacteriën en ziektelast (zie ook paragraaf 7.3).

3.4.2 *Bijzonder resistente bacteriën*

Bacteriën van humane en dierlijke afkomst komen met uitwerpselen in het milieu terecht. Het gaat hierbij vooral om darmbacteriën. De meeste darmbacteriën zijn onschadelijk voor de mens (de zogenaamde 'commensale bacteriën'). Voorbeelden hiervan zijn *Escherichia coli* en intestinale enterokokken. Commensale bacteriën spelen desalniettemin een belangrijke rol in de ABR-problematiek. Zij kunnen namelijk resistentiegenen bij zich dragen en overdragen op pathogene (ziekteverwekkende) bacteriën, die ook in uitwerpselen kunnen voorkomen. Hierbij kan het bijvoorbeeld gaan om de pathogene varianten van *Escherichia coli* en de intestinale enterokokken.

Ook pathogene bacteriën kunnen resistenties dragen. Deze bacteriën zijn dan met sommige gangbare antibiotica slechter te behandelen. De belangrijkste van de resistente ziekteverwekkende bacteriën zijn ESBL-producerende Enterobacteriaceae (ESBL-Ent, en een specifieke soort van deze: ESBL-producerende *E. coli*, ESBL-EC)), carbapenem-resistente Enterobacteriaceae (CRE (waaronder de carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae, CPE⁴)) en vancomycineresistente enterokokken (VRE). Deze bacteriën zijn – naast enkele anderen – geïdentificeerd als de zogenaamde BRMO, en zijn onderwerp van dit onderzoek.

BRMO in afvalwater – stand van kennis

Een systematisch literatuuronderzoek uitgevoerd in 2014 wees uit dat ESBL-Ent, meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), en VRE in alle studies naar afvalwater (gepubliceerd tussen 1994 en april 2014) konden worden aangetoond (Huijbers et al., 2015). Het meest onderzochte BRMO in afvalwater was VRE (33 gepubliceerde datasets), gevolgd door ESBL-producerende Enterobacteriaceae (23 datasets); MRSA was nauwelijks onderzocht (4 data sets). Slechts 11 (18%) van de datasets bevatten gegevens over de aantallen BRMO's in afvalwater; met verschillende methoden werden per liter gezuiverd afvalwater 10³ tot 10⁴ kve ESBL-Ent en 1 tot 10⁴ VRE aangetroffen. Het effect van afvalwaterbehandeling op de aantallen VRE- en ESBL-producerende bacteriën was slechts beschreven in zeven publicaties uit vijf landen: Algerije, Denemarken, Spanje, Portugal en de Verenigde Staten. De gangbare afvalwaterbehandeling leidde tot een reductie in de aantallen bacteriën met een factor 10 tot 1.000. Slechts één van deze zeven studies betrof ESBL-producerende *E. coli*. Het effect van aanvullende afvalwaterzuiveringsprocessen, zoals UV- en ozonbehandeling en zandfiltratie was in slechts drie van de (VRE-)studies onderzocht en resulteerde in een verdere reductie ten opzichte van secundaire behandeling met een factor 100 tot 1.000.

Een aanvullende literatuurstudie wees uit dat in Europa tot nu toe in Portugal, Engeland, Duitsland, Italië, Spanje en Oostenrijk de aanwezigheid van carbapenemresistentie in (ziekenhuis)afvalwater werd

⁴ De carbapenemresistentie kan onder andere veroorzaakt worden door productie van enzymen welke carbapenem antibiotica kunnen afbreken (carbapenemases). In dit geval worden de CRE ook 'carbapenemaseproducerende Enterobacteriaceae' (CPE) genoemd. Er bestaan verschillende groepen carbapenemases met verschillende eigenschappen, zoals OXA, KPC, en NDM.

onderzocht. De meeste van deze studies berichten over incidentele detectie van CRE, waaronder vaak andere Enterobacteriaceae dan *E. coli* en *Klebsiella*, en vermelden geen concentraties (Girlich et al., 2012; Vaz-Moreira et al., 2016; White et al., 2016). In Italië en Oostenrijk werden in herhaalde bemonsteringen *Klebsiella*-isolaten met carbapenemasegenen (KPC en OXA) gevonden (Galler et al., 2014; Perilli et al., 2013).

BRMO in mest – stand van kennis

Uit de in 2014 uitgevoerde kennissynthese (Huijbers et al., 2015) bleek dat er geen wetenschappelijke literatuur beschikbaar was over de aanwezigheid en concentraties van ABR in mest op het moment dat het uitgereden wordt over land. Ook waren er nog geen gegevens over het effect van uitrijden van mest op de concentraties van BRMO in de bodem.

3.4.3 *Resistentiegenen*

De afweermechanismen van resistente bacteriën tegen antibiotica worden genetisch in zogenaamde resistentiegenen vastgelegd. Door te bepalen welk genetisch materiaal zich in een reservoir of milieucompartiment (zoals mest of afvalwater) bevindt, kan in beeld gebracht worden wat de verscheidenheid is aan resistentiegenen in dat milieucompartiment. Echter, het levert geen informatie op over welk gen aan welke soort bacterie toebehoort. Deze kennis is van belang omdat alleen een beperkt aantal bacteriën tot infecties kunnen leiden. Wel kunnen veel resistentiegenen tussen bacteriële species overgedragen worden, en zo potentieel ook ziekteverwekkende species bereiken.

De gevonden resistentiegenen kunnen echter wel gebruikt worden om de omvang van de populatie van resistente bacteriën vast te stellen, alsmede de veranderingen in de concentraties van deze langs de verspreidingsroutes in het milieu. Zo kan vervolgens ook de effectiviteit van maatregelen onderzocht worden. Verder kan detectie van genen die slechts in een klein aantal bacteriën aanwezig zijn, aanwijzingen opleveren over het vóórkomen van BRMO.

Resistentiegenen in afvalwater – stand van kennis

De aanwezigheid van antibioticaresistentiegenen in afvalwater is internationaal goed onderzocht. Resistentiegenen worden regelmatig in afvalwater aangetroffen (Rizzo et al., 2013b). Een recente Nederlandse studie laat zien dat de aantallen aangetroffen resistentiegenen in afvalwatermonsters van een ziekenhuis hoger waren dan in het influent van een RWZI werd aangetoond, terwijl in het effluent weer minder variatie aan resistentiegenen gevonden werd (Buelow, 2016). De meest gevonden genen waren genen die resistentie tegen de antibiotica tetracyclinen, sulfonamiden, macroliden, aminoglycosiden en vancomycine veroorzaken. Ook in andere, internationale studies bleek afvalwaterzuivering de concentraties van resistentiegenen te verminderen (een samenvatting wordt gegeven in Rizzo et al. (2013b)).

Resistentiegenen in mest – stand van kennis

De aanwezigheid van antibioticaresistentiegenen in dierlijke feces, dierlijke mest en ook in bodems na bemesting is internationaal goed onderzocht. In veel onderzoeken ligt de focus op genen die resistenties

voor de klassen van tetracycline en sulfonamide antibiotica veroorzaken, omdat deze stoffen in veel landen in de veehouderij ingezet worden (Chee-Sanford et al., 2009; Heuer et al., 2011). Herhaald is aangetoond dat bemesting met dierlijke mest de concentraties resistentiegenen in bodem kan verhogen. De hoeveelheid resistentiegenen die door bemesting in de bodem terecht kwamen in een studie in de VS lag op 10^{12} - 10^{14} kopieën per vierkante meter bodem (Fahrenfeld et al., 2014). Ook bleven de aantallen bijna een jaar verhoogd ten opzichte van niet-bemeste gronden. Vergelijkbare resultaten werden gevonden in andere landen (Heuer et al., 2011). In Nederlandse bodem bleken volgens een studie van Geofox-Lexmond de hoeveelheden genen tegen sulfonamide en tetracycline kort na bemesting van Nederlandse bodem toe te nemen (Geofox, 2012). Tot vier weken na de bemesting bleven deze hoeveelheden hoog ten opzichte van niet-bemeste gronden.

3.4.4 *Antibioticaresiduen*

Antibioticaresiduen zijn resten van gebruikte en ongebruikte antibiotica. Antibiotica worden na gebruik in het menselijk en dierlijk lichaam niet volledig afgebroken en met urine en/of feces uitgescheiden. Antibiotica kunnen mogelijk in het milieu de ontwikkeling en selectie van resistente bacteriën bevorderen. Dit kan volgens laboratoriumproeven al bij lagere concentraties gebeuren als eerder werd verwacht (Gullberg et al., 2011). Er is echter nog onvoldoende kennis of in het milieu daadwerkelijk selectie voor resistentie optreedt. Antibiotica kunnen door hun ecotoxiciteit ook risico's voor ecosystemen vormen, zoals besproken in het RIVM rapport 'Geneesmiddelen en waterkwaliteit' (Moermond et al., 2016).

Residuen in afvalwater – stand van kennis

Residuen van nagenoeg alle klassen van antibiotica die in de gezondheidszorg worden ingezet, worden in afvalwater gevonden (Luo et al., 2014; Michael et al., 2013). De concentraties hangen af van de consumptiegegevens en afbreekbaarheid, en lopen uiteen van enkele nanogrammen per liter tot microgrammen per liter. De hoogste concentraties worden gevonden voor sulfamethoxazole, erythromycin en trimethoprim, terwijl beta lactam antibiotica (die ook in grote hoeveelheden worden ingezet) sneller afgebroken worden en daarom minder in afvalwater gedetecteerd worden (Schmitt et al., 2017). In Nederland worden bijvoorbeeld sulfamethoxazol, trimethoprim en clarithromycin in RWZI-effluenten gevonden (in concentraties rond 100 ng/L (Moermond et al., 2016)). Deze stoffen worden ook – in kleinere concentraties – in oppervlaktewater aangetroffen waarop effluenten worden geloosd.

Residuen in mest – stand van kennis

In 2015 werd in totaal 206 ton antibiotica gebruikt in de Nederlandse veehouderijsector (Veldman et al., 2016). Sinds 2007 is daarmee het gebruik van antibiotica met 63% gedaald. Na behandeling worden 10% tot, voor sommige stoffen, 90% van de toegediende hoeveelheden als residuen uitgescheiden. De concentraties van antibiotica in dierlijke mest liggen voor sulfonamiden en tetracyclinen in de orde van grootte van enkele milligrammen per kilogram mest (Heuer et al., 2011; Masse et al., 2014). Sommige antibiotica zoals beta lactams en macroliden zijn relatief snel afbreekbaar tijdens mestopslag. Andere antibiotica, zoals

tetracyclinen en fluoroquinolonen, hebben een grotere halfwaardetijd in mest en ook in bemeste grond (Schmitt et al., 2017). Berendsen et al. (2015) lieten zien dat in Nederland in driekwart van de onderzochte fecesmonsters van kalveren en 55% van de monsters van varkens ten minste één type antibioticum werd gevonden. Ook hier werden vooral tetracyclinen en sulfonamiden gevonden, en de concentraties lagen tussen enkele $\mu\text{g}/\text{kg}$ tot mg/kg .

4 ABR in het milieu in 2016 (nulmetingen)

Door nulmetingen uit te voeren kan bepaald worden in welke mate ABR (resistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen) momenteel in het milieu aanwezig is. In dit onderzoek zijn voor het eerst in Nederland nulmetingen in afvalwater en mest uitgevoerd, omdat deze de twee belangrijkste bronnen van ABR in het milieu vormen. In combinatie met de totale hoeveelheden afvalwater en mest kunnen resultaten van de nulmetingen geëxtrapoleerd worden naar schattingen over de totale hoeveelheden ABR die jaarlijks in het milieu terecht komen. Aanvullend op de huidige gefragmenteerde kennis geven deze nulmetingen een landelijk beeld van de huidige aanwezigheid van ABR in afvalwater (en een indicatief beeld voor mest).

Herhaalde metingen in afvalwater en mest kunnen informatie geven over de mogelijke effecten op de uitstoot van ABR naar het milieu door veranderingen in beleid. Met herhaalde afvalwatermetingen kunnen ook op een niet-invasieve manier veranderingen in de prevalentie van zelden voorkomende BRMO vastgesteld worden.

In dit hoofdstuk worden eerst de nulmetingen voor afvalwater en mest besproken, en daarna de totale afvalwater- en meststromen in Nederland. Ten slotte worden de totale lozingen van ABR naar het milieu besproken.

4.1 ABR in afvalwater

Antibioticaresistentie (ABR) bereikt met afvalwater het milieu. ESBL-producerende *E. coli* werden in influent en effluent van alle RWZI's (100%) aangetroffen, en carbapenemresistente Enterobacteriaceae (CRE) bij 90% van de RWZI's. De concentraties CRE in afvalwater waren ongeveer 250 keer lager dan die van ESBL-producerende *E. coli*. De hoeveelheid residuen aangetroffen in influent kwam grotendeels overeen met de gebruikte hoeveelheden van deze stoffen. Antibioticaresiduen werden in de RWZI's slechter verwijderd dan resistente bacteriën en resistentiegenen.

Extrapolatie van de resultaten van deze metingen in effluent van de 100 onderzochte RWZI's naar de overige RWZI's laten zien dat jaarlijks ongeveer 10^{16} kve ESBL-producerende *E. coli* en 10^{13} kve carbapenemresistente Enterobacteriaceae en meer dan 900 kg antibiotica het milieu bereiken. De vrachten aan genen bedragen ongeveer 10^{19} kopieën van het macrolide resistentiegen *ermB* en 10^{20} kopieën van het sulfonamide resistentiegen *sul1*.

In 2016 werden metingen in afvalwater van een representatieve steekproef van (100 van de 341) Nederlandse RWZI's uitgevoerd, rekening houdend met de capaciteit, aanvoer van afvalwater van zorginstellingen, en toegepaste zuiveringstechnieken. In dit hoofdstuk worden eerst de resultaten van de metingen van resistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen in deze monsters besproken.

Daarna worden de afvalwaterstromen samengevat, en de totale hoeveelheden berekend die jaarlijks het milieu binnenkomen.

4.1.1 Nulmetingen - resistente bacteriën

Meetplan nulmetingen

In totaal zijn 100 van de 341 Nederlandse RWZI's bemonsterd. Omdat RWZI's sterk kunnen verschillen in capaciteit, toegepaste zuiveringstechnieken en het aantal aangesloten zorginstellingen en huishoudens, is hiermee rekening gehouden bij de selectie. Zie voor een overzicht van alle geselecteerde RWZI's Figuur 4-1. Meer informatie over het meetplan en de selectie en de eigenschappen van de onderzochte afvalwaterzuiveringsinstallaties zijn weergegeven in Bijlage 9.2-9.4. De onderzoeksmethoden zijn beschreven in Bijlage 9.5.



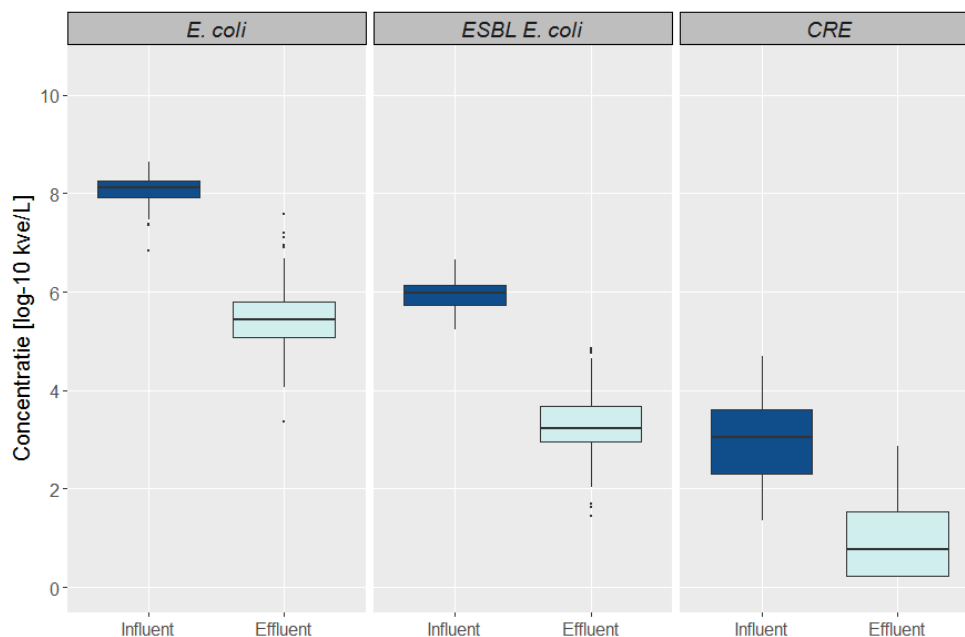
Figuur 4-1. Overzicht van alle bemonsterde RWZI's (oranje), de niet-bemonsterde RWZI's zijn in groen aangegeven.

Prevalentie en concentraties ESBL - *E. coli* en CRE

ESBL-producerende *E. coli* werden in het influent en effluent van alle 100 RWZI's aangetroffen. De gemiddelde concentratie van dit type bacteriën was $1,1 \times 10^6$ kve/L (mediaan: $9,3 \times 10^5$ kve/L, tussen $1,7 \times 10^5$ en $4,7 \times 10^6$) in influent, en $6,7 \times 10^3$ kve/L (mediaan: $1,7 \times 10^3$, tussen $2,8 \times 10^1$ en $6,9 \times 10^4$) in effluent. De verwijdering van ESBL-producerende *E. coli* was gelijk aan de verwijdering van *E. coli*: gemiddeld lagen de concentraties *E. coli* en ESBL-EC in effluent 400 keer lager dan in influent (wat overeenkomt met een verwijdering van 2,6 log

met een standaarddeviatie van 0,7 log, zie Bijlage 9.6). De concentraties aan ESBL-producerende *E. coli* waren ongeveer 100x lager dan die van *E. coli* – gemiddeld produceerden dus ongeveer 1 op de 100 *E. coli*'s ESBL.

Carbapenemresistente Enterobacteriaceae (CRE) werden in afvalwater afkomstig van 90 van de 100 RWZI's (90%) aangetroffen, in 88% van de influenten en 53% van de effluenten. De gemiddelde concentratie was $3,3 \times 10^3$ kve/L (tussen minder dan 23 en $5,0 \times 10^4$) in influent, en $4,5 \times 10^1$ kve/L (tussen < 2 en $7,4 \times 10^2$) in effluent (Figuur 4-2). De verwijdering van CRE is vergelijkbaar aan die van niet-resistente *E. coli* (zie Bijlage 9.6). In de 88 CRE-positieve influenten was gemiddeld 1 op de 5×10^4 *E. coli* carbapenemresistent. De verhouding totale carbapenemresistente Enterobacteriaceae ten opzichte van *E. coli* was 1 op de $2,8 \times 10^4$ *E. coli* oftewel 0,004%.



Figuur 4-2. Concentraties van *E. coli*, ESBL-producerende *E. coli* en carbapenemresistente Enterobacteriaceae in influent (donkerblauw) en effluent (lichtblauw) afkomstig van 100 RWZI. Het kader geeft de mediaan en het eerste en derde kwartiel van alle waarnemingen aan, en de lijnen omvatten de laagste en hoogste waarnemingen (met uitschieters als punten weergegeven).

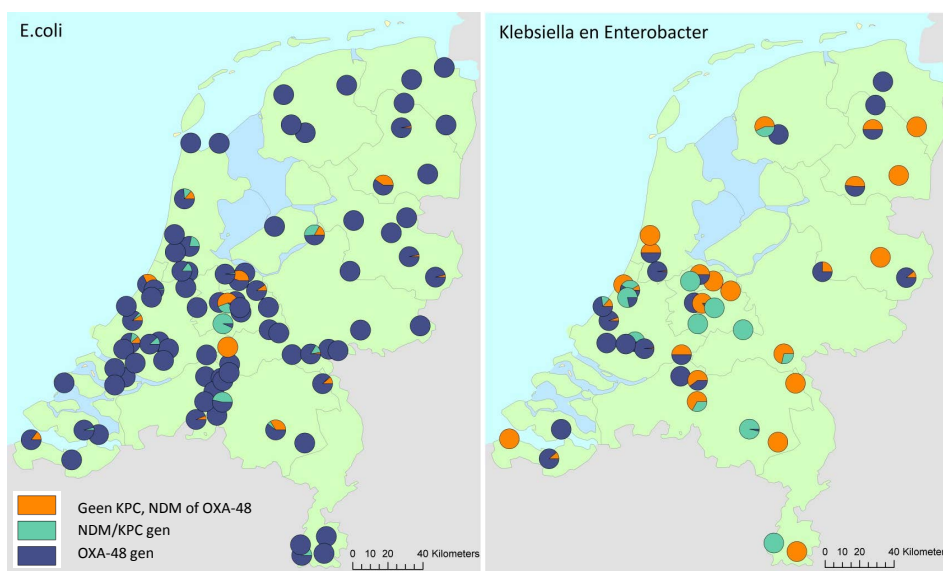
Aanwezigheid van verschillende CRE-typen

Van aangetoonde CRE werden zowel de carbapenemresistentie als bacteriesoort getypeerd om overeenkomsten of verschillen met CRE-stammen uit de gezondheidszorg te kunnen vaststellen. De meest voorkomende CRE waren *E. coli* die carbapenemases produceren (CPE) die tot de OXA-48-groep behoren (verder 'OXA-48*' genoemd): deze werden in influent van 88% van de RWZI's aangetroffen (Tabel 4-1). Van de KPC- en NDM-positieve CPE was NDM-5 *E. coli* de meest voorkomende: deze werd aangetroffen in afvalwater van 15 van de RWZI's (in 14 influenten en een effluent). Het OXA-48-gen kwam verspreid over het hele land voor, de overige carbapenemase genen

werden vaker, maar zeker niet exclusief, in de Randstad gedetecteerd (Figuur 4-3). Bij uitbraken in zorginstellingen zijn deze typen eerder een enkele keer aangetroffen, bij patiënten in Nederlandse ziekenhuizen worden ze vooralsnog zelden gezien. Er werden ook CRE gevonden die geen van de CPE-genen van de groepen OXA, NDM of KPC bevatten; dit werd vooral waargenomen bij *K. pneumoniae* en *Enterobacter. spp* (Figuur 4-3).

Tabel 4-1. Typen CPE in Nederlands afvalwater.

Carbapenemase gen	Species	Aantal RWZI's
KPC-2	<i>E. coli</i>	3
	<i>K. pneumoniae</i>	8
	<i>E. cloacae</i>	1
NDM-1	<i>E. coli</i>	3
	<i>K. pneumoniae</i>	6
NDM-5	<i>E. coli</i>	15
NDM-7	<i>E. coli</i>	1
OXA-48	<i>E. coli</i>	82
	<i>K. pneumoniae</i>	29
	<i>E. aerogenes</i>	1
OXA-181	<i>E. coli</i>	29
	<i>K. pneumoniae</i>	7
	<i>E. cloacae</i>	1
OXA-162	<i>K. pneumoniae</i>	1



Figuur 4-3. De verspreiding van carbapenemase genen over de 100 onderzochte RWZI's. Links het aandeel van *E. coli* met een NDM/KPC- of OXA-gen aan de totale carbapenemresistente *E. coli*, en rechts het aandeel van *Klebsiella* en *Enterobacter* met een NDM/KPC- of OXA-gen aan de totale carbapenemresistente *Klebsiella* en *Enterobacter*. Van alle onderzochte carbapenemresistente *E. coli* bevatten 86% de CPE genen OXA, NDM of KPC, en van alle carbapenemresistente *K. pneumoniae* en *Enterobacter spp.* bevatten 69% en 14% de CPE genen OXA, NDM of KPC.

Prevalentie en soorten VRE

Van vancomycineresistente enterokokken (VRE) zijn geen concentraties verkregen VRE werden in afvalwater van 59 van de 100 RWZI's (59%) aangetroffen, in 55% van de influenten en 42% van de effluënten (in vier RWZI's alleen in effluent). Er werden meerdere soorten vancomycineresistente enterokokken gevonden. De meeste VRE-varianten waren geassocieerd met het vanA-gen en een deel met het vanB-gen. Deze genen verlenen een variabel tot hoog niveau van resistentie voor vancomycine (Cattoir and Leclercq, 2013). In Bijlage 9.6 zijn de resultaten van de VRE-analyses in detail weergegeven.

Risicofactoren voor de aanwezigheid van resistente bacteriën in afvalwater

Om mogelijke bronnen van resistente bacteriën in het afvalwater te achterhalen, werden analyses naar het verband tussen de gevonden concentraties en de grootte van de RWZI's en aanwezig/afwezigheid van ziekenhuizen uitgevoerd.

De concentraties aan ESBL-EC zijn in RWZI's met ziekenhuizen niet hoger dan in RWZI's waarop geen ziekenhuizen aangesloten zijn. Ook de capaciteit van de zuivering leidt niet tot significant hogere concentraties aan ESBL-EC.

Wel werden significant hogere CRE-concentraties in afvalwater van grotere RWZI's gevonden. De grootte van de RWZI verklaarde ongeveer eenderde van de totale variatie in CRE-concentraties. De gemiddelde CRE-concentratie in afvalwater van de 25 grootste RWZI's ($7,8 \times 10^3$ kve/L) was 22x hoger dan de concentratie in de 24 kleinste RWZI's ($3,5 \times 10^2$ kve/L) (zie Bijlage 9.6 voor meer detail). Dit betekent dat grote RWZI's te maken hebben met relatief meer lozingen (extra bronnen) of relatief grotere lozingen van CRE (per inwoner of per volume geproduceerd afvalwater) dan de kleinere RWZI's.

Eén van de mogelijke extra bronnen zouden zorginstellingen, en specifiek ziekenhuizen, kunnen zijn. Echter, het effect van ziekenhuizen op het voorkomen van CRE kan met de huidige gegevens niet eenduidig worden vastgesteld. Ziekenhuizen zijn namelijk alleen op grotere RWZI's aangesloten en er zijn geen grote RWZI's zonder ziekenhuizen. Wel werden CRE in afvalwater van negen RWZI's aangetoond waarop geen ziekenhuis en geen zorginstelling was aangesloten, en in afvalwater van 36 RWZI's waarop alleen zorginstellingen maar geen ziekenhuis was aangesloten. Dit zou kunnen wijzen op een bijdrage vanuit de algemene bevolking. Ook reizigers kunnen een bron van CRE zijn (Leverstein-van Hall et al., 2010).

Ook VRE komen vaker in afvalwater van grote RWZI's voor: de totale VRE-prevalentie was 2 tot 2,5 keer zo hoog in de grootste RWZI's (82 en 100%) als in de kleinste RWZI's (42%). VRE werden in 34 RWZI's zonder duidelijk aangesloten ziekenhuizen gevonden. Uit andere studies is gebleken dat VRE geregeld worden aangetroffen bij uitbraken in ziekenhuizen en sporadisch bij de algemene bevolking (SWAB, 2015).

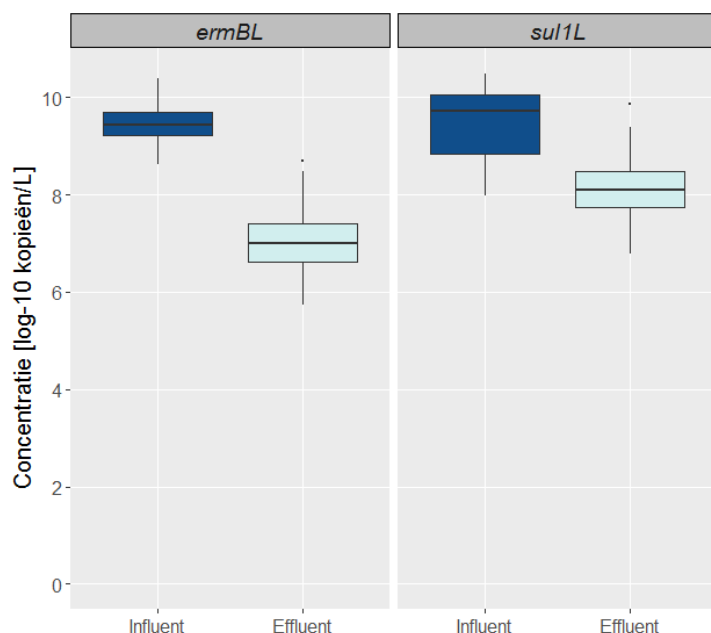
4.1.2 Nulmetingen - resistentiegenen

In genetisch materiaal afkomstig uit influent- en effluentmonsters werden de resistentiegenen *ermB*, *sul1* en CTX-M1 aangetoond, die coderen voor respectievelijk macrolide-, sulfonamide- en ESBL-resistentie (Figuur 4-4). De concentraties *ermB*- en *sul1*-genen in effluent-monsters was ongeveer 100 keer lager dan in het influent. De concentraties van *ermB* werden sterker gereduceerd dan die van *sul1* (2,5 log reductie voor *ermB* en 1,3 log reductie voor *sul1*). De concentraties *sul1* en *ermB* kwamen overeen met concentraties gemeten in andere onderzoeken (Wang et al., 2015; Czekalski et al., 2014).

Niet alleen de concentraties van de resistentiegenen nemen in de zuivering af. Effluent bevat ook een lagere concentratie van niet-resistente bacteriën. Om na te gaan of de resistente bacteriën de zuivering beter overleven dan niet-resistente bacteriën, werd de verhouding van de resistentiegenen tot de totale concentraties bacterieel DNA bepaald. Dit is ongeveer vergelijkbaar met het percentage van de bacteriën dat dit resistentiegen draagt (bacterieel DNA werd gemeten als de concentratie van het 16S rDNA gen). De hoeveelheid resistentiegenen per bacterieel DNA was voor *sul1* in effluent en influent gelijk. Voor *ermB* was de hoeveelheid resistentiegenen per bacterieel DNA in effluent lager dan in influent. Dit betekent dat het percentage bacteriën dat een sulfonamideresistentiegen droeg tijdens de afvalwaterzuivering constant bleef, het percentage bacteriën met een erythromycineresistentiegen nam af (Bijlage 9.6). Geconcludeerd wordt dat de hier onderzochte resistenties in de zuivering dus in dezelfde mate of zelfs nog sterker werden gereduceerd dan alle bacteriën samen.

Tabel 4-2. Resistentiegenen voor macroliden en sulfonamiden in influent en effluent.

Resistentiegen	Influent		Effluent		log verwijdering Gemiddeld (mediaan, min-max, %)
	% van de RWZI	Gemiddelde concentratie (mediaan, min-max) [log kopieën/L]	% van de RWZI	Gemiddelde concentratie (mediaan, min-max) [log kopieën/L]	
<i>ermB</i>	96	9,5 (9,5, 8,7-10,2)	90	7,0 (7,0, 5,7-8,0)	2,5 (2,5, 0,6-4,0, 99,6%)
<i>sul1</i>	98	9,9 (10,0, 9,0-10,5)	98	8,2 (8,1, 7,0-9,3)	1,3 (1,4, 0,5-2,7, 96%)



Figuur 4-4. Concentraties van de resistentiegenen *ermB* (links) en *sul1* (rechts) in influent (donkerblauw) en effluent (lichtblauw) van RWZI's. Het kader geeft de mediaan en het eerste en derde kwartiel van alle waarnemingen aan, en de lijnen omvatten de laagste en hoogste waarnemingen (met uitschieters als punten weergegeven).

4.1.3 Nulmetingen - residuen van antibiotica

De meest aangetroffen antibioticumresiduen in influent en effluent van RWZI's zijn de sulfonamiden sulfamethoxazol en sulfapyridine, trimethoprim, en het fluorochinoloon ciprofloxacin (Figuur 4-5 en Tabel 4-3).

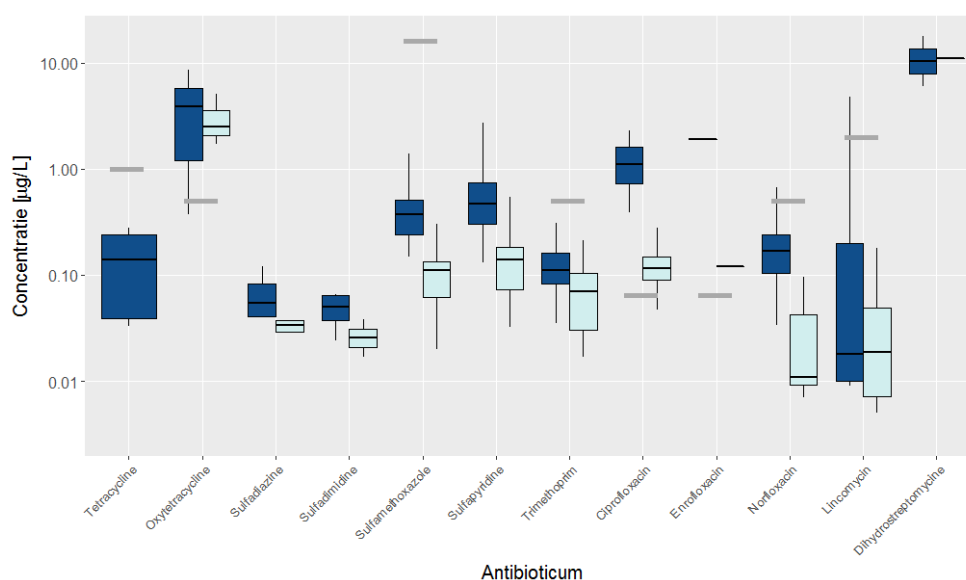
Tabel 4-3 toont de gevonden concentraties, alsook de afname in concentratie door het toepassen van zuiveringstechnieken van de residuen die in meer dan 25% van de influentmonsters aangetroffen werden.

Beta-lactam antibiotica werden niet in het afvalwater gevonden, hoewel deze breed worden toegepast. Dit wordt vooral veroorzaakt door de snelle afbraak in het lichaam. De twee meest gebruikte antibiotica uit de macroliden-groep werden niet onderzocht omdat de analysemethode daarvoor nog niet was ontwikkeld (clarithromycine en azithromycine).

Mogelijk kunnen antibioticaresiduen in het milieu tot het ontstaan of overleven van resistente bacteriën leiden. Door Bengtsson-Palme en Larsson (2016) werden met behulp van gegevensverzamelingen van de antibioticagevoeligheid van pathogenen concentraties van antibiotica geschat waaronder geen selectie van resistentie meer te verwachten is (Predicted no effect concentration for selection). Deze concentraties zijn, samen met de in deze studie in afvalwater aangetoonde concentraties, in Figuur 4-5 weergegeven. Voor enkele antibiotica liggen de gevonden concentraties in het influent en effluent hoger dan de schattingen van Bengtsson-Palme en Larsson (2016).

Tabel 4-3. Antibioticaresiduen in influent en effluent.

Antibiotica	Influent		Effluent		% reductie
	% van de RWZI	Gemiddelde concentratie (median, minmax) [ng/L]	% van de RWZI	Gemiddelde concentratie (median, min-max) [ng/L]	
Ciprofloxacin	100	1166 (1100, 390-2300)	95	126 (115, 47-280)	87 (90, 67-95)
Sulfamethoxazol	100	430 (370, 23-1400)	98	109 (110, 20-300)	71 (72, 13-92)
Sulfapyridin	98	589 (465, 130-2700)	98	147 (140, 11-540)	71 (76, 7-93)
Trimethoprim	98	125 (110, 35-310)	89	75 (70, 17-210)	39 (28, -193-91)
Norfloxacin	60	203 (170, 34-670)	14	33 (11, 7-95)	85 (86, 74-94)
Doxycylin	47	551 (330, 210-4600)	9	123 (82, 58-270)	75 (75,64-85)
Sulfadiazin	29	59 (54, 3-120)	11	43 (34, 3-110)	34 (66, -104-97)



Figuur 4-5. Aanwezigheid van antibiotica in afvalwater van de onderzochte RWZI's – verdeling van concentraties in influent (donkerblauw) en effluent (lichtblauw). Het kader geeft de mediaan en het eerste en derde kwartiel van alle waarnemingen aan, en de lijnen omvatten de laagste en hoogste waarnemingen (met uitschieters als punten weergegeven). De geschatte concentraties van Bengtsson-Palme en Larsson (2016) waaronder geen selectie voor antibioticaresistentie meer optreedt zijn als grijze balken weergegeven.

Theoretisch kunnen de concentraties in influent aan de hand van de hoeveelheid gebruikte antibiotica geschat worden, indien bekend is hoeveel antibiotica weer uit het lichaam worden uitgescheiden. Met gegevens over de mate van uitscheiding van antibiotica door mensen en de hoeveelheid afvalwater in de onderzochte RWZI werd onderzocht of de gevonden concentraties overeenkwamen met de gebruiksgegevens (bijlage, Figuur 9-7). Voor sulfamethoxazol en ciprofloxacin (waarvan veel literatuur- en meetgegevens bestaan) komen de schattingen goed overeen met de gevonden concentraties. De concentraties van trimethoprim zijn iets lager dan aan de hand van deze schattingen te verwachten was.

4.1.4 *Afvalwaterstromen in Nederland*

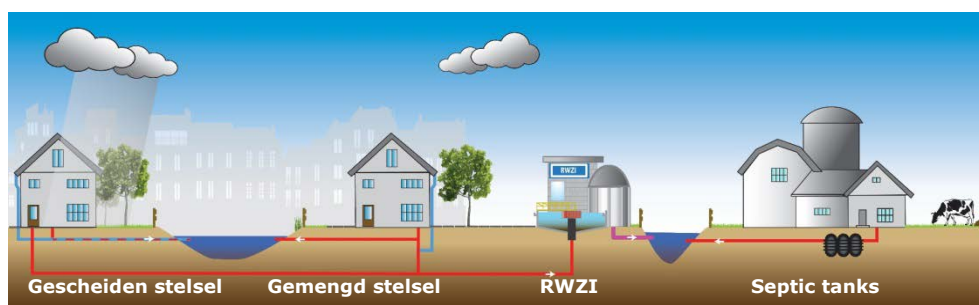
Regenwater en afvalwater van huishoudens, ziekenhuizen, verzorgingshuizen en bedrijven wordt verzameld via het lokale rioleringsstelsel. Het merendeel wordt afgevoerd naar een RWZI, die het afvalwater zodanig zuivert dat de kwaliteit geschikt is voor lozing op het oppervlaktewater. Bij sterk verhoogde neerslaghoeveelheden kan het rioleringsstelsel tijdelijk worden overbelast en wordt onbehandeld afvalwater via overstorten geloosd op het oppervlaktewater.

Van al het geproduceerde leidingwater (1.076 miljoen m³ in peiljaar 2013) was ongeveer 72% bestemd voor huishoudens, 1,2% voor zorginstellingen en de overige 27% voor de zakelijke markt (berekend met data van de Emissieregistratie (DELTA-RES and TNO, 2016) en eigen schattingen van het waterverbruik van zorginstellingen, zie Bijlage 9.8).

Type rioleringsstelsels

Geschat wordt dat ongeveer 90% van het (gebruikte) leidingwater als afvalwater wordt afgevoerd naar een RWZI via meerdere soorten rioleringsstelsels. Figuur 4-5 geeft een overzicht van de meest-voorkomende rioolstelsels in Nederland:

- Gemengd stelsel (68,7%): vermenging van afvalwater met regenwater en afvoer naar de RWZI.
- Gescheiden riolering (23,6%): afvoer van afvalwater naar de RWZI en afvoer van hemelwater naar het oppervlaktewater. Het percentage foute aansluitingen wordt geschat op ongeveer 3%.
- Verbeterd gescheiden riolering (7,7%): gerealiseerd om het effect van foute aansluitingen te verminderen. In principe wordt het hemelwater afgevoerd naar de RWZI. In geval van piekbuien wordt het hemelwater echter op het oppervlaktewater geloosd, zodat er minder vaak overstort plaatsvindt van de droogweerafvoer (DWA).
- Daarnaast wordt in het buitengebied, waar huishoudens niet zijn aangesloten op riolering, het afvalwater verwerkt in zogenaamde IBA's (Individuele Behandeling van Afvalwater). Dit is een systeem dat het huishoudelijk afvalwater van één huishouden zuivert.



Figuur 4-6. Overzicht van de meest voorkomende rioleringsstelsels in Nederland. De meeste huishoudens en bedrijven zijn aangesloten op gemengde stelsels (midden links), waarvan het afval- en regenwater normaliter wordt afgevoerd naar de RWZI (midden rechts). In geval van hevige neerslag vindt er overstort plaats op het oppervlaktewater (bovenste horizontale lijn). Gescheiden stelsels (links), daarentegen, maken onderscheid in afvoer van hemelwater en afvalwater. Een klein aantal huishoudens is aangesloten op een IBA (rechts).

Lozingen op het oppervlaktewater

De waterstroom naar de RWZI's bestaat uit het gebruikte drinkwater, en regenwater en infiltrerend grondwater. Jaarlijks lozen RWZI's circa 1.900 miljoen m³/jaar gezuiverd effluent op het oppervlaktewater. Het water dat ongezuiverd op het oppervlaktewater geloosd wordt is afkomstig van (DELTA RES and TNO, 2016):

- Overstorten vanuit een gemengd stelsel (29 miljoen m³ per jaar) waarvan naar schatting 1 tot 10% ongezuiverd afvalwater is en de rest hemelwater;
- Hemelwateruitlaten vanuit een gescheiden stelsel: in totaal 253 miljoen m³ per jaar, waarvan naar schatting circa 1% ongezuiverd afvalwater betreft;
- Hemelwateruitlaten vanuit een verbeterd gescheiden stelsel: in totaal 16 miljoen m³ per jaar waarvan naar schatting minder dan 1% ongezuiverd afvalwater betreft;
- IBA's: 3 miljoen m³ per jaar;
- Lekkages vanuit de riolering: ongeveer 15 miljoen m³ per jaar ongezuiverd water.

4.1.5 Totale lozing van ABR via afvalwater op het milieu

De gemeten concentraties resistente bacteriën, resistentiegenen en residuen van antibiotica in afvalwater (effluent) zijn met de totale hoeveelheden afvalwater vermenigvuldigd om een beeld te krijgen van de totale concentraties (Tabel 4-4) en totale vrachten (Tabel 4-5-Tabel 4-7). Deze getallen berusten op een aantal aannamen:

1. Voor overstorten en effluenten van foutaansluitingen zijn nog geen concentraties van bacteriën, genen of antibiotica bekend. De schattingen zijn daarom gebaseerd op concentraties in RWZI influent en effluent, aangezien overstorten en foutaansluitingen ongezuiverd, maar met regenwater verdund afvalwater bevatten.
2. CRE werden niet in alle effluentmonsters aangetroffen. Aangezien CRE in de meeste influentmonsters werden aangetroffen, is aannemelijk dat CRE aanwezig waren, maar beneden de detectielimiet van de onderzoeksmethode lagen. Daarom werd voor deze schattingen aangenomen dat CRE in alle effluentmonsters voorkwamen, en dat de concentraties met behulp van de concentraties van *E. coli* in effluent en de

verhouding van CRE en *E. coli* in influent geschat kunnen worden (aannemend de verhouding van CRE over *E. coli* in influent en effluent gelijk is).

De geschatte vrachten aan bacteriën en resistentiegenen die via overstorten en foutaansluitingen op oppervlaktewater worden geloosd kan volgens deze schattingen vergelijkbaar groot zijn als de vracht via RWZI-effluenten. Daarmee lijken overstorten en foutaansluitingen – volgens deze extrapolaties – een belangrijke transmissieroute te kunnen zijn van (ABR-)bacteriën naar Nederlands oppervlaktewater. Voor antibioticaresiduen hebben RWZI-effluenten het grootste aandeel aan de totale vrachten.

De totale hoeveelheden ABR die op het Nederlandse oppervlaktewater geloosd worden bedragen ongeveer 10^{16} kve ESBL-producerende *E. coli*, 10^{13} kve CRE, en 10^{19} kopieën van het macrolide resistentiegen *ermB* en 10^{20} kopieën van het sulfonamide resistentiegen *sul1*. Van de vier antibiotica die in nagenoeg alle effluentmonsters aangetoond konden worden, wordt in totaal ongeveer 900 kg antibiotica op het oppervlaktewater geloosd. Dit is de ondergrens van de geloosde hoeveelheden antibiotica, aangezien andere antibiotica ook in een deel van de RWZI-effluenten werden aangetroffen, en enkele antibiotica niet werden gemeten.

Afvalwater wordt verdund zodra het het oppervlaktewater bereikt door lozing. Voor een schatting van de maximale concentraties van CRE in oppervlaktewater kan aangenomen worden dat oppervlaktewater voor 0 tot 90% uit RWZI-effluent en/of ongezuiverde lozingen bestaat. De concentratie CRE in oppervlaktewater kan op basis van de metingen en deze aanname maximaal 4000 kve per liter bedragen.

Tabel 4-4. Extrapolatie van bacterieconcentraties in RWZI-effluent naar ongezuiverde lozingen.

	Totale <i>E. coli</i>	ESBL <i>E.coli</i>	CRE
	Concentratie [kve/L]	Concentratie [kve/L]	Concentratie [kve/L]
RWZI-effluent	$2,7 \times 10^5$ a	$1,7 \times 10^3$ a	$9,6 \times 10^0$ b,c
Gemengde riolering (overstorten)	$2,7 \times 10^5$ – $1,4 \times 10^8$ d	$1,7 \times 10^3$ – $9,3 \times 10^5$ d	$9,6 \times 10^0$ – $4,8 \times 10^3$ d,c
Gescheiden en verbeterd gescheiden riolering (hemelwater-uitlaat)**	$1,4 \times 10^8$ e	$9,3 \times 10^5$ e	$4,8 \times 10^3$ f

a Gemeten in de nulmetingen.

b Gebaseerd op concentraties van *E. coli* in RWZI-effluent (median).

c Gebaseerd op de verhouding van CRE per *E. coli* (gemiddelde over alle CRE-positieve RWZI-influenten), ervan uitgaande dat CRE in elk effluent voorkomt, en in sommige RWZI onder het detectielimiet ligt.

d Omdat in overstorten met regenwater verdund ongezuiverd afvalwater geloosd wordt, wordt hier aangenomen dat de concentraties tussen de concentraties in ruw afvalwater (effluent) en gezuiverd afvalwater (influent) zoals gemeten in de nulmetingen liggen.

e Gebaseerd op concentraties van *E. coli* / ESBL-producerende *E. coli* in RWZI-influent gemeten in de nulmetingen (median).

f Gebaseerd op (e) en (c).

Tabel 4-5. Schatting van de vrachten resistente bacteriën vanuit RWZI- effluent, overstort en hemelwateruitlaten naar het oppervlaktewater

	Volume [10 ⁶ m ³ /jaar]	Totale <i>E. coli</i> Vracht [kve/jaar]	ESBL <i>E.coli</i> Vracht [kve/jaar]	CRE Vracht [kve/jaar]
RWZI	1900	$5,1 \times 10^{17}$	$3,2 \times 10^{15}$	$1,8 \times 10^{13}$
Gemengde riolering (overstorten)	29	$7,8 \times 10^{15}$ – $4,0 \times 10^{18}$	$4,9 \times 10^{13}$ – $2,7 \times 10^{16}$	$2,8 \times 10^{11}$ – $1,4 \times 10^{14}$
Gescheiden en verbeterd gescheiden riolering (hemelwater- uitlaat)**	2,7	$3,7 \times 10^{17}$	$2,5 \times 10^{15}$	$1,3 \times 10^{13}$

* Gebaseerd op 1% afvalwater in hemelwater uit gescheiden en verbeterd gescheiden riolering.

Tabel 4-6. Schatting van de vrachten resistentiegenen vanuit RWZI- effluent, overstort en hemelwateruitlaten naar het oppervlaktewater

	<i>ermB</i> Vracht [kve/jaar]	<i>sul1</i> Vracht [kve/jaar]
RWZI	$1,9 \times 10^{19}$	$2,4 \times 10^{20}$
Gemengde riolering (overstorten)	$2,9 \times 10^{17}$ – $9,2 \times 10^{19}$	$3,7 \times 10^{18}$ – $2,9 \times 10^{20}$
Gescheiden en verbeterd gescheiden riolering (hemelwateruitlaat)	$8,5 \times 10^{18}$	$2,7 \times 10^{19}$

Tabel 4-7. Schatting van concentraties van antibiotica in RWZI-effluent naar totale vrachten die op het oppervlaktewater geloosd worden

	Sulfameth- oxazol Vracht [kg/jaar]	Sulfa- pyridin Vracht [kg/jaar]	Cipro- floxacin Vracht [kg/jaar]	Trime- thoprim Vracht [kg/jaar]
RWZI	209	266	219	133
Gemengde riolering (overstorten)	3-11	4-17	3-32	2-3
Gescheiden en verbeterd gescheiden riolering (hemelwateruitlaat)	1	1,6	3	0,3

4.2 ABR in mest

In een pilot onderzoek naar opgeslagen mest werden ESBL-producerende *E. coli* vooral aangetroffen in mest van vleeskalveren, varkens en pluimvee. Dit stemt overeen met eerdere bevindingen en wijst op een bijdrage van mest aan de introductie van BRMO's (ESBL-producerende *E. coli*) naar het milieu. Met vervolgmetingen in mest kan de totale bijdrage van mest aan de emissie van ABR nauwkeuriger worden bepaald, en met andere stromen (zoals afvalwater) worden vergeleken.

De grootste meststroom in Nederland omvat mest van melkvee (71% van de totale hoeveelheid mest [in massa]), gevolgd door mest van vleeskalveren en varkens. Ongeveer tweederde van de mest wordt zonder bewerking op het land uitgereden, meestal op eigen land.

In dit hoofdstuk worden eerst de resultaten van metingen van resistente bacteriën in mestmonsters besproken, dan worden de meststromen samengevat.

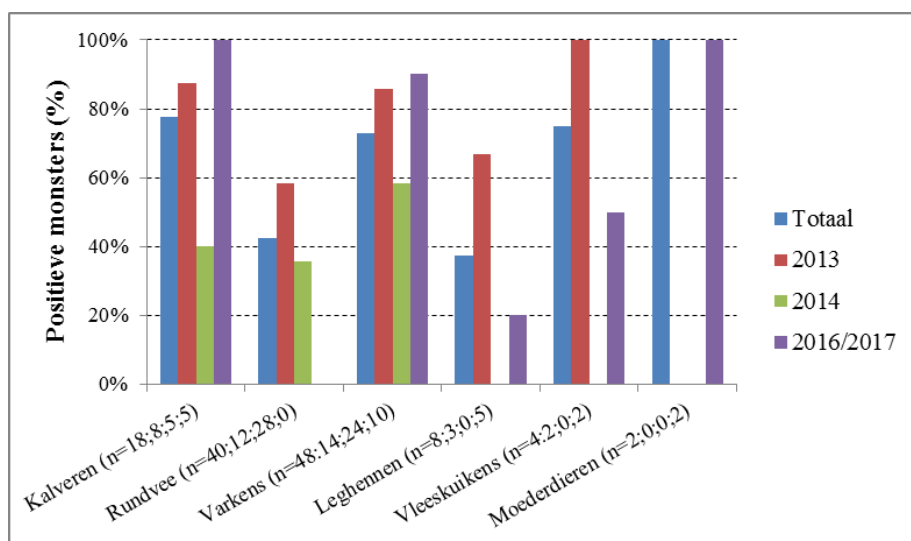
4.2.1 Pilotmetingen 2016 en eerdere metingen

In het najaar van 2016 en voorjaar van 2017 werden pilotmetingen uitgevoerd naar het voorkomen van ABR in verschillende soorten mest. Daarmee werd getracht het voorkomen van resistente bacteriën en residuen in opgeslagen mest te schatten. Ook in een eerdere studie (Strategisch Project RIVM 'ESBL in fresh produce') uit 2013 en 2014 werden verschillende soorten mest onderzocht op ESBL-producerende *E. coli* (ESBL-EC) en de hieraan verwante resistente bacteriesoort AmpC-EC. De resultaten van beide studies zijn opgenomen in dit rapport. Het meetplan en de meetmethoden zijn beschreven in Bijlage 9.9.

Resultaten resistente bacteriën

In meer dan 40% van de mestmonsters van vleeskalveren en varkens genomen in de jaren 2013/2014 en 2016/2017 werden ESBL-EC aangetroffen (Figuur 4-7). De gemiddelde concentraties in vleeskalveren en varkens waren respectievelijk $1,4 \times 10^4$ kve/kg en $2,7 \times 10^3$ kve/kg mest (2016/2017). De gemiddelde concentraties ESBL-EC in vleeskalveren, varkens en rundveemest waren in 2013/2014 respectievelijk $2,1 \times 10^4$ kve/kg, $2,7 \times 10^3$ kve/kg en $4,5 \times 10^2$ kve/kg. Deze concentraties zijn zeer vergelijkbaar met de bevindingen van 2016/2017. In 2013/2014 werden ook AmpC-EC aangetroffen in 17,6% (n=16) van de monsters.

ESBL-EC werden daarnaast in 2016 aangetoond in mest van pluimvee moederdieren (2 van de 2), vleeskuikens (1 van de 2), leghennen (1 van de 5), maar niet in mest van kalkoenen (1 monster). In 2013/14 werden ESBL-EC ook aangetoond in mest van vleeskuiken (2 van 2 monsters), en leghennen (2 van 3 monsters). Voor al deze typen mest waren de aantallen onderzochte monsters erg laag.



Figuur 4-7. Prevalentie van ESBL-producerende *E. coli* in diverse soorten mestmonsters onderzocht in 2013, 2014 en 2016/2017.

De concentraties in de mestmonsters van vleeskuikens en leghennen waren in 2013/2014 een factor 10 (vleeskuikens) tot 10.000 (legghennen) hoger dan die in vleeskalveren. Daarentegen was de concentratie in een derde pluimveecategorie, de moederdieren in 2016 juist 10x hoger dan dat in vleeskalveren. Deze verschillen zouden verklaard kunnen worden door de lage aantallen monsters voor deze dieren in beide studies (gecombineerd met een grote spreiding in concentraties tussen monsters), en in het al dan niet verdund zijn van de mest met bodembedekkingsmateriaal.

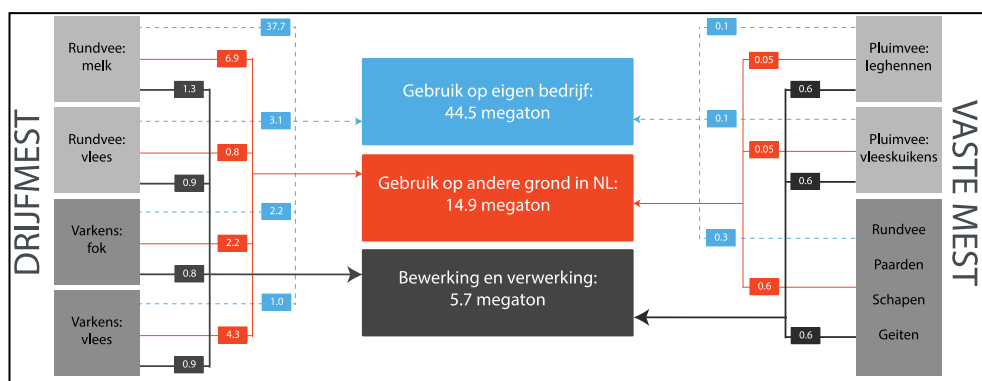
4.2.2 Meststromen

Figuur 4-8 toont de jaarlijks geproduceerde hoeveelheden mest in Nederland. Drijfmest wordt geproduceerd door rundvee en varkens. Vaste mest wordt geproduceerd door pluimvee, kleine herkauwers (geiten en schapen), paarden en voor een deel ook door rundvee. In 2015 werd ruim 76 megaton mest geproduceerd (Centraal Bureau voor de Statistiek, 2016a). Daarvan was ongeveer 80% afkomstig van runderen en 15% afkomstig van varkens (Centraal Bureau voor de Statistiek, 2016a). In 2015 werd bijna driekwart (73%) van de mest op eigen land toegepast. Twintig procent wordt binnen Nederland getransporteerd en op grond van andere landbouwbedrijven toegepast. De rest (7%) wordt bewerkt en verwerkt⁵ en vervolgens verkocht aan particulieren of geëxporteerd naar het buitenland (Centraal Bureau voor

⁵ *Bewerken* van mest is het behandelen van dierlijke mest zonder het product noemenswaardig te veranderen; bijvoorbeeld mengen en roeren van mest en mechanisch scheiden in een dunne en een dikke fractie. Ook vergisten, composteren en biologisch zuiveren van mest vallen onder de definitie 'bewerken van mest', evenzo technieken als drogen en membraanfiltratie (RO).

Verwerken van mest is het toepassen van technieken of combinaties van technieken, die de aard en de hoedanigheid van de mest dusdanig wijzigen dat het eindproduct buiten de Nederlandse landbouw kan worden afgezet. Verbranden (pluimveemest), composteren en hygiëniseren tot een exportwaardig product vallen hieronder.

de Statistiek, 2016a). In dit rapport wordt het begrip 'mestverwerking' gebruikt als verzamelnaam voor bewerking en verwerking van mest.



Figuur 4-8. Meststromen: hoeveelheid geproduceerde en gebruikte mest per jaar per diersoort in megaton. Bron: Centraal Bureau voor de Statistiek (2016a).

5 Beheersmaatregelen

Om een beeld van de beschikbare beheersmaatregelen te schetsen die ingezet zouden kunnen worden om de emissie van ABR naar het milieu te reduceren, worden in dit hoofdstuk zowel huidig toegepaste (conventionele) alsook innovatieve beheersmaatregelen voor afvalwater en mest in kaart gebracht. Daarnaast worden bestuurlijke en wettelijke kaders met betrekking tot veilige water- en meststromen besproken. Hoewel geen van deze kaders expliciet gericht zijn op het terugdringen van ABR, kunnen deze daar wel in meerdere of mindere mate aan bijdragen.

Beheersmaatregelen kunnen maatregelen aan de bron en maatregelen aan het eind van de keten ('end of pipe') omvatten. In Nederland wordt in het kader van antibioticaresistentie in de gezondheidszorg en in de veehouderij gewerkt aan verantwoord gebruik van antibiotica. Daarom werden in dit rapport vooral beheersmaatregelen beschouwd die ingezet kunnen worden om de concentraties van ABR in de mest- en afvalwaterstromen te reduceren.

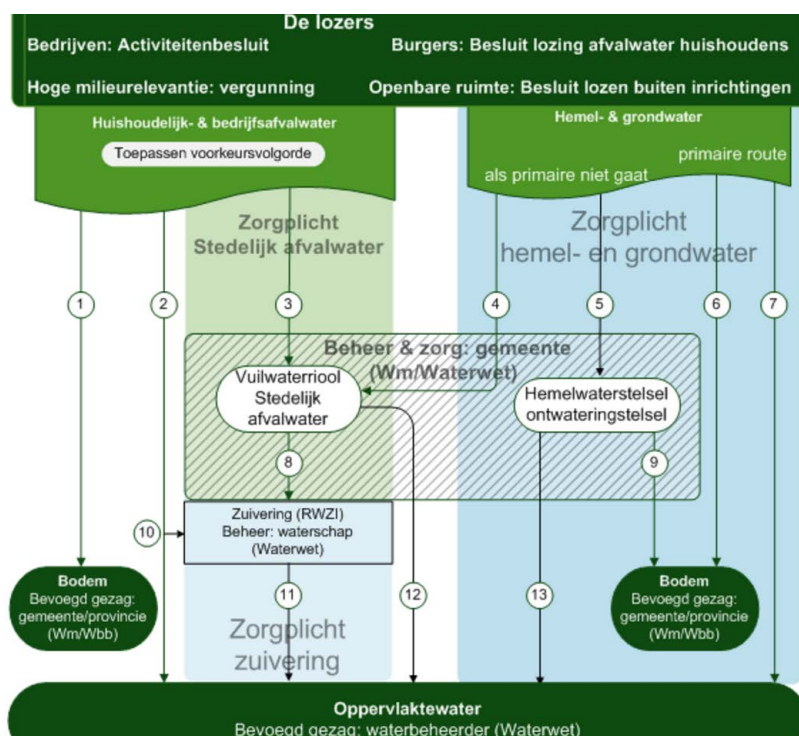
5.1 Afvalwater

5.1.1 *Wettelijke kaders afvalwater*

Er bestaan geen wettelijke kaders die specifiek de emissies van ABR met afvalwater reguleren.

Conventionele zuiveringstechnieken van RWZI's leiden tot een reductie van resistente bacteriën en resistentiegenen (beide met ongeveer een factor 100), en een beperktere reductie van residuen (minder dan een factor 100). Innovatieve technieken voor de nazuivering van effluent van RWZI's (zoals adsorptie, ozonisatie of oxidatie) kunnen tot een verdere reductie van ABR in geloosd afvalwater leiden. Voor een aantal innovatieve technieken die in het laboratorium en in pilot-installaties zijn onderzocht, zijn nog weinig gegevens over reductie van ABR in de praktijk. Dit is van belang omdat de zuivering in de praktijk van de gekozen procesparameters kan afhangen. Op basis van de huidige data is adsorptie aan actiefkool minder effectief dan ozonisatie of oxidatie voor zuivering van resistente bacteriën. Innovatieve technieken worden in Nederland vooralsnog zeer beperkt ingezet (3 van 341 RWZI's).

Figuur 5-1 geeft de wettelijke kaders weer in relatie tot het lozen van stedelijk afvalwater, hemelwater en grondwater op het milieu.



Figuur 5-1. Overzicht van de wettelijke kaders in relatie tot lozingen van afval-, hemel- en grondwater. Bron: Infomil⁶.

De belangrijkste wet- en regelgeving betreffen (Rijkswaterstaat Water, 2017):

- De *Waterwet* beschrijft de zorg voor het watersysteem (onder andere door stroomgebiedbeheersplannen) en de zorg voor het zuiveren van afvalwater (opgedragen aan de waterschappen) (de *Waterwet* zal vanaf 2018 in stappen overgaan in de *Omgevingswet*);
- In de *Wet Milieubeheer* (welke in 2018 voor een deel overgaat in het *Omgevingswet*) is vastgelegd met welke wettelijke instrumenten het milieu beschermd wordt. De *Wet milieubeheer* is een kaderwet en geeft algemene regels voor milieubeheer. Specifieke regels zijn uitgewerkt in besluiten en ministeriële regelingen. Zo zijn in het *Activiteitenbesluit* voor ongeveer 100 activiteiten de eisen voor verschillende milieuaspecten, zoals geluid, lucht, bodem, externe veiligheid, afval en afvalwater, vastgelegd. De activiteiten omvatten onder andere agrarische activiteiten (bijvoorbeeld composteren, bemesten en waterbehandeling) en afvalwaterbeheer (bijvoorbeeld zuivering van huishoudelijk afvalwater en lozingsvoorschriften).
- De *Wet bodembescherming* stelt regels om de bodem en het grondwater effectief te beschermen. Door deze wet worden de handelingen die een bedreiging vormen voor de bodem en het grondwater in een aantal besluiten en regelingen gereguleerd, zoals het infiltreren van oppervlaktewater in de bodem en het lozen van afvalwater op de bodem.

⁶ [http://www.infomil.nl/onderwerpen/klimaat-lucht/handboek-water/thema's/lozen-\(-afvalwater\)/afvalwaterschema/](http://www.infomil.nl/onderwerpen/klimaat-lucht/handboek-water/thema's/lozen-(-afvalwater)/afvalwaterschema/)

- De *Wet verankering en bekostiging van gemeentelijke watertaken* verwoordt de zorgplicht van gemeenten voor afvloeiend hemelwater, grondwater en afvalwater. In deze wet is een voorkeursvolgorde voor lozing van verschillende categorieën afvalwater opgenomen. Hierbij is het uitgangspunt dat de waterstromen die geen of geringe verontreinigingen bevatten zonder maatregelen direct in het milieu kunnen worden geloosd.

In de Waterwet en de Wet Milieubeheer is een algemene zorgplicht beschreven: in algemene zin moet de kwaliteit van watersystemen beschermd worden, en nadelige gevolgen voor het milieu moeten voorkomen worden. De zorgplicht in het Omgevingswet omvat met betrekking tot oppervlaktewaterlichamen de chemische en ecologische kwaliteit van watersystemen, en de kwaliteit van zwemwater. In de uitvoering van deze wetten wordt echter niet specifiek op ABR ingegaan.

5.1.2 Conventionele zuiveringstechnieken

Nederland heeft 341 rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's). Deze RWZI's zuiveren het water met behulp van chemische en biologische reacties zodat het aan de lozingseisen voor gezuiverd afvalwater voldoet. De lozingseisen stellen eisen aan de hoeveelheid zwevende stof, het biochemisch zuurstofverbruik (BZV), en de hoeveelheden stikstof en fosfaat. Zuiveringen in Nederland werken met verschillende zuiveringsstappen, waarvan in deze rapportage de meest voorkomende worden beschreven.

De *voorzuivering* richt zich op de verwijdering van grove delen en zand omdat deze stoffen verderop in het zuiveringsproces kunnen leiden tot verstopping en slijtage. Vervolgens wordt door middel van *voorbezinking* de bezinkbare stoffen afgescheiden. Daarna volgt de verwijdering van de opgeloste en zwevende organische verontreinigingen op biologische wijze tijdens het *actief slib-proces*. Hierbij wordt het afvalwater geleid naar een *beluchtingstank* waarbij zuurstof wordt toegevoegd aan het afvalwater, dat wordt gemengd met actief slib. Onder deze omstandigheden kan het actief slib de organische en andere verontreinigingen geheel of gedeeltelijk uit het afvalwater verwijderen. Na de beluchtingstank wordt het afvalwater/actief slib-mengsel geleid naar een *nabezinktank*, waarin het biologische actief slib bezinkt en gescheiden wordt van het gezuiverde afvalwater. Daarna wordt het effluent (=gezuiverd afvalwater) meestal geloosd op oppervlaktewater en soms op de Noordzee. Een deel van het actief slib wordt teruggevoerd naar de beluchtingstank (als retourslib), waar het wordt gemengd met nieuw afvalwater.

Afhankelijk van de configuratie van het actief slib-proces vindt stikstofverwijdering en fosfaatverwijdering plaats. Deze processen kunnen biologisch zijn ingebouwd in het zuiveringsproces door het afwisselen van zuurstofconcentraties in de beluchtingstank (biologische verwijdering) of deze kunnen plaatsvinden door het toevoegen van ijzer- of aluminiumzouten (chemische verwijdering).

Lozingen vanuit overstorten en foutaansluitingen bereiken het oppervlaktewater zonder zuivering in een RWZI. Sinds 1998 wordt al in het kader van het actieprogramma 'waterkwaliteit en diergezondheid'

aan de vermindering van lozingen vanuit overstorten gewerkt, onder andere door het definiëren van knelpuntcriteria (Commissie integraal waterbeheer, 2001a; Jansen en Van den Bos, 2010) en het formuleren van een basisinspanning (Commissie integraal waterbeheer, 2001b). Lozingen vanuit overstorten kunnen bijvoorbeeld verminderd worden door maatregelen in de riolering (het plaatsen van bergbezinkbassins of groene buffers of het afkoppelen van bronnen van hemelwater van de riolering, of bij gescheiden rioleringssystemen de ombouw naar een verbeterd gescheiden systeem) (Aalderink en Moens, 2002; Jansen en Van den Bos, 2010). Foutaansluitingen in gescheiden stelsels kunnen opgespoord en verholpen worden (Stichting Rioned, 2010).

5.1.3 *Innovatieve technieken*

Technieken voor nazuiveren van RWZI-effluenten

Als laatste trap in een RWZI kan een vergaand fysisch-chemisch zuiveringsproces ingezet worden, ook wel nazuivering genoemd. Er worden uiteenlopende technieken voor de nazuivering of nabehandeling van afvalwater gebruikt, bijvoorbeeld adsorptie op actief kool (granulair (GAK) of poedervormig (PAK) actief kool), membraangebaseerde processen (filtratie en absorptie), geavanceerde oxidatie (met ozon of peroxide, ook in combinatie met UV) of desinfectie (met chloor of UV) of een combinatie hiervan. Deze nazuivering heeft van oorsprong niet als doel het verminderen van verspreiding van antibiotica- resistente bacteriën of resistentiegenen, maar is vooral gericht op de verwijdering van specifieke chemische stoffen (bijvoorbeeld geneesmiddelen waaronder antibiotica). Toch kan reductie van pathogenen of resistente bacteriën als 'bijvangst' optreden.

Er zijn de laatste jaren pilotonderzoeken gedaan naar de effectiviteit van nazuiveringstechnieken, de meeste op labschaal. In Nederland wordt op dit moment een deel van het afvalwater op deze wijze verdergaand gezuiverd en hergebruikt binnen een fabrieksproces (RWZI Terneuzen) of voor recreatie (RWZI De Groote Lucht). Op de RWZI Horstermeer is een 1-STEP[®]-filter (een neerwaarts doorstroomd vastbedfilter met actief kool als filtermedium) geïnstalleerd (Mulder et al., 2015).

Zowel in Duitsland alsook in Zwitserland is praktijkervaring opgedaan met aanvullende zuiveringen. In deze landen werd tot nu toe vooral gekozen voor granulair of poedervormig actief kool of ozonisatie (Mulder et al., 2015).

Brongerichte zuivering bij ziekenhuizen

Er bestaat een brongerichte zuiveringstechniek voor het verwijderen van onder meer micro-organismen, medicijnresten en andere chemische stoffen. Dit zogenoemde 'Pharmafilter' wordt toegepast in ziekenhuizen, waar al het afval – zoals fecaliën, gaasjes, naalden, infuuszakken, maar ook voedselresten en plastic afval – in een vermaler fijn gemaakt wordt. Het vermaalde afval wordt toegevoegd aan het afvalwater en afgevoerd naar een zuiveringsinstallatie op het terrein van de zorginstelling. Deze zuiveringsinstallatie zuivert op basis van actief slib, membraanfiltratie, actiefkoolfiltratie, ozonisatie en UV-desinfectie. De eindproducten bestaan uit gezuiverd water, biogas en vast restafval (Batelaan et al., 2012). Het bedrijf beoogt hergebruik van het gezuiverde water als

proceswater in het ziekenhuis, bijvoorbeeld voor het doorspoelen van toiletten.

Pharmafilters worden momenteel gebruikt door twee zorginstellingen in Nederland: het Reinier de Graaf Gasthuis in Delft en het verzorgingshuis Zorgsaam in Terneuzen. Diverse andere ziekenhuizen overwegen de implementatie van het Pharmafilter.

Brongerichte sanitatie van huishoudelijk afvalwater (Nieuwe sanitatie)

Ook Nieuwe sanitatie is een brongerichte zuiveringstechniek. Hierbij wordt het afvalwater bij de bron gescheiden en decentraal verwerkt (Schets et al., 2017). Het gaat hier bijvoorbeeld om het apart afvangen van urine ('geel water'), urine en ontlasting ('zwart water'), huishoudelijk afvalwater ('grijs water') en regenwater. Omdat de hoeveelheden geel en zwart water relatief gering zijn, kan hier relatief eenvoudig desinfectie op worden toegepast. Nieuwe sanitatie wordt toegepast op verschillende locaties in Nederland (Sneek, Deventer, Nieuwegein). Echter, op geen enkele locatie vindt desinfectie plaats.

5.1.4 *Effecten van huidige en innovatieve technieken op ABR*

De effectiviteit van conventionele en innovatieve technieken voor de verwijdering van antibioticaresten uit afvalwater is veel bestudeerd. Over de effectiviteit van de zuivering van resistente bacteriën en resistentiegenen is minder bekend. Literatuurgegevens over de effecten van conventionele en geavanceerde nazuivering op residuen, bacteriën en resistentiegenen zijn in de volgende paragrafen samengevat. Een beschrijving van de aanpak van de literatuuranalyse is te vinden in Bijlage 9.10.

Bacteriën:

Bacteriën worden door conventionele zuivering bij een RWZI met gemiddeld 1,6 log (oftewel 97,5%) verwijderd uit het afvalwater met een bereik van geen verwijdering tot 3,5 log (Bijlage 9.10)⁷. Er worden geen duidelijke verschillen in verwijdering tussen de verschillende bacteriegroepen gevonden. Deze literatuurgegevens komen goed overeen met de resultaten van de nulmetingen in dit rapport.

Innovatieve zuiveringstappen zorgen voor gemiddeld ongeveer 2 log (oftewel 99%) extra verwijdering, maar de variatie is groot en afhankelijk van het type zuivering. Ook hangt de effectiviteit van sommige technieken af van de procesparameters (zoals de duur van de ozonbehandeling, maar ook de samenstelling van het afvalwater (Sousa et al., 2017)). In sommige labexperimenten zijn hogere verwijderingen gevonden dan in pilotexperimenten of in de praktijk – van sommige technieken is daarom nog niet bekend hoe goed deze in de praktijk kunnen werken. Een studie beschrijft op pilot schaal de effectiviteit van technieken die op dit moment in Nederland voor verwijdering van geneesmiddelen worden overwogen, granulair actief kool en ozonisatie met aanvullende filtratie (Mulder et al., 2015). Daarin wordt een iets hogere verwijdering aangetoond voor resistente en niet-resistente

⁷ De verwijdering van pathogenen en bacteriën in RWZI's wordt gebruikelijk in log eenheden aangegeven: een verwijdering van 1 log is gelijk aan verwijdering met een factor 10 oftewel 90%, een verwijdering van 2 en 3 log is gelijk aan respectievelijk een factor 100 oftewel 99%, en 1000 oftewel 99.9%.

bacteriën door ozonisatie (-1,5 log) dan door Granulair Actief Kool (GAK, -1 log) (Lüddeke et al., 2015a).

Meermaals wordt het probleem van overleving en reactivatie of hergroei van de bacteriën na zuivering gesignaleerd (ref). Dit kan optreden na UV-behandeling, chloordesinfectie en ozonisatie (zie Bijlage 9.10.2).

Resistentiegenen:

Gemiddeld worden resistentiegenen ongeveer even goed verwijderd als bacteriën (zoals ook gevonden in de nulmetingen). Echter, met name in conventionele zuivering, helofietenfilters en membraanbioreactoren werd op veldschaal gedeeltelijk een toename in de concentratie resistentiegenen na zuivering waargenomen. Het is opvallend dat in sommige studies resistentiegenen, zowel op veld- als labschaal, in concentratie na zuivering met behulp van membraanbioreactoren toe lijken te nemen, terwijl de concentratie aan kweekbare bacteriën afnam (Wang et al., 2015; Yuan et al., 2016b) – maar niet in Munir et al. (2011)). Een toename van resistentiegenen kan door de aanwezigheid van extracellulaire 'vrij' dna veroorzaakt worden. De betekenis van zulk 'vrij' dna, dna wat niet in een levend organisme aanwezig is, is nog niet duidelijk. Terwijl het mogelijk is dat zulk dna door andere levende bacteriën kan worden opgenomen, waardoor de risico's mogelijk aanwezig blijven, is de omvang van dit proces niet bekend.

Antibioticaresiduen:

Homem en Santos (2011) en Michael et al. (2013) geven in hun reviews uitgebreide overzichten met verwijderingsgegevens voor veel antibiotica door verschillende technieken. Het meest bestudeerd zijn de antibioticaklassen beta lactams en sulfonamiden. De verwijdering van antibiotica varieert sterk, en is vooral afhankelijk van de stoffeïenschappen en bedrijfsvoering van de zuivering.

De meeste conventionele technieken (coagulatie, flocculatie, sedimentatie en filtratie) verwijderen antibioticaresten niet goed, dat wil zeggen minder dan 90% (1 log₁₀-eenheid). Adsorptie aan PAK of GAC is vrij efficiënt (> 80% verwijdering). Nieuwe destructietechnieken, zoals oxidatie (bijv via ozonisatie) kunnen de residuen reduceren, maar niet altijd geheel mineraliseren, wat het risico op de vorming van (toxische) metabolieten vormt. Een aanvullende adsorptie- of filtratiestap kan dan nuttig zijn.

Tabel 5-8 vat de literatuur beknopt samen. Omdat voor veel technieken slechts enkele metingen voorhanden zijn of geen metingen in veldstudies uitgevoerd werden, moeten de gegevens in deze tabel als indicatief beschouwd worden.

Tabel 5-8. Indicatieve schatting van de reductie van ABR door afvalwaterbehandeling (voor veel technieken zijn er nog onvoldoende data uit pilot-of veldstudies). Innovatieve technieken worden doorgaans met conventionele zuivering gecombineerd. De totale reductie is dan de som van de reductie door conventionele en aanvullende behandeling.

Techniek	Reductie van resistente bacteriën	Reductie van resistentiegenen	Reductie van residuen van antibiotica
Conventioneel	2 log (nulmetingen: 2,6 log)	2 log (nulmetingen: 2,6 log)	Variabel (stofafhankelijk)
Poedervormig actief kool	Geen data	Geen data	Stofafhankelijk (30-80%)
Granulair actief kool	1 log	Geen data	Stofafhankelijk (30-80%)
Ozonisatie (+ zandfilter)	1,5 log	1 log	Stofafhankelijk (30-80%)
UV	4 log, alleen labstudies	<1 log	Stofafhankelijk
MBR	Geen data	Wisselend	Stofafhankelijk
Oxidatie	2 log	0,5 log	Stofafhankelijk

5.2 Mest

Er bestaan geen wettelijke kaders die specifiek de emissies van ABR via mest reguleren. Wel is voor export van mest hygiënisatie verplicht.

Een aantal innovatieve technieken voor de bewerking en verwerking van mest wordt op dit moment in Nederland ingezet (toegepast op 9% van het totale mestvolumen). Technieken zoals thermofiele vergisting, hygiënisatie, compostering, verbranding, reverse osmose van de natte fractie, en drogen leiden tot een reductie van bacteriën en naar verwachting ook tot een reductie van resistente bacteriën. Dit effect is bij vergisting en compostering sterk afhankelijk van de temperatuur en duur van deze processen.

5.2.1 Bestuurlijke en wettelijke kaders mest

Er zijn vier beleidsvelden die invloed hebben op hoe de veeteelt en bijbehorende omvang en hoedanigheid van de meststromen zich ontwikkelen in Nederland, met mogelijke implicaties voor de schatting van het lot van antibioticaresiduen, genen of resistente bacteriën. Deze betreffen de ruimtelijke inrichting, rechten op het houden van dieren, mest- en andere milieuwetgeving, en dierenwelzijn. Geen van deze

regelt de emissies van ABR. In Bijlage 9.11 wordt elk onderwerp met bijbehorende wet- en regelgeving kort besproken.

5.2.2 *Mestbewerkings- en verwerkingstechnieken*

Mestbewerking betreft alle handelingen van mest die erop gericht zijn de aard of samenstelling van mest te wijzigen. Mestverwerking is specifiek gericht op export van mest, mestverbranding en de productie van mestkorrels. Meestal wordt mest eerst mechanisch gescheiden, waarbij de ruwe mest wordt gescheiden in een dikke en een dunne fractie. Vervolgens kan een reeks technieken toegepast worden zoals hieronder beknopt beschreven (Hoeksma et al., 2015). Hoewel de meeste technieken niet gericht zijn op het reduceren van de aantallen micro-organismen of antibioticumresiduen, kunnen ze wel effect hebben.

Technieken voor de dikke fractie

- Hygiënisatie (verhitten): het op minstens 70 °C brengen van de mest gedurende minimaal één uur. Hygiënisatie wordt toegepast om de mest exportwaardig te maken. Na hygiënisatie krijgt de mest de classificatie 'verwerkt'.
- Vergisting: biologisch proces zonder zuurstof waarbij organisch materiaal wordt afgebroken en biogas wordt geproduceerd. Vergisting kan plaatsvinden bij uiteenlopende temperaturen; psychrofiel (< 25 °C), mesofiel (35-40 °C) en thermofiel (55-60 °C).
- Composteren: biologisch proces waarbij mest onder invloed van zuurstof op relatief hoge temperatuur wordt gebracht (50-70 °C). Hierdoor daalt het vochtgehalte en neemt het nutriëntengehalte toe. Bij de meest toegepaste batchgewijze compostering doorloopt het composteringsproces verschillende fasen: een relatief korte thermofiele fase, gevolgd door een mesofiele fase.
- Drogen: mest middels verhitting ontdoen van vocht.
- Verbranden: wordt toegepast op vaste pluimveemest en levert fosfaat- en kalkrijke as op.

Technieken voor de dunne fractie

- Biologische zuivering: biologisch proces onder afwisselende toevoer van zuurstof waarbij alternerend nitrificatie en denitrificatie plaatsvindt. Het proces is bedoeld om stikstof te verwijderen.
- Verdampen: verhitting zodat vocht uit de dunne fractie verdampt. In de dunne fractie aanwezige minerale stikstof komt in de vorm van ammoniak in de waterdamp terecht.
- Strippen: nabewerking van de damp uit het verdampingsproces. Hiermee wordt de ammoniak gebonden. Door magnesium aan de mest toe te voegen, ontstaat struviet. Dit kan gebruikt worden als vervanger voor kunstmest.
- Reverse osmose (RO)/Omgekeerde osmose: nabewerking van de dunne fractie waarbij water door een membraan wordt geperst en een concentraat achterblijft. Het RO-membraan houdt gesuspendeerd en opgelost materiaal, inclusief micro-organismen, tegen.

5.2.3 *Effecten van bewerkings- en verwerkingstechnieken op ABR* *Effect op zoönoseverwekkers en resistente bacteriën*

Omdat niet alle technieken onderzocht zijn op de verwijdering van antibioticaresistente bacteriën, wordt ook naar de verwijdering van niet-resistente bacteriën verwezen, bijvoorbeeld van de indicatorbacteriën *E. coli* en enterokokken.

Bij opslag van mest neemt de concentratie micro-organismen in het algemeen af. Bij lagere temperaturen overleven (pathogene) micro-organismen in het algemeen langer (Côté et al., 2006; Semenov et al., 2007).

Sommige technieken gaan gepaard met een sterke afname van de concentratie bacteriën. Een zeer effectief voorbeeld is verbranding want (vrijwel) geen enkel organisme overleeft dat. Ook hygiëniserende kan leiden tot een sterke afname, hoewel zogenaamde sporevormende bacteriën het proces wel kunnen overleven. Na verhitting tot 70 °C gedurende één uur werden door Bagge et al. (2005) geen *E. coli*, *Enterococcus* spp. en coliformen teruggevonden. Sahlstrom et al. (2008) onderzochten het effect van verschillende temperatuur/tijd-combinaties op het overleven van pathogene en indicator bacteriën. Na behandelingen bij 70 °C gedurende 30 en 60 min en bij 55 °C gedurende 60 min werden geen pathogenen en indicatoren teruggevonden (behalve de sporevormer *Clostridium perfringens*). Hoeksma et al. (2015) vonden na hittebehandeling van co-vergiste varkensdrijfmest bij 70 °C gedurende één uur volledige inactivatie van *E.coli* ($\geq 2,6$ log reductie) en Salmonella ($\geq 0,2$ log⁸) – deze konden na hittebehandeling dus niet meer gedetecteerd worden. Enterococcus werd na hittebehandeling nog aangetroffen, wel waren de concentraties 2,8 log lager.

De effectiviteit van andere technieken hangt mede af van de procesvoering (met name van de temperatuur in combinatie met de tijdsduur): zo is de effectiviteit van compostering op de overleving van micro-organismen afhankelijk van de temperatuur, het specifiek micro-organisme, het vochtgehalte en de duur van de behandeling. De berekende overlevingstijd van pathogene *E.coli* in onderzoeken van Fremaux et al. (2007) was bijvoorbeeld omgekeerd evenredig met de temperatuur; bij 35 °C bedroeg deze 90 dagen en bij 65 °C 9 dagen. Hoeksma et al. (2015) deden onderzoek naar het effect van compostering van de vaste fractie van gescheiden rundveedrijfmest, bij een temperatuur van 60-70 °C gedurende een gemiddelde procestijd van 60 min. De geteste micro-organismen waren na de behandeling volledig geïnactiveerd, de verwijdering bedroeg voor *E. coli* 2,5 log, en voor enterokokken 3,8 log. De effecten van compostering op resistente bacteriën zijn alleen incidenteel onderzocht, in het algemeen treedt een afname van de concentraties ABR bij compostering op. Compostering leidde bijvoorbeeld na 48 dagen tot een afname met een factor 10.000 tot 10 miljoen (4-7 log) van bacteriën die resistent zijn tegen tetracycline en erythromycine (Wang et al., 2012).

In het algemeen wordt bij anaërobe vergisting een reductie van ongeveer 90%-99,9% (1 log-3 log reductie) gevonden. Dit kan oplopen

⁸ Deze afname oogt relatief klein omdat de concentratie van Salmonella in de mest voor verhitting maar 0.2 log hoger was dan het detectielimiet na verhitting.

tot volledige inactivatie, dat wil zeggen reductie tot kleiner dan het detectielimiet (Hoeksma et al., 2015, Kearney et al., 1993; Cote et al., 2006; Bonetta et al., 2011). Ook voor anaërobe vergisting geldt dat de effectiviteit afhankelijk is van de procestemperatuur, en dat temperaturen van 50-55 °C het meest effectief zijn en tot 6 log reductie van *E. coli* (volledige inactivatie) kunnen leiden (Pandey en Soupir, 2011). Bij mesofiele (35-40 °C) en psychrofiele (< 20 °C) vergisting is de effectiviteit aanzienlijk geringer.

Mechanische scheidingstechnieken die doorgaans in Nederland worden toegepast, zoals vijzelpers, zeefbandpers en centrifuge, hebben geen of een beperkt effect (1 log reductie) op het overleven van micro-organismen (Hoeksma et al., 2015; McCarthy et al., 2015; McCarthy et al., 2013; Riaño en García-González, 2014). De totale populatie micro-organismen verdeelt zich over de dikke en de dunne fractie, waarbij van enkele soorten de concentratie in de dunne fractie iets lager kan zijn dan in de dikke fractie.

De technieken voor de dunne fractie leiden in het algemeen tot een afname van resistente bacteriën. Biologische zuivering kan tot afnames van 2-6 log leiden (Vanotti et al., 2015; Pandey et al., 2016). Na verdamping is vanwege de hoge temperaturen de resterende dunne fractie nagenoeg ontdaan van micro-organismen. Ook na reverse osmose zijn in het water nauwelijks nog micro-organismen aanwezig (> 3 log reductie) (Hoeksma et al., 2015).

De effectiviteit van mestbewerkings- en verwerkingstechnieken is samengevat in Tabel 5-10.

Effect op resistentiegenen

De invloed van deze technieken op de concentratie resistentiegenen is alleen incidenteel onderzocht en toont wisselende resultaten. Compostering kan leiden tot een afname met een factor 100 tot 1 miljoen (2-6 log afname) van resistentiegenen tegen erythromycine (Wang et al., 2012), terwijl Sharma et al. (2009) voor verschillende tetracycline resistentiegenen na elf weken compostering een kleinere afname en zelfs een toename vond. Er zijn op dit moment onvoldoende gegevens om de effecten van verschillende mestverwerkingstechnieken op resistentiegenen te kunnen samenvatten.

Effect op antibioticaresiduen

Effecten van mestverwerking op residuen zijn vooral voor vergisting en compostering onderzocht (naast opslag in open mestputten zoals gebruikt in de VS). Het meest bestudeerd zijn de antibioticaklassen tetracyclinen en sulfonamiden. De verwijdering van antibiotica varieert sterk en is afhankelijk van de stofeigenschappen, maar ook van de procesvoering van de technieken (Youngquist et al., 2016).

Tabel 5-9. Effect van mestbewerkings- en verwerkingstechnieken op de concentraties ziekteverwekkers en indicatorbacteriën.

Techniek	Effect op ziekteverwekkers en indicatorbacteriën
Scheiding (mechanisch)	Geen tot 1 log reductie.
Vergisten (anaëroob)	2-6 log afname (tot volledige inactivatie), maar wel afhankelijk van het micro-organisme, de temperatuur, het vochtgehalte, en de duur
Composteren (aëroob)	2-7 log (tot volledige inactivatie), maar wel afhankelijk van het micro-organisme, de temperatuur, het vochtgehalte, en de duur
Drogen	Bij hogere temperaturen (> 70 °C) 2-3 log reductie (tot volledige inactivatie), maar wel afhankelijk van de duur en het vochtgehalte.
Hygiënisatie	2-3 log reductie
Verbranden	Reductie tot onder de detectielimiet
Biologisch zuiveren	2-6 log afname
Reverse osmose	> 3 log afname voor het permeaat. In het concentraat kunnen nog wel grote hoeveelheden micro-organismen aanwezig zijn.

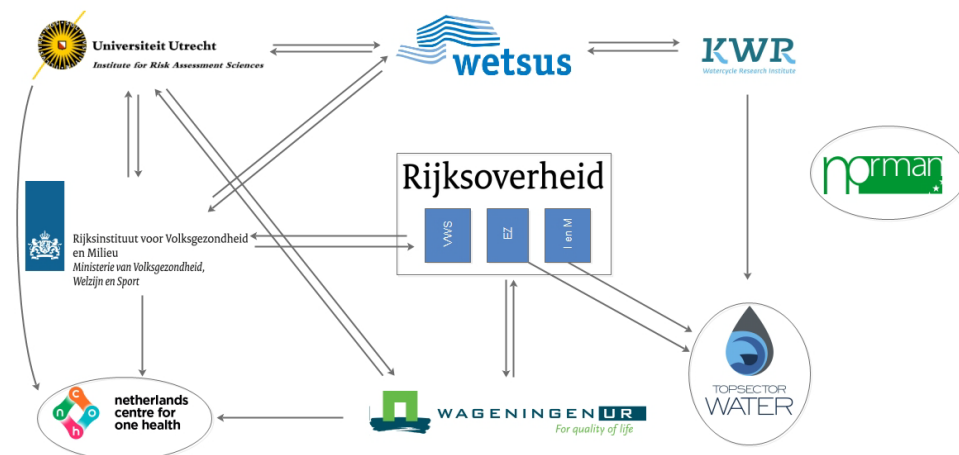
Tabel 5-10. Effect van mestbewerkings- en verwerkingstechnieken op de concentraties van resistente bacteriën, resistentiegenen en antibiotica residuen – indicatieve data. Van andere technieken zijn geen gegevens bekend. Bron: Youngquist et al., 2016; Sharma 2009; Wang, 2012.

Techniek	Effect op resistente bacteriën	Effect op resistentiegenen	Effect op antibiotica residuen
Composteren (aëroob)	2-7 log	Wisselend (van toename tot 6 log afname)	Wisselend (0-100%, halfwaardetijd meestal tussen 1 en 16 dagen)
Vergisten (anaëroob)	1-4 log	Toename tot 1 log afname	Wisselend (0-100%), afhankelijk van de stof en de temperatuur van de vergisting

6 Overzicht nationaal onderzoek ABR in het milieu

In Nederland wordt door een aantal kennisinstituten onderzoek gedaan naar antibioticaresistentie in het milieu. Onderzoek wordt soms gedaan in een consortium van verschillende kennisinstituten. Soms wordt onderzoek gedaan in samenwerking met private partners, bijvoorbeeld op het gebied van innovatie van afvalwaterzuivering. Een platform waarbij onderzoekspartners worden samengebracht op het terrein van antibioticaresistentie in het milieu kan bijdragen aan een doelgerichte aanpak van kennishiaten.

Het RIVM adviseert het ministerie van VWS over antibioticaresistentie. Overleg tussen verschillende partijen die te maken hebben met antibioticaresistentie is daarbij essentieel. Op het terrein van ABR in het milieu werkt het RIVM samen met Wageningen Livestock Research (WLR), RIKILT van Wageningen UR, het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS) van de Universiteit Utrecht, en de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht (Figuur 6-1). Ook met het Netherlands Centre for One Health (NCOH) wordt door het RIVM samengewerkt; dit samenwerkingsverband van academische onderzoeksinstituten beoogt onderzoek en innovatie in infectieziekten, waaronder ABR, in een geïntegreerde One Health aanpak. Verder bestaat samenwerking met het Wetsus European Centre of Excellence for Sustainable Water Technology (Leeuwarden). Dit is een consortium waarbij private partijen en kennisinstituten samenwerken aan duurzame, rendabele waterzuiveringstechnologie waar onder andere met het KWR Water Science Institute (Nieuwegein) wordt samengewerkt. Met name in het Wetsus thema 'source separated sanitation' wordt onderzoek gedaan naar de invloed van de huidig toegepaste biologische afvalwaterzuivering op de verspreiding van antibioticaresistentie.



Figuur 6-1. Samenwerkingsverbanden op het terrein van ABR en milieu.

6.1 Lopende onderzoeksprojecten

In Nederland wordt door een aantal kennisinstellingen onderzoek gedaan naar antibioticaresistentie in het milieu zoals het resistoom in afvalwater. Onderzoek wordt soms gedaan als onderdeel van een consortium van verschillende kennisinstellingen. Soms wordt onderzoek gedaan in samenwerking met private partners bijvoorbeeld op het gebied van innovatie van afvalwaterzuivering. Een platform waarbij onderzoekspartners worden samengebracht op het terrein van antibioticaresistentie in het milieu kan bijdragen aan reductie van de problematiek.

Lopende onderzoeksprojecten omvatten onder ander:

- Het topsectorenproject ESBLAT, onderdeel van PPS 1Health4Food, waarin wordt onderzocht welke bronnen van belang zijn bij humane blootstelling aan het ESBL-resistentietype.
- Het project 'Veehouderij en Gezondheid Omwonenden' in opdracht van het ministerie van EZ, waarin onder meer resistentiegenen in lucht worden gemeten en de blootstelling aan lucht rondom veehouderijen wordt vastgesteld.
- Het project 'iAMResistant' in het kader van het Strategisch Programma RIVM, waarin verschillende landbouw geassocieerde compartimenten worden onderzocht op de aanwezigheid van bacteriën, resistentiegenen en antibioticumresiduen.
- Het EFFORT-project waarin het IRAS (Universiteit Utrecht) in samenwerking met het Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) en de UU (I&I) onder ander metingen van resistentiegenen in luchtmonsters rond veehouderijen uitvoeren.
- Het project 'Drinkwater' in opdracht van het ministerie van IenM, waarin beleid op het gebied van ABR en drinkwater wordt ondersteund (onder anderen in relatie tot de EU en de WHO).
- Voor de STOWA wordt een project uitgevoerd waarin de relatieve bijdrage van RWZI-effluenten en riooloverstorten aan ESBL en VRE in oppervlaktewater wordt bepaald. Dit in vergelijking met bijdragen vanuit andere bronnen, zoals uitgereden dierlijke mest en bedrijven waar landbouwhuisdieren gehouden worden. De expertise, kennis en data verkregen in deze projecten worden gebruikt ter versterking van het hier beschreven project alsook vanuit andere aanpalende projecten die relevant blijken te zijn.
- Een aantal onderzoeken bij Wetsus, waarin de hoeveelheid antibioticaresistentiegenen en resistente bacteriën in ziekenhuisafvalwater, afvalwaterzuiveringsinstallaties en oppervlaktewater en de verspreiding van antibioticaresistentie na bemesting van landbouwgrond wordt onderzocht.
- Het RIVM-SPR-project Veehouderij One Health heeft als ambitie om verschillende duurzaamheidsaspecten van de veehouderij in Nederland op een integrale wijze te kwantificeren en te beoordelen, waaronder een indicator voor de blootstelling aan ABR-agentia uit de veehouderijsector.

Eerdere projecten van waaruit input kan worden verkregen om de onderhavige onderzoeksvragen te beantwoorden zijn onder meer:

- Nationaal onderzoek naar covergisting op het gebied van gezondheids- en veiligheidsaspecten (Commissie van

Deskundigen Meststoffenwet in opdracht van het ministerie van EZ), dat resultaat heeft opgeleverd in relatie tot ABR-problematiek.

- Onderzoek naar de milieubelasting met antibiotica door het gebruik van dierlijke mest werd uitgevoerd door Geofox Lexmond in opdracht van de Stichting Kennisontwikkeling Kennisoverdracht Bodem.
- Onderzoek naar pluimveemestverwerking heeft resultaten gegeven betreffende ESBL-reductie (uitgevoerd door CVI in opdracht van het ministerie van EZ).
- Onderzoek naar ESBL op verse rauwe producten en mogelijke blootstelling van de mens hieraan in het kader van het Strategisch Onderzoeksprogramma RIVM.

⁷ Heezen et al. (2015). Feitenrelaas rond de aspecten 'Gezondheid en Veiligheid' van biovergisting. RIVM Briefrapport 2014-0162.

http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Wetenschappelijk/Rapporten/2015/juli/Feitenrelaas_rond_de_aspecten_Gezondheid_en_Veiligheid_van_biovergisting.

⁸ Geofox-Lexmond (2009). Veterinaire antibiotica in de bodem en oppervlaktewater.

<http://www.soilpedia.nl/Bikiwiki%20documenten/SKB%20Projecten/PP8348%20Antibiotic%20in%20de%20bodem/PP8348%20bijlage%20A%20Veterinaire%20antibiotica%20in%20de%20bodem%20en%20oppervlaktewater.pdf>

⁹ Duindam et al., 2012, Eindrapport van onderzoek naar afdoding ESBL in pluimveemest in compostings- en vergistingsinstallaties in NL.

<http://www.beleidsplanning.nl/documents/nl/20121211%20eindrapport%20afdoding%20ESBL%20in%20pluimveemestverwerking%20in%20NL.pdf>.

7 Discussie en conclusie

In dit rapport wordt de aanwezigheid van resistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen (ABR) in afvalwater beschreven en de vrachten geschat die jaarlijks het milieu bereiken. Eerste resultaten laten zien dat ook met mest resistente bacteriën het milieu kunnen bereiken. Huidige methoden voor afvalwaterzuivering verlagen de concentraties van ABR in afvalwater. Daarnaast bestaan aanvullende zuiveringstechnieken voor afvalwater en voor mest die de concentraties van ABR verder kunnen reduceren.

In dit hoofdstuk worden de resultaten in de vorm van vraag en antwoord samengevat, en de uitkomsten in meer detail besproken.

7.1 Nulmetingen: ABR in afvalwater en mest

Worden in Nederland bijzonder resistente micro-organismen (BRMO), resistentiegenen en antibioticaresiduen (samen als ABR afgekort) vanuit mens en dier naar het milieu verspreid?

- Ja, zowel residuen als BRMO en resistentiegenen bereiken met afvalwater de leefomgeving.
- Uitgebreide metingen in afvalwater laten zien dat jaarlijks ongeveer 10^{16} ESBL-producerende *E.coli* en 10^{13} carbapenem resistente Enterobacteriaceae het milieu bereiken.
- Van het macrolide resistentiegen *ermB* en van het sulfonamide resistentiegen *sul1* bereiken jaarlijks ongeveer 10^{19} en 10^{20} kopieën het oppervlaktewater.
- Van de vier antibiotica die in nagenoeg alle effluentmonsters voorkomen, wordt per jaar bij elkaar ongeveer 900 kg op het oppervlaktewater geloosd. Dit is de ondergrens van de geloosde hoeveelheden antibiotica, aangezien andere antibiotica ook in een deel van de RWZI-effluenten werden aangetroffen, en enkele antibiotica niet werden gemeten.
- De eerste (indicatieve) metingen van ABR in mest wijzen op een bijdrage van mest aan de introductie van BRMO (ESBL-producerende *E. coli*) naar het milieu. Met vervolgmetingen in mest kan de totale bijdrage van emissie van ABR uit mest nauwkeuriger worden bepaald en met andere stromen (zoals afvalwater) worden vergeleken.

Verspreiding van ABR vanuit afvalwater - nulmetingen

In de nulmetingen werden de niveaus van de uitstoot van bijzonder resistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen vastgesteld, door aan 100 representatief gekozen Nederlandse rioolwaterzuiveringsinstallaties metingen te verrichten. Naast ESBL-producerende *E. coli* (ongeveer 10^{16} kve per jaar) worden ook vancomycinresistente enterococci op het oppervlaktewater geloosd. Deze resultaten stemmen overeen met die in andere studies: ook in de onderzoeken die zijn samengevat door Huijbers et al. (2015) werden VRE- en ESBL-producerende Enterobacteriaceae in afvalwater gevonden.

Per jaar worden daarnaast ongeveer 10^{13} kve carbapenemresistente Enterobacteriaceae met afvalwater naar het oppervlaktewater geloosd. De CRE-concentraties lagen ongeveer een factor 250 lager dan de concentraties van ESBL-producerende *E. coli*. CRE komen in Nederland in een heel lage prevalentie voor. Hele ruwe schattingen van de omvang van de CRE-prevalentie kunnen met behulp van de gevonden concentraties in afvalwater gemaakt worden: indien de concentraties van CRE in feces bij een drager van CRE vergelijkbaar zijn aan die van ESBL-producerende *E. coli* in een ESBL-drager, en voor ESBL-producerende *E. coli* een dragerschap van 5% wordt aangenomen, zouden naar verhouding van de concentraties van ESBL-producerende *E. coli* en CR Enterobacteriaceae 1 op de 10.000 inwoners (0,01%) CRE-drager zijn. Dit komt overeen met het huidige beeld van een zeer laag dragerschap in Nederland.

Het is bekend dat CRE met reizigers Nederland kunnen bereiken. Mensen die in het buitenland besmet werden, zijn dus een mogelijke bron van CRE in afvalwater (RIVM, 2014). In de zorg worden reizigers op CRE gescreend om verspreiding naar risicogroepen te voorkomen (platform BRMO buiten zorginstellingen, 2016). Andere bronnen voor de aanwezigheid van CRE in afvalwater zouden onder andere kunnen bestaan uit zorginstellingen (ziekenhuizen en/of verzorgingstehuizen). Omdat de concentraties van CRE significant geassocieerd zijn met de grootte van de RWZI's en ziekenhuizen alleen op grote RWZI's zijn aangesloten, is niet precies aan te geven welk deel van de CRE in afvalwater van ziekenhuizen afkomstig is. Doorgaans dragen ziekenhuizen echter beperkt bij aan de totale volumes afvalwater van de aangesloten RWZI's, namelijk gemiddeld 0,7%. Ook werden CRE in RWZI's gevonden waarop geen ziekenhuizen en/of verzorgingstehuizen zijn aangesloten. Nader onderzoek moet uitwijzen wat de herkomst is van de in afvalwater gevonden CRE-bacteriën.

In de nulmetingen werden zoals verwacht ook residuen van antibiotica in het afvalwater gevonden. De concentraties in het influent stemmen goed overeen met de concentraties die te verwachten zijn uit de gebruikscijfers van antibiotica in Nederland. Het effect van de afvalwaterbehandeling varieert per antibioticum, zoals ook aangetoond in ander Nederlands en internationaal onderzoek (Michael et al., 2013; Mulder et al., 2015).

Antibiotica kunnen bij de behandeling van mensen en dieren tot selectie van resistente bacteriën leiden. In hoeverre selectie ook in het milieu kan optreden, en bij welke concentraties van antibiotica dat kan gebeuren, is nog niet goed bekend. Door Bengtsson-Palme en Larsson (2016) werden voor het eerst concentraties geschat waarbij geen selectie van resistente bacteriën meer verwacht kan worden. Voor enkele antibiotica liggen de gevonden concentraties in het RWZI en ook in effluent hoger dan deze concentraties. In hoe verre in RWZI's zelf of in het ontvangend oppervlaktewater bij de gevonden concentraties van residuen daadwerkelijk selectie voor resistente bacteriën op zou kunnen treden is nog onbekend.

ABR in mest

Voor mest zijn de eerste gegevens over ESBL-producerende *E. coli* beschikbaar gekomen. Afhankelijk van de mestsoort werden ESBL-producerende *E. coli* aangetroffen, met hogere prevalenties en concentraties in vleeskalveren vergeleken met varkens en rundvee. De bevindingen stemmen overeen met de resultaten van monitoring van ESBL-producerende *E. coli* in dieren (Mevius et al., 2015): respectievelijk 18% van de vleeskalveren (individuele dieren bemonsterd bij slacht) waren in 2014 drager van ESBL-producerende *E. coli*, 12% van de varkens en 6% van het melkvee. De prevalenties van ESBL-producerende *E. coli* zijn in mest hoger dan in MARAN landelijk is gerapporteerd (Mevius et al., 2015). Een mogelijke oorzaak is dat de onderzochte mestmonsters een mengmonster van een heel bedrijf vormen, terwijl in de landelijke surveillance enkele dieren bemonsterd werden. Een mengmonster kan ESBL-EC positief zijn indien een deel van de individuele dieren op een bedrijf ESBL-EC positief is. De verschillen kunnen echter ook veroorzaakt worden door kleine verschillen tussen de toegepaste methoden die tot verschillende detectielimieten leiden, en door het lagere aantal metingen in mest en de daarmee verbonden lagere nauwkeurigheid. Gecombineerd met de meststromen is op te merken dat de mestsoorten met een hogere prevalentie van ESBL een klein deel van de totale meststroom uitmaken. Precieze gegevens van de prevalenties en concentraties van ESBL-producerende *E. coli* in verschillende mestsoorten worden in 2018 verkregen uit de resultaten van vervolgonderzoek.

Mogelijke inzet van milieumetingen

Dit onderzoek maakt duidelijk dat met metingen in afvalwater op een niet-invasieve (niet-indringend; in tegenstelling tot bijvoorbeeld bloedmonsters) en anonieme manier het voorkomen van BRMO met zeer lage prevalenties onderzocht kunnen worden. Metingen van ABR in het milieu kunnen dus informatie over het voorkomen van bepaalde resistente bacteriën in de humane en dierlijke populatie geven. Bij herhaalde metingen kunnen trends in de prevalentie van dragerschap aangetoond worden, onder andere om de effectiviteit van mogelijke beheersmaatregelen te toetsen. Ten slotte kan door het typeren van bacteriën vastgesteld worden of de in het milieu aangetroffen bacteriën overeenstemmen met het ABR-spectrum dat in de humane bevolking circuleert.

7.2 **Beheersmaatregelen: vermindering van uitstoot van ABR naar het milieu**

Kan in Nederland de verspreiding van ABR naar het milieu worden verminderd?

- Maatregelen aan de bron zoals vermindering van het gebruik van antibiotica ter inperking van resistentie, zoals afgesproken in de nationale aanpak antibioticaresistentie, dragen indirect ook bij aan de vermindering van de uitstoot van ABR naar het milieu.
- Verspreiding van ABR naar het milieu kan worden verminderd. Zowel huidig toegepaste als aanvullende technieken voor afvalwaterzuivering en mestbehandeling dragen bij aan een vermindering van de uitstoot van ABR naar het milieu. Voor residuen, BRMO en resistentiegenen wordt met een bepaalde techniek niet altijd hetzelfde effect bereikt, dat wil zeggen dat voor bacteriën vaak een betere vermindering wordt bereikt dan voor residuen.
- Conventionele afvalwaterzuivering wordt breed toegepast, aanvullende zuivering van afvalwater wordt zeer beperkt toegepast (in rioolwaterzuiveringsinstallaties, en bij brongerichte verwerking van ziekenhuisafvalwater). Mestbehandeling wordt vooralsnog beperkt ingezet (9% van de totale meststroom).
- Aanvullende (innovatieve) beheersmaatregelen voor het verminderen van ABR in afvalwater bestaan bijvoorbeeld uit geavanceerde oxidatie of filtraties met geactiveerde kool.
- Deze kunnen volgens pilotexperimenten de lozingen van ABR met afvalwater verder reduceren. De effectiviteit van deze technieken voor resistente bacteriën en resistentiegenen is in de praktijk nog niet breed onderzocht. Verder onderzoek in praktijksituaties kan dit kennishiaat verhelpen.
- Bredere toepassing van mestbehandeling (zoals thermofiele vergisting, compostering, verhitting, hygiënisatie en biologische behandeling) kan de uitstoot van ABR naar het milieu verminderen.

Bij de conventionele zuivering van afvalwater nemen de concentraties van ABR in meerdere of mindere mate af. Op dit moment worden technieken ontwikkeld die tot een verdergaande verwijdering van ABR kunnen leiden. Ook bestaan decentrale technieken die bijvoorbeeld ingezet worden om ziekenhuisafvalwater te zuiveren. In hoeverre deze zinvol zijn om het niveau van resistentie te verlagen, hangt af van de bijdrage van zorginstellingen aan de totale emissies van ABR naar het milieu. Aangezien de oorsprong van onder andere de gevonden CPE niet eenduidig is toe te schrijven aan afvalwater dat mede afkomstig was van ziekenhuizen of verzorgingstehuizen, is nader onderzoek in dergelijk afvalwater gewenst.

Voor zowel mest als afvalwater geldt dat de effectiviteit van de afname van ABR van deze innovatieve technieken vooral in laboratoriumsproeven en pilot-opstellingen onderzocht werd, maar nog beperkte ervaring in de praktijk is opgedaan. De effectiviteit van deze technieken hangt echter vaak van de heersende procesparameters af. Dit betreft bijvoorbeeld de bereikte temperatuur in vergisting en

compostering van mest, en de hoeveelheid ozon of UV die in de afvalwaterbehandeling wordt ingezet. Om een beter onderbouwde inschatting van de effectiviteit van deze beheersmaatregelen in de praktijk te kunnen maken, is daarom aanvullend onderzoek in praktijksituaties nodig.

Binnen de ketenaanpak geneesmiddelen worden beheersmaatregelen voor aanvullende zuivering van afvalwater overwogen. De voorgenomen maatregelen zullen ook bijdragen aan de vermindering van de verspreiding van antibioticaresiduen naar het milieu. Hoewel de ketenaanpak niet is gericht op het terugdringen van de resistentieproblematiek, zal deze aanpak ook bijdragen aan de verdere vermindering van de verspreiding van resistente bacteriën en genen. Het is zinvol om bij de keuze van technieken, naast de te behalen vermindering voor de residuen, ook rekening te houden met de mogelijk haalbare vermindering van bacteriën en genen.

7.3 Gevolgen van ABR in het milieu voor de volksgezondheid

Uit dit rapport blijkt dat ABR in het milieu wordt gebracht via afvalwater en mest. Mensen kunnen in meerdere of mindere mate aan ABR in milieucompartimenten worden blootgesteld. Een voorbeeld zijn ESBL-producerende bacteriën in recreatiewater onder invloed van afvalwater waarbij het zeer aannemelijk is dat mensen worden blootgesteld (Schijven et al., 2015).

Naast blootstelling aan ABR via het milieu vindt blootstelling aan ABR ook via vele andere routes plaats, zoals direct contact met mensen of dieren, door voedselconsumptie of bij een ziekenhuisopname. Omdat ABR via vele routes van en naar de mens overgedragen kan worden, is onderzoek naar de precieze bijdrage van alle verschillende bronnen complex van aard. Deze kennis zal naar verwachting ook niet binnen afzienbare tijd ter beschikking komen.

Voor enkele andere pathogenen bestaat al meer kennis over de bijdrage van verschillende routes, en is inzichtelijk dat overdracht via het milieu mogelijk is. Voor *Campylobacter*, *Salmonella* en shiga toxine producerende *E. coli* werd geschat dat blootstelling via water ongeveer 10% van de blootstelling kan verklaren, naast blootstelling via voedsel (Hald et al., 2016). Ook zijn de risico's verbonden met enkele specifieke routes van overdracht van resistente bacteriën onderzocht, zoals reizen naar bijvoorbeeld Azië of Zuid-Amerika (Arcilla et al., 2017; Paltansing et al., 2013), ziekenhuisopnames of overdracht tussen leden van een huishouden (Haverkate et al., 2017). Voor de bacterie MRSA, maar niet voor ESBL-EC, werd recent een lichte verhoging van het dragerschap onder omwonenden van veehouderijen aangetoond (Maassen et al., 2016). Samenvattend is over de mate van blootstelling via het milieu in relatie tot deze andere bronnen nog weinig bekend.

Ook studies naar de mogelijke gevolgen van blootstelling aan ABR in het milieu voor de volksgezondheid zijn vooralsnog niet beschreven, zoals ook werd geconcludeerd door Huijbers et al. (2015). De complexiteit van de keten blootstelling, kolonisatie, en ziekte speelt daarin een rol: opname van resistente bacteriën leidt niet automatisch tot ontwikkeling

van infecties. Mensen kunnen deze bacteriën ook bij zich dragen zonder ziektes te ontwikkelen. Deze relatie tussen blootstelling aan resistente bacteriën en ontwikkeling van ziekteverschijnselen is voor blootstelling aan ABR in het milieu net zo onbekend als voor andere blootstellingroutes, zoals consumptie van vlees of direct contact met dieren of mensen.

Het is van belang om te weten of blootstelling aan ABR in het milieu leidt tot nadelige gevolgen voor de volksgezondheid. Bovendien is het van belang te weten in welke mate dit gebeurt en hoe omvangrijk de gevolgen zijn, om beter af te kunnen wegen in welke mate maatregelen nodig zijn om de blootstelling aan ABR te verminderen. In algemene zin is het voorkomen van verspreiding van ABR naar het milieu wenselijk.

Methoden om de gezondheidsgevolgen van blootstelling aan ABR te onderzoeken omvatten epidemiologische studies naar dragerschap van ABR in mensen die via een bepaalde route zijn blootgesteld, kwantitatieve analyses van de blootstelling aan resistente bacteriën, en ziektelastschattingen. Verschillende strategieën om de ernst en impact door blootstelling aan ABR in het milieu te kwantificeren worden in Bijlage 9.12 nader beschreven.

Op korte termijn bieden epidemiologische studies van mensen die via een bepaalde route aan ABR in het milieu zijn blootgesteld (zoals door zwemmen in oppervlaktewater of door beroepsmatige blootstelling) de mogelijkheid om gevolgen van blootstelling voor dragerschap van BRMO te onderzoeken. Ook kan de opname van ABR via verschillende blootstellingsroutes onderzocht worden. Dit kan helpen om het relatieve belang van verschillende blootstellingsroutes te vergelijken.

8 Referenties

- Aalderink, H. & Moens, M.R. 2002. Maatregelenmatrix emissie-/waterkwaliteitsspoor. 2002-03. STOWA.
- Adamek, E., Baran, W. & Sobczak, A. 2016. Photocatalytic degradation of veterinary antibiotics: Biodegradability and antimicrobial activity of intermediates. *Process Safety and Environmental Protection*, 103, 1-9.
- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A. & Schwartz, T. 2016. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Science of the Total Environment*, 559, 103-112.
- Anonymous 2001. ISO 16649-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - part 2: Colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- Arcilla, M.S., van Hattem, J.M., Haverkate, M.R., Bootsma, M.C., van Genderen, P.J., Goorhuis, A., Grobusch, M.P., Lashof, A.M., Molhoek, N., Schultsz, C., Stobberingh, E.E., Verbrugh, H.A., de Jong, M.D., Melles, D.C. & Penders, J. 2017. Import and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis*, 17, 78-85.
- Arora, S. & Kazmi, A.A. 2016. Reactor performance and pathogen removal during wastewater treatment by vermifiltration. *Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development*, 6, 65-73.
- Arturo-Schaan, M., Tamanai-Shacoori, Z. & Cormier, M. 1995. Stability of plasmid-borne resistance of antibiotics during starvation of *Escherichia coli* in raw and treated waste water and brackish water. *Water Science and Technology*, 31, 199-202.
- Bagge, E., Sahlstrom, L. & Albihn, A. 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res*, 39, 4879-86.
- Batelaan, M.V., van den Berg, E.A., Koetse, E. & Wortel, N. 2012. Evaluatierapport Pharmafilter. 2012-29. STOWA.
- Bengtsson-Palme, J. & Larsson, D.G. 2016. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ Int*, 86, 140-9.
- Berendsen, B.J., Wegh, R.S., Memelink, J., Zuidema, T. & Stolker, L.A. 2015. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*, 132, 258-68.

Biswal, B.K., Khairallah, R., Bibi, K., Mazza, A., Gehr, R., Masson, L. & Frigon, D. 2014. Impact of UV and peracetic acid disinfection on the prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in uropathogenic escherichia coli in wastewater effluents. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 3656-3666.

Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M. & De Husman, A.M. R. 2015. Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing escherichia coli in dutch surface water and wastewater. *PLoS ONE*, 10.

Bonetta, S., Ferretti, E., Bonetta, S., Fezia, G. & Carraro, E. 2011. Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 552-557.

Bréchet, C., Plantin, J., Sauget, M., Thouverez, M., Talon, D., Cholley, P., Guyeux, C., Hocquet, D. & Bertrand, X. 2014. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing escherichia coli into the environment. *Clinical Infectious Diseases*, 58, 1658-1665.

Buelow, E. 2016. The human gut microbiota as a reservoir of antibiotic resistance. PhD, Utrecht University.

Calero-Cáceres, W. & Muniesa, M. 2016. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*, 95, 11-18.

Canter, N. 2008. Removing microbes from water. *Tribology and Lubrication Technology*, 64, 12-13.

Cattoir, V. & Leclercq, R. 2013. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother*, 68, 731-42.

Centraal Bureau voor de Statistiek 2016a. Dierlijke mest; productie, transport en gebruik; kerncijfers.

Centraal Bureau voor de Statistiek 2016b. Huishoudens; grootte, samenstelling, positie in het huishouden, 1 januari.

Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.F., Yannarell, A.C., Maxwell, S. & Aminov, R.I. 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual*, 38, 1086-108.

Childress, H., Sullivan, B., Kaur, J. & Karthikeyan, R. 2014. Effects of ultraviolet light disinfection on tetracycline-resistant bacteria in wastewater effluents. *Journal of Water and Health*, 12, 404-409.

Commissie integraal waterbeheer 2001a. Riooloverstorten Deel 1: Knelpuntcriteria riooloverstorten.

Commissie integraal waterbeheer 2001b. Riolverstorten Deel 2: Eenduidige basisinspanning

Conte, D., Palmeiro, J.K., da Silva Nogueira, K., de Lima, T.M.R., Cardoso, M.A., Pontarolo, R., Degaut Pontes, F.L. & Dalla-Costa, L.M. 2017. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 62-69.

Cote, C., Masse, D. I. & Quessy, S. 2006. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresour technol*, 97, 686-91.

Côté, C., Villeneuve, A., Lessard, L. & Quessy, S. 2006. Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Québec. *Livestock Science*, 102, 204-210.

Czekalski, N., Gascon Diez, E. & Burgmann, H. 2014. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J*, 8, 1381-90.

Czekalski, N., Imminger, S., Salhi, E., Veljkovic, M., Kleffel, K., Drissner, D., Hammes, F., Bürgmann, H. & Von Gunten, U. 2016. Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment. *Environmental Science and Technology*, 50, 11862-11871.

Da Silva, M.F., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R.A., Nunes, O.C. & Manaia, C.M. 2006. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 322-329.

de Cazes, M., Belleville, M.P., Petit, E., Salomo, M., Bayer, S., Czaja, R., De Gunzburg, J. & Sanchez-Marcano, J. 2016. Erythromycin degradation by esterase (EreB) in enzymatic membrane reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 70-78.

DELTARES & TNO 2016. Effluent RWZI's, regenwaterriolen, niet aangesloten riolen, overstorten en IBA's. *Emissieschattingen Diffuse bronnen Emissieregistratie*.

Drieux-Rouzet, L. & Jarlier, V. 2014. Multiresistant bacteria and water: The model of ESBL-producing enterobacteria. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2014, 75-79.

Dunlop, P.S.M., Ciavola, M., Rizzo, L., McDowell, D.A. & Byrne, J.A. 2015. Effect of photocatalysis on the transfer of antibiotic resistance genes in urban wastewater. *Catalysis Today*, 240, 55-60.

Elmi, F., Alinezhad, H., Moulana, Z., Salehian, F., Tavakkoli, S.M., Asgharpour, F., Fallah, H. & Elmi, M.M. 2014. The use of antibacterial activity of ZnO nanoparticles in the treatment of municipal wastewater. *Water Science and Technology*, 70, 763-770.

Espinoza-Quiñones, F.R., de Souza, A.R.C., Módenes, A.N., Trigueros, D.E.G., de Pauli, A.R., de Souza, P.S.C. & Kroumov, A.D. 2016. Removal Performance, Antibacterial Effects, and Toxicity Assessment of Ciprofloxacin Treated by the Electrocoagulation Process. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227.

Fahrenfeld, N., Knowlton, K., Krometis, L.A., Hession, W.C., Xia, K., Lipscomb, E., Libuit, K., Green, B.L. & Pruden, A. 2014. Effect of manure application on abundance of antibiotic resistance genes and their attenuation rates in soil: field-scale mass balance approach. *Environ Sci Technol*, 48, 2643-50.

Ferro, G., Fiorentino, A., Alferez, M.C., Polo-López, M.I., Rizzo, L. & Fernández-Ibáñez, P. 2014. Urban wastewater disinfection for agricultural reuse: Effect of solar driven AOPs in the inactivation of a multidrug resistant E. coli strain. *Applied Catalysis B: Environmental*, 178.

Ferro, G., Guarino, F., Castiglione, S. & Rizzo, L. 2016. Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H₂O₂ process. *Science of the Total Environment*, 560-561, 29-35.

Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R. & Jackson, R. B. 2005. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4117-4120.

Finch, G.R. & Smith, D.W. 1987. Ozone disinfection of secondary effluent containing antibiotic-resistant Escherichia coli. *Canadian journal of civil engineering*, 14, 234-238.

Fiorentino, A., Ferro, G., Alferez, M.C., Polo-Lóez, M. I., Fernández-Ibáñez, P. & Rizzo, L. 2015. Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after disinfection by solar-driven and chlorination processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 43-50.

Fremaux, B., Delignette-Muller, M.L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A. & Vernozy-Rozand, C. 2007. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing Escherichia coli in cow manure. *J Appl Microbiol*, 102, 89-99.

Galler, H., Feierl, G., Petternel, C., Reinthaler, F.F., Haas, D., Grisold, A.J., Luxner, J. & Zarfel, G. 2014. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect*, 20, O132-4.

Garcia, S., Wade, B., Bauer, C., Craig, C., Nakaoka, K. & Lorowitz, W. 2007. The effect of wastewater treatment on antibiotic resistance in Escherichia coli and Enterococcus sp. *Water Environment Research*, 79, 2387-2395.

Geofox 2012.

- Girlich, D., Poirel, L., Szczepanowski, R., Schluter, A. & Nordmann, P. 2012. Carbapenem-hydrolyzing GES-5-encoding gene on different plasmid types recovered from a bacterial community in a sewage treatment plant. *Appl Environ Microbiol*, 78, 1292-5.
- Guardabassi, L., Lo Fo Wong, D.M.A. & Dalsgaard, A. 2002. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*, 36, 1955-1964.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D. & Andersson, D.I. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*, 7, e1002158.
- Haack, S.K., Duris, J.W., Fogarty, L.R., Kolpin, D.W., Focazio, M.J., Furlong, E.T. & Meyer, M.T. 2009. Comparing wastewater chemicals, indicator bacteria concentrations, and bacterial pathogen genes as fecal pollution indicators. *Journal of Environmental Quality*, 38, 248-258.
- Hald, T., Aspinall, W., Devleeschauwer, B., Cooke, R., Corrigan, T., Havelaar, A.H., Gibb, H.J., Torgerson, P.R., Kirk, M.D., Angulo, F.J., Lake, R.J., Speybroeck, N. & Hoffmann, S. 2016. World Health Organization Estimates of the Relative Contributions of Food to the Burden of Disease Due to Selected Foodborne Hazards: A Structured Expert Elicitation. *PLoS One*, 11, e0145839.
- Harris, S., Morris, C., Morris, D., Cormican, M. & Cummins, E. 2014. Antimicrobial resistant Escherichia coli in the municipal wastewater system: Effect of hospital effluent and environmental fate. *Science of the Total Environment*, 468-469, 1078-1085.
- Haverkate, M.R., Platteel, T.N., Fluit, A.C., Cohen Stuart, J.W., Leverstein-van Hall, M.A., Thijsen, S.F., Scharringa, J., Kloosterman, R.C., Bonten, M.J. & Bootsma, M.C. 2017. Quantifying within-household transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria. *Clin Microbiol Infect*, 23, 46 e1-46 e7.
- Heß, S. & Gallert, C. 2015. Sensitivity of antibiotic resistant and antibiotic susceptible Escherichia coli, Enterococcus and Staphylococcus strains against ozone. *Journal of Water and Health*, 13, 1020-1028.
- Heuer, H., Schmitt, H. & Smalla, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol*, 14, 236-43.
- Hocquet, D., Muller, A. & Bertrand, X. 2016. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, 93, 395-402.
- Hoeksma, P., Aarnink, A.J.A., de Buissonjé, F.E., Rutjes, S.A. & Blaak, H. 2015. Effect van processtappen op overleving van micro-organismen bij mestverwerking. In: WUR (ed.) *Rapport 839*.

- Homem, V. & Santos, L. 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - a review. *J Environ Manage*, 92, 2304-47.
- Hu, Q., Zhang, X.X., Jia, S., Huang, K., Tang, J., Shi, P., Ye, L. & Ren, H. 2016. Metagenomic insights into ultraviolet disinfection effects on antibiotic resistome in biologically treated wastewater. *Water Research*, 101, 309-317.
- Huang, J.J., Hu, H.Y., Wu, Y.H., Wei, B. & Lu, Y. 2013. Effect of chlorination and ultraviolet disinfection on tetA-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *Chemosphere*, 90, 2247-2253.
- Huijbers, P.M., Blaak, H., de Jong, M.C., Graat, E.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M. & de Roda Husman, A.M. 2015. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. *Environ Sci Technol*, 49, 11993-2004.
- Jansen, E.J. & van den Bos, L. 2010. Knelpuntenbeoordelingsmethode waterkwaliteitsspoor overstorten. 2010-17. STOWA.
- Jung, C.M., Heinze, T.M., Strakosha, R., Elkins, C.A. & Sutherland, J.B. 2009. Acetylation of fluoroquinolone antimicrobial agents by an *Escherichia coli* strain isolated from a municipal wastewater treatment plant. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 564-571.
- Kadir, K. & Nelson, K.L. 2014. Sunlight mediated inactivation mechanisms of *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* in clear water versus waste stabilization pond water. *Water Research*, 50, 307-317.
- Kalaiselvi, K., Mangayarkarasi, V., Balakrishnan, D. & Chitrалека, V. 2016. Survival of antibacterial resistance microbes in hospital-generated recycled wastewater. *Journal of Water and Health*, 14, 942-949.
- Karaolia, P., Michael-Kordatou, I., Hapeshi, E., Alexander, J., Schwartz, T. & Fatta-Kassinos, D. 2017. Investigation of the potential of a Membrane BioReactor followed by solar Fenton oxidation to remove antibiotic-related microcontaminants. *Chemical Engineering Journal*, 310, 491-502.
- Karaolia, P., Michael, I., García-Fernández, I., Agüera, A., Malato, S., Fernández-Ibáñez, P. & Fatta-Kassinos, D. 2014. Reduction of clarithromycin and sulfamethoxazole-resistant *Enterococcus* by pilot-scale solar-driven Fenton oxidation. *Science of the Total Environment*, 468-469, 19-27.
- Kearney, T.E., Larkin, M.J., Frost, J.P. & Levett, P.N. 1993. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J Appl Bacteriol*, 75, 215-9.
- Khan, S.J. & Ongerth, J.E. 2004. Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere*, 54, 355-67.

Kibbee, R.J. & Örmeci, B. 2017. Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC *Escherichia coli* and evaluate disinfection performance in wastewater effluent. *Journal of Microbiological Methods*, 132, 139-147.

Knapp, C. W., Zhang, W., Sturm, B. S. M. & Graham, D. W. 2010. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. *Environmental Pollution*, 158, 1506-1512.

Koivunen, J., Siitonen, A. & Heinonen-Tanski, H. 2003. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Research*, 37, 690-698.

Korzeniewska, E., Korzeniewska, A. & Harnisz, M. 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 96-102.

Kuo, J. & Chan, T.F. 2012. Disinfection and antimicrobial processes. *Water Environment Research*, 84, 1286-1309.

Kuo, J.F. & Chen, J. 2006. Disinfection and Antimicrobial Processes. *Water Environment Research*, 78, 1406-1428.

Leverstein-van Hall, M., Cohen Stuart, J.W., Voets, G., Versteeg, D., Roelofsen, E. & Fluit, A. 2010. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* following foreign travel. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 154, A2013-A2013.

Li, Y., Qu, X., Yu, R. & Ikehata, K. 2015. Health effects associated with wastewater treatment, reuse, and disposal. *Water Environment Research*, 87, 1817-1848.

Lienert, J., Gudel, K. & Escher, B. I. 2007. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environ Sci Technol*, 41, 4471-8.

Liu, M., Zhang, Y., Yang, M., Tian, Z., Ren, L. & Zhang, S. 2012. Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system. *Environmental Science and Technology*, 46, 7551-7557.

Lopes, T.R., Periotto, F. & Pletsch, A.L. 2017. Bacterial resistance in sanitary sewage sludge in different treatment systems. *Management of Environmental Quality*, 28, 32-42.

Lucena, F., Duran, A.E., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Gantzer, C., Skraber, S. & Jofre, J. 2004. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1069-1076.

Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Bray, R., Kulbat, E., Quant, B., Sokolowska, A. & Olanczuk-Neyman, K. 2011. Antimicrobial resistance of fecal indicators in disinfected wastewater. *Water Science and Technology*, 64, 2352-2361.

Lüddeke, F., Hess, S., Gallert, C., Winter, J., Gude, H. & Löffler, H. 2015a. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Res*, 69, 243-51.

Lüddeke, F., Hess, S., Gallert, C., Winter, J., Güde, H. & Löffler, H. 2015b. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research*, 69, 243-251.

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S. & Wang, X.C. 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci Total Environ*, 473-474, 619-41.

Luprano, M.L., De Sanctis, M., Del Moro, G., Di Iaconi, C., Lopez, A. & Levantesi, C. 2016. Antibiotic resistance genes fate and removal by a technological treatment solution for water reuse in agriculture. *Science of the Total Environment*, 571, 809-818.

Maassen, K., Smit, L., Wouters, I., van Duijkeren, E., Janse, I., Hagenars, T., IJzermans, J., van der Hoek, W. & Heederik, D. 2016. Veehouderij en gezondheid omwonenden. In: RIVM (ed.) *report*. RIVM.

Macku'ak, T., Nagyová, K., Faberová, M., Grabic, R., Koba, O., Gál, M. & Birošová, L. 2015. Utilization of Fenton-like reaction for antibiotics and resistant bacteria elimination in different parts of WWTP. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 492-497.

Marti, E., Jofre, J. & Balcazar, J. L. 2013. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in a River Influenced by a Wastewater Treatment Plant. *PLoS ONE*, 8, e78906.

Martins da Costa, P., Vaz-Pires, P. & Bernardo, F. 2006. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, 40, 1735-1740.

Masse, D.I., Saady, N.M. & Gilbert, Y. 2014. Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals (Basel)*, 4, 146-63.

McCarthy, G., Lawlor, P.G., Carney, K.N., Zhan, X., Gutierrez, M. & Gardiner, G.E. 2015. An investigation into the removal of *Salmonella* and enteric indicator bacteria from the separated liquid fraction of raw or anaerobically digested pig manure using novel on-farm woodchip biofilters. *Science of the Total Environment*, 514, 140-146.

- McCarthy, G., Lawlor, P.G., Gutierrez, M. & Gardiner, G.E. 2013. Assessing the biosafety risks of pig manure for use as a feedstock for composting. *Sci Total Environ*, 463-464, 712-9.
- Mendez, J.M., Jimenez, B. & Maya, C. 2004. Disinfection kinetics of pathogens in physicochemical sludge treated with ammonia. *Water Science and Technology*.
- Mevius, D., Dierikx, C., Veldman, K. & Wit, B. 2015. MARAN 2015. Central Veterinary Institute of Wageningen University and Research Centre.
- Michael-Kordatou, I., Andreou, R., Iacovou, M., Frontistis, Z., Hapeshi, E., Michael, C. & Fatta-Kassinos, D. 2017. On the capacity of ozonation to remove antimicrobial compounds, resistant bacteria and toxicity from urban wastewater effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 414-425.
- Michael, I., Hapeshi, E., Michael, C., Varela, A.R., Kyriakou, S., Manaia, C.M. & Fatta-Kassinos, D. 2012. Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. *Water Research*, 46, 5621-5634.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C. & Fatta-Kassinos, D. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res*, 47, 957-95.
- Moermond, C.T.A., Smit, C.E., van Leerdam, R.C., van der Aa, N.G.F.M. & Montforts, M.H.M.M. 2016. Geneesmiddelen en waterkwaliteit. 2016-0111. RIVM.
- Moriarty, E., Nourozi, F., Robson, B., Wood, D. & Gilpin, B. 2008. Evidence for growth of enterococci in municipal oxidation ponds, obtained using antibiotic resistance analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7204-7210.
- Mulder, M., Antakyali, D. & Ante, S. 2015. Verwijdering van microverontreinigingen uit effluenten van RWZIs. 2015-27. STOWA.
- Munakata, N. & Kuo, J. 2014. Disinfection processes. *Water Environment Research*, 86, 1250-1273.
- Munir, M., Wong, K. & Xagorarakis, I. 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res*, 45, 681-93.
- Nagulapally, S.R., Ahmad, A., Henry, A., Marchin, G.L., Zurek, L. & Bhandari, A. 2009. Occurrence of ciprofloxacin-, trimethoprim-sulfamethoxazole-, and vancomycin-resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Water Environment Research*, 81, 82-90.

- Narciso-da-Rocha, C. & Manaia, C.M. 2017. The influence of the autochthonous wastewater microbiota and gene host on the fate of invasive antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment*, 575, 932-940.
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M. & Niestępski, S. 2017. The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Science of the Total Environment*, 577, 367-375.
- Pablos, C., Van Grieken, R., Marugań, J. & Muñoz, A. 2012. Simultaneous photocatalytic oxidation of pharmaceuticals and inactivation of *Escherichia coli* in wastewater treatment plant effluents with suspended and immobilised TiO₂. *Water Science and Technology*, 65, 2016-2023.
- Pak, G., Salcedo, D.E., Lee, H., Oh, J., Maeng, S.K., Song, K.G., Hong, S.W., Kim, H.C., Chandran, K. & Kim, S. 2016. Comparison of Antibiotic Resistance Removal Efficiencies Using Ozone Disinfection under Different pH and Suspended Solids and Humic Substance Concentrations. *Environmental Science and Technology*, 50, 7590-7600.
- Paltansing, S., Vlot, J.A., Kraakman, M.E., Mesman, R., Bruijning, M.L., Bernards, A.T., Visser, L.G. & Veldkamp, K.E. 2013. Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae among travelers from the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 19, 1206-13.
- Pandey, P.K. & Soupir, M.L. 2011. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express*, 1, 18.
- Park, E., Mancl, K.M., Tuovinen, O.H., Bisesi, M.S. & Lee, J. 2016. Ensuring safe reuse of residential wastewater: reduction of microbes and genes using peat biofilter and batch chlorination in an on-site treatment system. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 1777-1788.
- PBL 2017. Evaluatie Meststoffenwet 2016: Syntheserapport. Den Haag.
- Pei, R., Kim, S.-C., Carlson, K. H. & Pruden, A. 2006. Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 40, 2427-2435.
- Pereira, J.H.O.S., Queirós, D.B., Reis, A.C., Nunes, O.C., Borges, M.T., Boaventura, R.A.R. & Vilar, V.J.P. 2014a. Process enhancement at near neutral pH of a homogeneous photo-Fenton reaction using ferricarboxylate complexes: Application to oxytetracycline degradation. *Chemical Engineering Journal*, 253, 217-228.
- Pereira, J.H.O.S., Reis, A.C., Homem, V., Silva, J.A., Alves, A., Borges, M.T., Boaventura, R.A.R., Vilar, V.J.P. & Nunes, O.C. 2014b. Solar photocatalytic oxidation of recalcitrant natural metabolic by-products of amoxicillin biodegradation. *Water Research*, 65, 307-320.

Perilli, M., Bottoni, C., Pontieri, E., Segatore, B., Celenza, G., Setacci, D., Bellio, P., Strom, R. & Amicosante, G. 2013. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a in *Klebsiella pneumoniae* ST512 in the municipal wastewater treatment plant and in the university hospital of a town in central Italy. *J Glob Antimicrob Resist*, 1, 217-220.

Pillay, L. & Olaniran, A.O. 2016. Assessment of physicochemical parameters and prevalence of virulent and multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* in treated effluent of two wastewater treatment plants and receiving aquatic milieu in Durban, South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188.

platform BRMO buiten zorginstellingen 2016. LCI-richtlijn BRMO.

Poornima Parvathi, V., Umadevi, M. & Bhaviya Raj, R. 2015. Improved waste water treatment by bio-synthesized Graphene Sand Composite. *Journal of Environmental Management*, 162, 299-305.

Ragazzo, P., Chiucchini, N., Piccolo, V. & Ostoich, M. 2013. A new disinfection system for wastewater treatment: Performic acid full-scale trial evaluations. *Water Science and Technology*, 67, 2476-2487.

Reinthalder, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F. & Marth, E. 2003. Antibiotic resistance of *E. Coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 37, 1685-1690.

Riaño, B. & García-González, M.C. 2014. On-farm treatment of swine manure based on solid-liquid separation and biological nitrification-denitrification of the liquid fraction. *Journal of Environmental Management*, 132, 87-93.

Rijkswaterstaat Water, V. e. L. 2017. *Helpdesk water* [Online].

RIVM 2014. Advies preventie en bestrijding van carbapenemresistentie in Nederland.

Rizzo, L., Della Sala, A., Fiorentino, A. & Li Puma, G. 2014a. Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp - TiO₂ photocatalysis: Effect on a multi drug resistant *Escherichia coli* strain. *Water Research*, 53, 145-152.

Rizzo, L., Ferro, G. & Manaia, C.M. 2014b. Wastewater disinfection by solar heterogeneous photocatalysis: Effect on tetracycline resistant/sensitive enterococcus strains. *Global Nest Journal*, 16, 455-462.

Rizzo, L., Fiorentino, A. & Anselmo, A. 2012. Effect of solar radiation on multidrug resistant *E. coli* strains and antibiotic mixture photodegradation in wastewater polluted stream. *Science of the Total Environment*, 427-428, 263-268.

Rizzo, L., Fiorentino, A. & Anselmo, A. 2013a. Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: Effect on antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* strains. *Chemosphere*, 92, 171-176.

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I. & Fatta-Kassinos, D. 2013b. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ*, 447, 345-60.

Rizzo, L., Sannino, D., Vaiano, V., Sacco, O., Scarpa, A. & Pietrogiacomi, D. 2013c. Effect of solar simulated N-doped TiO₂ photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of an E. coli strain in biologically treated urban wastewater. *Applied Catalysis B: Environmental*, 144, 369-378.

Sahlstrom, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.L. & Albiñ, A. 2008. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresour technol*, 99, 7859-65.

Samra, T. & Kuo, J. 2013. Disinfection and antimicrobial processes. *Water Environment Research*, 85, 1262-1282.

Schets, F.M., de Man, H., van Leuken, J.P.G. & de Roda Husman, A.M. 2017. De 'waterkwaliteitscheck' voor nieuwe en bestaande stedelijk waterconcepten. RIVM Report 2017-0012.

Scheurer, M., Hess, S., Lüddeke, F., Sacher, F., Güde, H., Löffler, H. & Gallert, C. 2015. Removal of micropollutants, facultative pathogenic and antibiotic resistant bacteria in a full-scale retention soil filter receiving combined sewer overflow. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 17, 186-196.

Schijven, J.F., Blaak, H., Schets, F.M. & de Roda Husman, A.M. 2015. Fate of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Escherichia coli from Faecal Sources in Surface Water and Probability of Human Exposure through Swimming. *Environ Sci Technol*, 49, 11825-33.

Schmitt, H., ter Laak, T. & Duis, K. 2017. Development and dissemination of antibiotic resistance in the environment under environmentally relevant concentrations of antibiotics and its risk assessment. UBA.

Semenov, A.V., van Bruggen, A.H., van Overbeek, L., Termorshuizen, A.J. & Semenov, A.M. 2007. Influence of temperature fluctuations on Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiol Ecol*, 60, 419-28.

Sharma, R., Larney, F.J., Chen, J., Yanke, L.J., Morrison, M., Topp, E., McAllister, T.A. & Yu, Z. 2009. Selected antimicrobial resistance during composting of manure from cattle administered sub-therapeutic antimicrobials. *J Environ Qual*, 38, 567-75.

Simões, G.A.R., Xavier, M.A.S., Oliveira, D.A., Menezes, E.V., Magalhães, S.S.G., Gandra, J.A.C.D. & Xavier, A.R.E.O. 2016. Genetic markers for detection of Escherichia coli K-12 harboring ampicillin-resistance plasmid from an industrial wastewater treatment effluent pond. *Genetics and Molecular Research*, 15.

Soda, S., Otsuki, H., Inoue, D., Tsutsui, H., Sei, K. & Ike, M. 2008. Transfer of antibiotic multiresistant plasmid RP4 from escherichia coli to activated sludge bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 292-296.

Sousa, J.M., Macedo, G., Pedrosa, M., Becerra-Castro, C., Castro-Silva, S., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., Nunes, O.C. & Manaia, C.M. 2017. Ozonation and UV254 nm radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 434-441.

Stampi, S., De Luca, G., Onorato, M., Ambrogiani, E. & Zanetti, F. 2002. Peracetic acid as an alternative wastewater disinfectant to chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 725-731.

Stichting Rioned 2010. Vaststellen en opsporen van foutaansluitingen.

SWAB 2015. Nethmap 2015.

Telles Benatti, C., Granhen Tavares, C.R., Dias Filho, B.P. & Ribeiro Moitinho, M.D.L. 2002. Operation of a slow rate anaerobic digester treating municipal secondary sludge. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 23-34.

Templeton, M.R., Oddy, F., Leung, W.K. & Rogers, M. 2009. Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimethoprim-resistant *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 36, 889-894.

Tewfike, T.A., Gomaa, H.H.A. & Nassar, E.A. 2016. A novel strategy for removal of pathogenic bacteria for wastewater treatment. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10, 129-137.

Van Aken, B. & Lin, L.S. 2011. Effect of the disinfection agents chlorine, UV irradiation, silver ions, and TiO₂ nanoparticles/near-UV on DNA molecules. *Water Science and Technology*, 64, 1226-1232.

Vaz-Moreira, I., Varela, A.R., Pereira, T.V., Fochat, R.C. & Manaia, C.M. 2016. Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microb Drug Resist*, 22, 155-63.

Veldman, K., Mevius, D. & Wit, B. 2016. MARAN 2016. Central Veterinary Institute of Wageningen University and Research Centre.

Venieri, D., Chatzisyneon, E., Sofianos, S. S., Politi, E., Xekoukoulotakis, N.P., Katsaounis, A. & Mantzavinos, D. 2012. Removal of faecal indicator pathogens from waters and wastewaters by photoelectrocatalytic oxidation on TiO₂/Ti films under simulated solar radiation. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 3782-3790.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Jelic, A., Petrovic, M. & Barcelo, D. 2014. Comparison of measured and predicted concentrations of selected pharmaceuticals in wastewater and surface water: a case study of a

catchment area in the Po Valley (Italy). *Sci Total Environ*, 470-471, 844-54.

Vukoje, I.D., Džunuzović, E.S., Lončarević, D.R., Dimitrijević, S., Ahrenkiel, S.P. & Nedeljković, J.M. 2015. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of silver nanoparticles on poly(GMA-co-EGDMA) polymer support. *Polymer Composites*.

VWS (2015). Kamerbrief over aanpak antibioticaresistentie. Den Haag.

Wang, J., Mao, D., Mu, Q. & Luo, Y. 2015. Fate and proliferation of typical antibiotic resistance genes in five full-scale pharmaceutical wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*, 526, 366-73.

Wang, L., Oda, Y., Grewal, S., Morrison, M., Michel, F.C., Jr. & Yu, Z. 2012. Persistence of resistance to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon treatments. *Microb Ecol*, 63, 32-40.

White, L., Hopkins, K.L., Meunier, D., Perry, C.L., Pike, R., Wilkinson, P., Pickup, R.W., Cheesbrough, J. & Woodford, N. 2016. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in hospital wastewater: a reservoir that may be unrelated to clinical isolates. *J Hosp Infect*, 93, 145-51.

Yang, F., Mao, D., Zhou, H. & Luo, Y. 2016. Prevalence and fate of carbapenemase genes in a wastewater treatment plant in northern China. *PLoS ONE*, 11.

Youngquist, C.P., Mitchell, S.M. & Cogger, C.G. 2016. Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance during Digestion and Composting: A Review. *J Environ Qual*, 45, 537-45.

Yuan, H., Miller, J.H., Abu-Reesh, I.M., Pruden, A. & He, Z. 2016a. Effects of electron acceptors on removal of antibiotic resistant *Escherichia coli*, resistance genes and class 1 integrons under anaerobic conditions. *Science of the Total Environment*, 569-570, 1587-1594.

Yuan, Q.B., Guo, M.T., Wei, W.J. & Yang, J. 2016b. Reductions of bacterial antibiotic resistance through five biological treatment processes treated municipal wastewater. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, 19495-503.

Zhang, C.M., Miao, Y.H., Zhang, Q.P. & Xu, H. 2014. Effects of chlorination and ultraviolet disinfection on antibiotic resistance of fecal coliforms in secondary settling tank effluent of municipal wastewater treatment plant. *Research of Environmental Sciences*, 27, 422-426.

9 Bijlagen

9.1 **Bijlage A. Keuze van de onderzochte bijzonder resistente bacteriën, antibioticaresiduen en resistentiegenen**

Dit onderzoek richt zich op ESBL-producerende Enterobacteriaceae (ESBL-Ent), vancomycineresistente enterokokken (VRE) en carbapenemresistente Enterobacteriaceae (CRE).

ESBL-Ent en VRE stonden ook centraal in de eerder genoemde ZonMw Kennissynthese van Huijbers et al. (2015). Deze bacteriën zijn geclassificeerd als BRMO (Bijzonder Resistente Micro-organismen). Deze zijn klinisch relevant vanwege hun mogelijkheid het menselijk en dierlijk maagdarmkanaal te koloniseren. Daardoor kunnen deze bacteriën in grote aantallen in humane en dierlijke feces vóórkomen en dus in afvalwater en mest.

CRE is in dit onderzoek geïnccludeerd vanwege de dreiging die van deze soort uitgaat voor de volksgezondheid: het antibioticum carbapenem behoort namelijk tot de groep van laatste redmiddel antibiotica.

De Meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* -bacterie – die ook centraal stond in de kennissynthese – valt niet binnen de scope van dit project. Fecale verspreiding is namelijk niet de belangrijkste transmissieroute van deze bacterie.

Naast deze resistente bacteriën behoort het vóórkomen van resistentiegenen (inclusief ESBL-genen) tot de focus van dit onderzoek. Er werden voor dit onderzoek resistentiegenen gekozen die resistenties voor verschillende groepen antibiotica veroorzaken (*ermB* voor macrolides, *sul1* voor sulfonamides, en CTX-M voor resistenties tegen extended spectrum beta lactam antibiotica), en waarvan bekend is dat ze in relatief hoge concentraties in humane feces en afvalwater kunnen voorkomen.

De onderzochte antibioticaresiduen omvatten alle bekende klassen van antibiotica (met uitzondering van de nitrofurantoinen), en binnen deze klassen de meeste stoffen die in Nederland gebruikt worden.

9.2 **Bijlage B - Meetplan en methoden nulmetingen**

Meetplan nulmetingen

RWZI's kunnen sterk verschillen in capaciteit, toegepaste zuiveringstechnieken en het aantal aangesloten zorginstellingen en huishoudens. Daarom zijn 100 van de 341 RWZI's geselecteerd voor bemonstering, waarbij er gelet is op voldoende variatie op basis van de capaciteit, aanvoer van één of meer ziekenhuizen, poliklinieken en/of verzorgingshuizen. Verder is rekening gehouden met de toepassing van chemische of biologische technieken waarmee fosfaat en stikstof uit het water worden verwijderd, alsook eventuele toepassing van desinfectietechnieken en de mate van slibbelasting. Zie voor een overzicht van alle geselecteerde RWZI's Figuur 3-8. Meer informatie over de selectie en de eigenschappen van de onderzochte afvalwaterzuiveringsinstallaties zijn weergegeven in Bijlage 9.4.

Detectiemethoden

In 2015 werden in een pilotstudie meetmethoden voor de kweek van resistente bacteriën geoptimaliseerd bij een aantal geselecteerde RWZI's (zie Bijlage 9.3). De uiteindelijke nulmetingen vonden in 2016 plaats.

Van iedere RWZI werden op één tijdstip in 2016 één monster van het influent en één monster van het effluent genomen (24 uur mengmonsters). De bemonsteringen werden verdeeld over het hele jaar. Voor de detectie van bacteriën, genen, en antibioticumresiduen werden verschillende technieken toegepast op dezelfde samples:

- Bacteriën worden aangetoond door ze te kweken op een speciale voedingsbodem. Doordat deze aangevuld zijn met de relevante antibiotica, wordt een kwantitatief beeld verkregen van de aanwezige (resistente) bacteriën.
- Resistentiegenen werden met de techniek *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) aangetoond. Daarbij werd onderzocht of uit de monsters geëxtraheerde DNA bekende resistentiegenen bevat.
- Antibioticumresiduen kunnen aangetoond worden door middel van de combinatie van twee technieken: *Liquid Chromatography* (LC) en *Mass Spectrometry* (MS). Hiermee kan een groot aantal verschillende antibioticumresiduen specifiek en kwantitatief gedetermineerd worden.

De methoden zijn nader beschreven in Bijlage 9.5.

9.3 Bijlage C – Resultaten pilotmetingen 2015

In 2015 zijn pilotmetingen uitgevoerd in vijf RWZI's. Het voornaamste doel was het opzetten en stroomlijnen van de meetmethoden voor CRE en VRE, ter voorbereiding op de nulmetingen van de onderhavige studie. Het afvalwater (influent en effluent) van de vijf RWZI's is in totaal negen keer bemonsterd, om in literatuur beschreven methoden voor de isolatie en kwantificering van CRE en VRE te kunnen uitproberen, vergelijken en optimaliseren. Om de specificiteit van de isolatiemethoden te testen, zijn de verkregen stammen moleculair en biochemisch gekarakteriseerd (d.w.z. ter bevestiging dat de geïsoleerde bacteriën inderdaad VRE en CRE waren). Parallel aan de VRE- en CRE-analyses zijn de monsters ook geanalyseerd op ESBL-producerende *E. coli*, totale *E. coli* en totale enterokokken (gebruikmakend van bestaande protocollen), om de aantallen VRE en CRE daarmee te kunnen vergelijken. De resultaten van deze pilotmetingen zullen beschreven worden in een wetenschappelijke publicatie.

9.3.1 VRE-bacteriën

De aanwezigheid van VRE is onderzocht in drie RWZI's. In alle drie werden VRE-bacteriën aangetoond in het ongezuiverde afvalwater (influent). In twee van de drie RWZI's werden VRE ook aangetoond in het gezuiverde afvalwater (effluent).

9.3.2 CRE-bacteriën

Beschrijving

CRE-bacteriën werden aangetoond in het inkomende afvalwater van alle vijf onderzochte RWZI's. Bij twee RWZI's die twee keer werden onderzocht werden beide keren CRE aangetroffen. Bij vier van de vijf

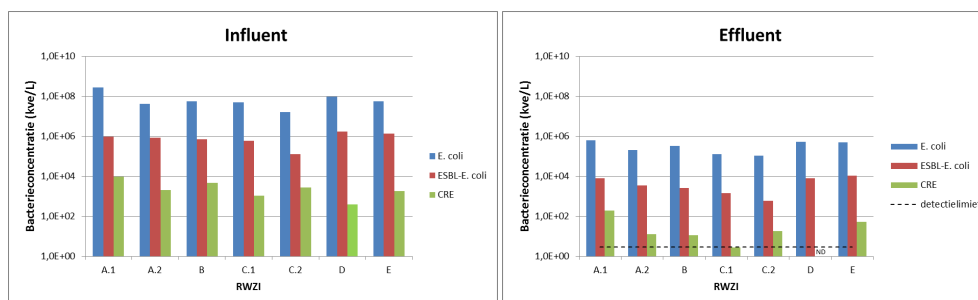
RWZI's werden CRE ook aangetoond in het effluent. Bij één van de RWZI's werd de aanwezigheid van CRE ook onderzocht en aangetroffen in het influent.

In totaal werden vier verschillende carbapenemresistente bacteriesoorten gevonden: *E. coli* (in alle vijf RWZI's), *Klebsiella pneumoniae* (in drie RWZI's), *Enterobacter aerogenes* (in één RWZI) en *Enterobacter cloacae* (in twee RWZI's). In één van de RWZI's werden alle vijf soorten CRE-bacteriën aangetroffen.

In totaal zijn er 150 CRE-isolaten verkregen en onderzocht op de aanwezigheid van de meest voorkomende CRE-genen: NDM, KPC en OXA-48. In 66% van de isolaten werd OXA-48 of een daaraan verwante variant aangetroffen (in vijf RWZI's), in 4% van de isolaten werd NDM-5 aangetoond (in twee RWZI's) en in 8% KPC-3 (in één RWZI). NDM werd alleen in *E. coli* aangetroffen, KPC in *K. pneumoniae* en *E. cloacae* complex.

Visuele weergave

Figuur 9-1 geeft de gemeten concentraties weer per RWZI. De concentraties CRE varieerden in het influent van $3,9 \times 10^2$ tot $9,9 \times 10^3$ kolonievormende eenheden (kve) per liter water, met een gemiddelde van $3,3 \times 10^3$ kve/L (Figuur 5.1). In het effluent varieerde het van < 3 kve per liter (de detectiegrens van de methode) tot 200 (gemiddelde 43 kve per liter). In vergelijking met de totale concentraties *E. coli* zijn de aantallen CRE in het effluent ongeveer 1.000 tot meer dan 10.000 keer lager. In vergelijking met de aantallen ESBL-producerende *E. coli* zijn deze ongeveer dus 10 tot 100 keer lager.



Figuur 9-1. Concentraties *E. coli*, ESBL-producerende *E. coli* en CRE in het influent en effluent. Op de x-as zijn de vijf verschillende RWZI's weergegeven als A t/m E, waarbij cijfers de verschillende monsternames weergeven (ND=niet gedetecteerd).

9.4 Bijlage D – Selectie RWZI's voor de nulmetingen in afvalwater

Voor de nulmetingen in afvalwater worden in totaal 100 van de 341 rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) bemonsterd. Van iedere RWZI worden op twee tijdstipmomenten samples genomen van het inkomende afvalwater (influent) en het uitgaande, gezuiverde water (effluent). De RWZI's zijn volgens de onderstaande systematiek geselecteerd.

Gegevens RWZI's

Bij het Centraal Bureau voor de Statistiek (CBS) zijn gegevens over de toegepaste zuiveringsprocessen en debieten per RWZI opgevraagd. Van

de meeste gebieden in Nederland is bekend op welke RWZI deze zijn aangesloten.

Koppelen ziekenhuizen en verzorgingshuizen aan RWZI's

Per ziekenhuis en verzorgingshuis is bepaald op welke RWZI zij hun afvalwater lozen. De gegevens van ziekenhuizen zijn afkomstig van de database www.volksgezondheidszorg.info aangevuld met gegevens van Wikipedia⁹. Gegevens over verzorgingshuizen zijn afkomstig van de Zorgkaart Nederland¹⁰. De adressen van de zorginstellingen zijn alle handmatig gecontroleerd. Ook is nagegaan per zorginstelling of het een ziekenhuisvestiging of polikliniek betreft.

Door deze gegevens te koppelen aan de gegevens van de RWZI's werd bepaald op welke RWZI's de ziekenhuizen en verzorgingshuizen hun afvalwater lozen.

Classificatie

De RWZI's zijn geclassificeerd op de volgende criteria:

1. Capaciteit in inwonerequivalenten (i.e.): minder dan 10.000 (69 RWZI's), 10.000 tot 50.000 (147x), 50.000 tot 100.000 (64x), 100.000 tot 500.000 (58x) of meer dan 500.000 (3x) i.e.
2. Aansluiting één of meer ziekenhuizen (ja/nee), poliklinieken (ja/nee) en/of verzorgingshuizen (ja/nee). Dit levert de volgende combinaties op: 0-0-0 (31x), 0-0-1 (158x), 0-1-0 (1x), 0-1-1 (67x), 1-0-0 (0x), 1-0-1 (52x), 1-1-0 (0x) en 1-1-1 (28x).
3. Het aandeel afvalwater uit zorginstellingen als deel van het totale afvalwater: 0% (259x), 0 tot 0,25% (4x), 0,25 tot 0,75% (52x), 0,75 tot 1,25% (23x) of meer dan 1,25% (14x).

Selectie

Vervolgens is besloten te focussen op de categorieën 0-0-0 (géén zorginstelling), 0-0-1 (alléén poliklinieken), 1-0-1 (geen verzorgingshuizen) en 1-1-1 (alle type zorginstellingen) uit onderdeel 2, hetgeen resulteerde in 269 overgebleven RWZI's. Categorie 0-1-1 (geen ziekenhuis, wel één of meer verzorgingshuizen en poliklinieken) is buiten beschouwing gelaten, omdat hiermee het individuele effect van de drie type zorginstellingen niet afzonderlijk te bepalen is.

De overgebleven RWZI's zijn ingedeeld op basis van de mogelijke combinaties van de drie bovengenoemde criteria. Dit resulteerde in 24 groepen met één of meer RWZI's. Uit elke groep is evenredig een aantal RWZI's random geselecteerd, zó dat het totaal aantal geselecteerde RWZI's 100 bedroeg.

Na deze eerste random selectie is beoordeeld hoe de 100 geselecteerde RWZI's verdeeld waren voor wat betreft het type fosfaatverwijdering en denitrificatie. Waar mogelijk is de selectie vervolgens handmatig aangepast, zó dat de klasse-indelingen voor fosfaatverwijdering en denitrificatie zo goed mogelijk verdeeld waren over de verschillende groepen.

⁹ https://nl.wikipedia.org/wiki/Lijst_van_Nederlandse_ziekenhuizen
https://nl.wikipedia.org/wiki/Lijst_van_Nederlandse_ziekenhuizen. [4.10.2017]

¹⁰ <https://www.zorgkaartnederland.nl/overzicht/sectoren/verpleeghuizen-en-verzorgingshuizen/zorgaanbieders/plaatsen>

9.5 Bijlage E – Methoden voor ABR in afvalwater

9.5.1 *Verkrijgen watermonsters*

De monsters werden genomen door het personeel van de RWZI's. Hiervoor werden speciale bemonsteringskasten gebruikt, één voor influent en één voor effluent, waarmee elke RWZI uitgerust is. Deze kasten bemonsteren het langstromende afvalwater gedurende een periode van 24 uur. Dit gebeurt debiet-proportioneel, d.w.z. dat er een monstertje wordt genomen elke keer als er een bepaald volume afvalwater is langgekomen.

De genomen monsters werden in een koelbox naar het RIVM vervoerd.

9.5.2 *Isolatie bacteriën*

Watermonsters werden, binnen 24 uur na monsternamen, gefiltreerd door membraanfilters met een poriëgrootte van 0,45µm, in meerdere volumes per monster. De filters werden vervolgens in of op specifieke kweekmedia geplaatst en bebroed. Voor CRE werd van elk gefilterde volume 1 filter geplaatst op ChromIDCARBA agar en 1 filter op ChromIDOX48 agar (beide van de fabrikant Biomerieux). Dit werd 4 tot 5 uur bebroed bij 36±1 °C, gevolgd door 21±3 uur bij 44±0,5 °C.

Voor VRE werden de filters eerst in een ophopingsmedium geplaatst waaraan vancomycine (5µg/ml) was toegevoegd. Na 18-24 uur bebroeden bij 36±1 °C werd van deze kweek 10µl afgeënt op Brilliance VRE agar (van de fabrikant Oxoid), en dit werd nogmaals 24 uur bebroed bij 36±1 °C.

Van influent werd voor elk mediumtype in totaal 44 ml gefiltreerd (1, 3, 10, en 30 ml) en van effluent werd voor elk medium type 600 ml (6×100 ml voor CRE en 1×100 en 2×250 ml voor VRE) gefiltreerd.

Voor de isolatie van *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* werden kleinere volumes gefiltreerd, omdat de concentraties van deze bacteriën lager zijn. Deze filters werden bebroed op respectievelijk Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) agar en ChromID ESBL (Biomerieux) and (Anonymous, 2001), en bebroed bij dezelfde condities als CRE.

Voor kwantificering werden verdachte kolonies geteld op ChromID CARBA en ChromID OXA agar: roze voor *E. coli* en blauw voor *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Serratia* (KESC). Vervolgens werden van representatieve kolonies carbapenemresistentie bevestigd door deze rein te kweken op de platen waarop ze geïsoleerd waren. Verdachte VRE (blauwe kolonies) op Brilliance VRE agar werden ook reingestroken op VRE Brilliance ter bevestiging. De bevestigd resistente isolaten werden verder opgekweekt op algemeen kweekmedium voor verdere analyses.

9.5.3 *Analyses CRE*

In totaal werden er 1.162 CRE-isolaten verkregen. Als CRE worden hier isolaten beschouwd die op een ChromIDCARBA of een ChromIDOX48plaat groeien. Voor de CR *E. coli* (n=733) werden geen aanvullende tests gedaan om de soort te bevestigen. Dit omdat de kleur van *E. coli* op de CRE-platen gebaseerd is op de aanwezigheid van het enzym beta-glucuronidase, wat specifiek is voor *E. coli*. Voor een deel (40%) van de isolaten is de identiteit wel bevestigd omdat door middel van sequentietypenanalyse (MLST) (van 287 op MLST type onderzochte kolonies werd 286 een *E. coli* MLST type toegekend). Voor CR 'KESC' isolaten (n=429) werd eerst vastgesteld of het mogelijk *Klebsiella* spp. of *Enterobacter* spp. waren, door te testen op beweeglijkheid en

ornithine decarboxylase activiteit (ODC). Van de KESC is alleen *Klebsiella* spp onbeweeglijk, en daarnaast is *Klebsiella* meestal ODC-negatief. Omdat bij 44 °C geïsoleerd is gaat het dan met zeer grote waarschijnlijkheid om *K. pneumoniae*. Dit is voor 100% van 104 middels MLST geteste isolaten bevestigd. Beweeglijke en ODC-positieve isolaten waren verdachte *Enterobacter* spp., deze werden verder getypeerd op basis van biochemische eigenschappen door middel API20E (Biomerieux). Dit werd ook gedaan voor isolaten met een onduidelijke uitslag (d.w.z onbeweeglijk en ODC-positief, of beweeglijk en ODC-negatief).

Van alle CRE isolaten werd de aanwezigheid van drie typen carbapenemasegenen: behorende tot de OXA-48-, NDM- en KPC-familie, aangetoond door middel van PCR. Van alle isolaten die positief waren voor deze genen is vervolgens de sequentie van deze genen bepaald door middel van sequenzen. De verkregen sequenties zijn geanalyseerd in het computerprogramma Bionumerics, en hierin ook vergeleken met de sequenties van gepubliceerde carbapenemase genen, om de precieze identiteit vast te stellen.

De informatie die op deze manier werd verkregen is gebruikt om de concentraties CRE per genotype vast te stellen.

9.5.4 *Analyses VRE*

Van alle verdachte VRE-isolaten (n=344) werd de aanwezigheid van vancomycineresistentiegenen (vanA, vanB, vanC1, vanC2/vanC3) en de identiteit van de enterococcus-soort (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*) door middel van een drietal multiplex PCRs vastgesteld. Voor een aantal isolaten kon op deze manier de soort niet vastgesteld worden, en is aan de hand van de ribosomale dna-sequentie gevonden dat het in al deze gevallen waarschijnlijk om *E. canintestini* gaat. Deze isolaten vertoonden namelijk meer homologie (98%) met het prototype van deze enterococcus-soort, dan met alle andere bekende enterococcussoorten.

De mate van vancomycineresistentie van de isolaten werd bepaald door middel van Etest (Biomerieux). VRE-isolaten werden gedefinieerd als isolaten met een minimale remmende dosis (minimal inhibitory dose, MIC) van 32 µg/ml, volgens richtlijnen van het *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Isolaten met een lagere MIC (n=8) zijn niet meegenomen in prevalentie-analyses (336 isolaten zijn wel geïncubeerd).

9.5.5 *Analyses resistentiegenen*

Watermonsters werden, binnen 24 uur na monsternamen, gefiltreerd door membraanfilters (mixed ester cellulose filters, HAWG047S6), met een poriëgrootte van 0,45 µm. Voor effluent werd 150 ml of 200 ml gefiltreerd, en voor influent 30. Dna werd geëxtraheerd door middel van het PowerWater kit (Mobio). Er werd voor het begin van de extractie een bekende hoeveelheid dna coderend voor het blue fluorescence protein (bfp) toegevoegd, om de efficiëntie van de dna-extractie te kunnen onderzoeken. De dna werd voor qPCR 100x verdund. qPCR werd bij WETSUS uitgevoerd. qPCR vond plaats op de genen *ermB*, CTX-M1 group, *sul1* (sulfonamid resistentie), en 16S als bacterieel marker gen. De gebruikte primers en reacties zijn samengevat in Tabel 9-11 en Tabel 9-12. De reacties werden uitgevoerd met Iqsybrgreen mastermix (Biorad) onder toevoeging van BSA tot een concentratie van 0,4 µg/ul,

en met gebruik van 2 ul dna-template. Als calibratiecurves werden synthetische dna-standaarden gebruikt.

Tabel 9-11. Primer sequenties van de gebruikte qPCR reacties.

Gen	Referentie	Naam	Sequentie
16S	Fierer et al., 2005	338F 518R	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG
ermB	Knapp et al., 2010	ErmB-F ErmB-R	AAAACTTACCCGCCATACCA TTTGGCGTGTTTCATTGCTT
CTX-M1	Marti et al., 2013	q_CTXM-FW q_CTXM-RV	CTATGGCACCACCAACGATA ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT
sul1	Pei et al., 2006	Sul1-F Sul1-R	CGCACCGGAAACATCGCTGC TGAAGTTCCGCCGCAAGGCT

Tabel 9-12. qPCR reactie parameter.

Gen	Primer conc in reaction	Reaction volume	Amplification Protocol
16S	300 nM	20µl Reaction volume	95°C 5 min 40x(95°C 15s
ermB	400 nM		60°C 30s) + melting curve
ctxM1	400 nM		65°C-95°C 0,5/5s
sul1	300 nM		95°C 5 min 40x(95°C 15s

9.5.6

Analyses antibioticaresiduen

In het kader van dit onderzoek zijn alle aangeleverde rioolwatermonsters geanalyseerd op de aanwezigheid van tetracyclines, sulfonamiden, macroliden, quinolonen, aminoglycosiden en β -lactams. Deze analyses vonden plaats bij het RIKIILT.

Analysemethode tetracyclines, sulfonamiden, macroliden en quinolonen

Reagentia

Acetonitril (ACN), methanol (MeOH), ammoniumacetaat, citroenzuur monohydraat, dinatriumethyleendiaminetetraacetaat (Na₂-EDTA), dinatriumwaterstoffsfaatdihydraat, mierenzuur en ammonia 25% zijn verkregen van Merck (Darmstadt, Duitsland). Ammoniumformiaat en lood(II)acetaat is verkregen van Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Milli-Q water werd bereid met een Milli-Q systeem bij een weerstand van ten minste 18,2 M Ω cm⁻¹ (Millipore, Billerica, MA, USA). Strata-X Polymeric Reversed Phase cartridges (6cc, 200 mg) werden verkregen van Phenomenex (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Monstervoorbehandeling

Van elk monster rioolwater worden twee porties van 10 ml in aparte 50 mL buizen afgewogen, waarna interne standaarden worden toegevoegd. Aan één van deze porties worden antibiotica toegevoegd op een niveau van 25 ng/L voor de sulfonamiden en 100 ng/L voor de tetracyclines, quinolonen en macroliden. Vier mL EDTA-McIlvain buffer (0,1 M; pH 4,0) wordt toegevoegd, waarna de monsters 5 min head-over-head wordt geëxtraheerd. Na centrifugeren (10 min, 3500 g) wordt het volledige extract op een geconditioneerde Strata-X cartridge

gebracht, waarna de cartridge wordt gewassen met 5 mL water en vervolgens gedroogd. De tetracyclines, sulfonamiden, macroliden en quinolonen worden met behulp van 5 mL MeOH van de cartridge geëluëerd. Het eluaat wordt bij 40 °C onder N₂ droog gedampt en weer opgenomen in 100 µL MeOH, waarna 400 µL water wordt toegevoegd.

LC-MS/MS

Het LC-systeem bestaat uit een Waters (Milford, MA, USA) model Acquity met een Phenomenex Kinetic C18 analytische kolom van 2,1×100 mm, 1,7 µm in een kolomoven van 40 °C. Het gradiënt (mobiele fase A, ammoniumformiaat (1 M)/mierenzuur/water (2/0,16/1000; v/v/v); mobiele fase B, ammoniumformiaat (1 M)/mierenzuur/MeOH (2/0,16/1000; v/v/v)) is: 0-0,5 min, 1% B; 0,5-2,5 min, lineaire toename naar 25% B; 2,5-5,4 min, lineaire toename naar 70% B; 5,4-5,5 min, lineaire toename naar 100% B, waar het systeem gedurende 1,0 min op blijft staan. Het vloeistofdebiet is 0,3 mL/min en het injectievolume 5 µL. De detectie wordt uitgevoerd met een AB Sciex (Ramingham, MA, USA) Q-Trap 6500 massa spectrometer in positieve electrospray ionisatie (ESI) mode.

De parameters voor de QTrap 6500 zijn: capillary voltage, -4,0 kV; declustering potential, 10 V; source temperature, 450 °C, GAS 1 and 2, 50 (arbitraire eenheden). De antibiotica fragmenteren naar structuur-gerelateerde fragmenten.

Analysemethode aminoglycosiden

Reagentia

Azijnzuur (HAc), methanol (MeOH), kaliumdihydrogeenfosfaat (KH₂PO₄), dinatriumethyleendiaminetetraacetaat (Na₂-EDTA), trichloorazijnzuur (TCA) en mierenzuur zijn verkregen van Merck (Darmstadt, Duitsland). Heptafluorboterzuur (HFBA) is verkregen van Fluka. Milli-Q water werd bereid met een Milli-Q systeem bij een weerstand van ten minste 18,2 MΩ cm⁻¹ (Millipore, Billerica, MA, USA). CBX cartridges werden verkregen van Baker.

Monstervoorbehandeling

Van elk monster rioolwater worden twee porties van 10 ml in aparte 50 mL buizen afgewogen, waarna interne standaarden worden toegevoegd. Aan één van deze porties worden aminoglycosiden toegevoegd op een niveau van 50 µg/L. Twintig mL extractievloeistof (10 mM KH₂PO₄ met 0,4 mM EDTA en 2 % TCA) wordt toegevoegd, waarna de monsters worden gemengd met behulp van een vortex en daarna 10 min head-over-head wordt geëxtraheerd. Nadat het extract op pH 7,6-7,9 is gebracht wordt het gecentrifugeerd (15 min, 3600 g). Het volledige extract wordt op een geconditioneerde CBX cartridge gebracht, waarna de cartridge wordt gewassen met 4 mL water en vervolgens gedroogd. De aminoglycosiden worden met behulp van 3 mL HAc (10% in MeOH) van de cartridge geëluëerd. Het eluaat wordt bij 60 °C onder N₂ droog gedampt en weer opgenomen in 400 µL HFBA (0,065%).

LC-MS/MS

Het LC-systeem bestaat uit een Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) model 1100 met een Waters Symmetry C18 analytische kolom van 3×150 mm, 5 µm in een kolomoven van 30 °C. Het gradiënt

(mobiele fase A, 0,065% HFBA in water; mobiele fase B, 0,065% HFBA in MeOH) is: 0-0,5 min, 0% B; 0,5-5 min, lineaire toename naar 45% B; 5-8 min, lineaire toename naar 60% B; 8-10 min, lineaire toename naar 100% B. Het vloeistofdebiet is 0,4 mL/min en het injectievolume 40 µL. De detectie wordt uitgevoerd met een Waters (Milford, MA, USA) Quattro Ultima massa spectrometer in positieve electrospray ionisatie (ESI) mode.

De parameters zijn: capillary voltage, 2,7 kV; desolvation temperature, 500 °C; source temperature, 120 °C, cone gas, 150 L/uur, desolvation gas 550 L/uur. De aminoglycosiden fragmenteren naar structuur-gerelateerde fragmenten.

Analysemethode β -lactams

Reagentia

ULC/MS kwaliteit water en acetonitril (ACN), en HPLC kwaliteit methanol (MeOH) zijn verkregen van Biosolve (Valkenswaard, Nederland). Azijnzuur, mierenzuur, 25% ammonia, 32% ammonia (GPR Rectapur), natriumchloride en n-hexaan zijn verkregen van VWR International (Darmstadt, Duitsland). Piperidine (99%) en dinatriumtetraboraat zijn verkregen van Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Milli-Q water werd bereid met een Milli-Q systeem bij een weerstand van ten minste 18,2 M Ω cm⁻¹ (Millipore, Billerica, MA, USA).

Monstervoorbehandeling

Van elk monster rioolwater worden twee porties van 10 ml in aparte 50 mL buizen afgewogen, waarna interne standaarden worden toegevoegd. Aan één van deze porties worden β -lactams toegevoegd op een niveau van 50 µg/L voor de penicillines en 500 µg/L voor de cephalosporines en carnapenems. Tien mL boraatbuffer (pH 9) en 500 µL piperidine wordt toegevoegd. De monsters worden geschud en gedurende 60 min geïncubeerd in een waterbad van 60 °C. Na afkoelen van de extracten gedurende 10 min bij kamertemperatuur wordt 10 mL hexaan toegevoegd en geschud (5 min). Na centrifugeren (10 min, 3500 g) wordt de waterige fase geïsoleerd en op pH 7,2 gebracht en opnieuw gecentrifugeerd (15 min, 3500 g). Het extract wordt op een geconditioneerde Phenomenex (Torrance, CA, USA) Strata-X 200 mg / 6 mL reversed phase solid phase extractie (SPE) cartridge gebracht. De cartridge wordt gewassen met 5 mL 10% MeOH en geëluëerd met 5 mL ACN/MeOH (1:1, v/v). Het oplosmiddel wordt afgedampt (45 °C, N₂) en het residu wordt opgelost in 500 µL 1% piperidine in water.

LC-MS/MS

Het LC-systeem bestaat uit een Waters (Milford, MA, USA) model Acquity met een Waters Acquity UPLC CSH C18 analytische kolom van 2,1×100 mm, 1,7 µm in een kolomoven van 50 °C. Het gradiënt (mobiele fase A, 0,0032% ammonia in water; mobiele fase B, 0,0032% ammonia in water/acetonitril (1:9 v/v)) is: 0-1,0 min, 0% B, 1,0-9,0 min, lineaire toename naar 40% B, 9,0-10,0 min, lineaire toename naar 100% B waar het systeem gedurende 0,5 min op blijft staan. Het vloeistofdebiet is 0,4 mL min⁻¹ en het injectievolume 10 µL. De detectie wordt uitgevoerd met een Waters model Xevo TQS of een AB Sciex (Ramingham, MA, USA) Q-Trap 6500 massa spectrometer in positieve electrospray ionisatie (ESI) mode.

De parameters voor de Xevo TQS zijn: capillary voltage, 2,0 kV; cone voltage, 25 V; source offset, 20 V; source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 550 °C; cone gas flow, 150 L uur⁻¹; en desolvation gas, 600 L uur⁻¹.

De parameters voor de QTrap 6500 zijn: capillary voltage, 2,0 kV; cone voltage, 25 V; source offset, 20 V; source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 550 °C; cone gas flow, 150 L uur⁻¹; en desolvation gas, 600 L uur⁻¹. De β-lactam derivaten fragmenteren naar structuur-gerelateerde fragmenten.

9.6 Bijlage F – Uitkomsten ESBL-producerende *E. coli*, CRE en VRE in afvalwater in meer detail

Voorkomen van CRE en typen gevonden CRE

Carbapenemresistente Enterobacteriaceae (CRE) werden in afvalwater afkomstig van 90 van de 100 RWZI's (90%) aangetroffen, in 88% van de influenten en 53% van de effluenten (in 2 RWZI's alleen in effluent). In de 88 CRE-positieve influenten was gemiddeld 1 op de 5×10^4 *E. coli* carbapenemresistent. In dezelfde 88 RWZI's was gemiddeld 1 op de 107 *E. coli* ESBL-producerend. Er werden verschillende typen CRE aangetroffen wat betreft het type resistentie en de bacteriesoort. De meest voorkomende CRE waren *E. coli* die carbapenemases produceren die tot de OXA-48-groep behoren (verder 'OXA-48*' genoemd): deze werden in 88% van de RWZI's aangetroffen. Andere gedetecteerde CRE waren: OXA-48*-producerende *K. pneumoniae* (33% van de RWZI's), NDM-producerende *E. coli* (18%), KPC-producerende *K. pneumoniae* (8%), NDM-producerende *pneumoniae* (6%), KPC-producerende *E. coli* (3%), OXA-48-producerende *Enterobacter* spp. (2%), KPC-producerende *Enterobacter* spp. (1%). Naast deze typen carbapenemaseproducerende Enterobacteriaceae (CPE) werden ook CRE aangetroffen waar deze genen niet werden gedetecteerd; dit werd vooral waargenomen bij *K. pneumoniae* en *Enterobacter* spp (Figuur 3-2).

Gedetailleerdere typering van de carbapenemase-genen liet een verdere onderverdeling zien van CPE-typen. Er werden drie verschillende OXA-48*-genen gevonden: OXA-48, OXA-181, en OXA-162, drie verschillende NDM-genen: NDM-1, NDM-5 en NDM-7, en 1 type KPC: KPC-2. In totaal zijn er 13 verschillende CPE aangetroffen gebaseerd op het carbapenemase gen en de soort *Enterobacteriaceae* (Tabel 3-1). Van de KPC- en NDM-positieve CPE was NDM-5 *E. coli* de meest voorkomende: deze werd aangetroffen in 15 van de RWZI's. KPC-2- en NDM-1-CPE werden respectievelijk in 9 en 8 van de RWZI's aangetroffen, geassocieerd met *E. coli*, *K. pneumoniae* of *E. cloacae*, en soms in meerdere soorten bacteriesoorten per RWZI. In totaal waren 40% van de CPE-varianten ook drager van ESBL-genen.

Prevalentie en soorten VRE

Vancomycineresistente enterokokken (VRE) werden in 59 van de 100 RWZI's (59%) aangetroffen, in 55% van de influenten en 42% van de effluenten (in 4 RWZI's alleen in effluent). Van VRE zijn geen concentraties bepaald. De meest voorkomende VRE soorten waren *E. faecium* (VRE_{fm}; 36 RWZI's) en *E. casseliflavus* (VRE_{cf}; 29 RWZI's), gevolgd door *E. gallinarum* (VRE_{gm}; 4 RWZI's), en *E. canintestini* (VRE_{ct}; 6 RWZI 's). De meeste VRE-varianten waren geassocieerd met

het vanA-gen (Tabel 9-13), het vanB-gen werd alleen geassocieerd met VREfm aangetroffen, in 7 van de RWZI's. Alle *E. casseliflavus*- en *E. gallinarum*-varianten hadden naast de intrinsieke VRE-genen C1 (*E. gallinarum*) en C2/C3 (*E. casseliflavus*) die een intermediate niveau van resistentie geven, ook een VanA-gen en het daarmee geassocieerde hoge resistentieniveau.

In 13 RWZI's is meer dan één variant aangetroffen. In deze gevallen ging het meestal (9 keer) om een *E. faecium* en 1 of 2 non-*E. faecium* VRE-varianten; 1 keer werden zowel vanA- als vanB-dragende *E. faecium* tegelijk aangetroffen.

Tabel 9-13. VRE-varianten en prevalentie.

VRE-variant	Enterococcus species	Van-R gen	Aantal RWZI's
VREfm_vanA	<i>E. faecium</i>	vanA	30 ^a
VREfm_vanB	<i>E. faecium</i>	vanB	7 ^a
VREcf_vanA	<i>E. casseliflavus</i>	vanA, vanC2/C3 ^b	29
VREgm_vanA	<i>E. gallinarum</i>	vanA, vanC1,	4
VREct_vanA	<i>E. canintestini</i>	vanA ^c	6

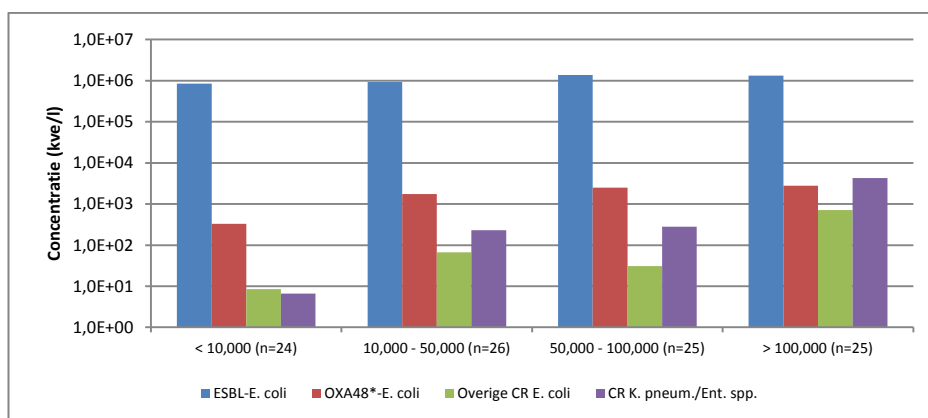
^a In 1 van de RWZI's werden zowel VREfm-vanA als VREfm-vanB aangetroffen.

^b De gebruikte PCR maakt geen onderscheid tussen vanC2 en vanC3.

^c In het isolaat van één van de RWZI's kon geen vanA aangetoond worden; dit isolaat had net als de vanA-positieve isolaten een MIC van > 256µg/ml).

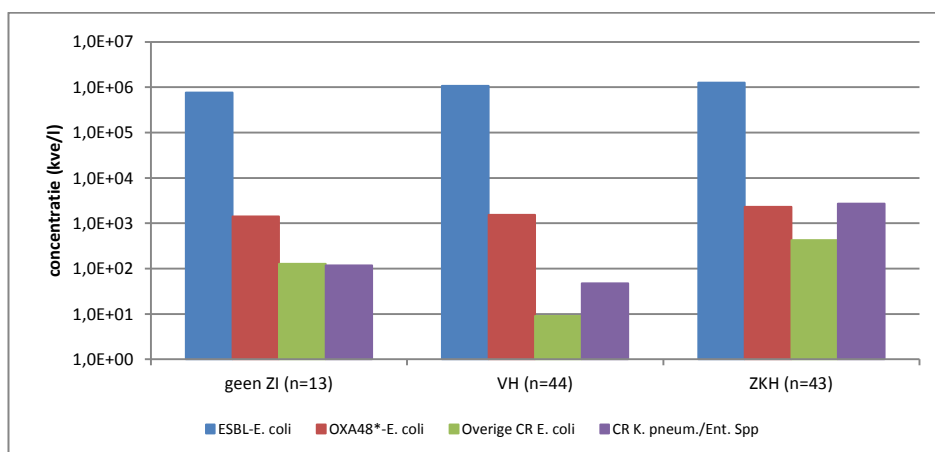
Risicofactoren voor het voorkomen van CRE in afvalwater

De relatie van de concentraties van CRE in influent met de aanwezigheid van ziekenhuizen en met de grootte van de RWZI werd onderzocht via lineaire regressie (na log transformatie van de concentraties en de capaciteit van de RWZI, uitgedrukt in inwonerequivalenten). De concentraties van de 10% van de RWZI in welke geen CRE in influent werden gevonden werden op de wortel van het detectielimiet gezet. De CRE-concentratie was positief gecorreleerd met de grootte van de RWZI (Figuur 9-2). De gemiddelde CRE-concentratie in de 25 grootste RWZI's ($7,8 \times 10^3$ kve/l) was 22x hoger dan de concentratie in de 24 kleinste RWZI's ($3,5 \times 10^2$ kve/l). De hogere concentratie bij grote RWZI's betekent dat op het rioolstelsel relatief meer CRE-bronnen lozen dan bij kleine RWZI's (d.w.z. meer bronnen per inwoner of per volume geproduceerd afvalwater), of dat er (meer) bronnen zijn met hoge concentraties CRE. Dit is niet of nauwelijks het geval voor gewone *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* (Figuur 9-2): de bronnen van deze bacteriën zijn gelijk verdeeld per inwoner-equivalent en afvalwater volume. Het effect van RWZI-grootte was relatief gering voor de OXA-48*-producerende *E. coli* vergeleken met de andere typen CRE (Figuur 9-2).



Figuur 9-2: Concentraties CRE naar RWZI-grootte. In Figuur 9-2 zijn de CRE onderverdeeld in drie groepen: de OXA48*-E. coli, de overige CR E. coli en de CR K. pneumoniae en Enterobacter spp, en vergeleken met E. coli en ESBL-E. coli.

Een vergelijkbare analyse is gemaakt waarbij rwzi's zijn ingedeeld naar het gegeven of er ziekenhuizen en/of poliklinieken en verzorgingshuizen op de rioolstelsels zijn aangesloten (Figuur 9-4). Voor E. coli en ESBL-E. coli is er geen of nauwelijks verschil in gemiddelde concentratie tussen rwzi's met of zonder aangesloten zorginstellingen (figuur 9-4). Voor CRE lijkt het aangesloten zijn van verzorgingstehuizen geen positief effect op de concentratie te hebben, maar de toevoeging van poliklinieken en/of ziekenhuizen wel. Het verschil tussen de gemiddelde concentratie's in RWZI's met zorginstellingen inclusief poliklinieken en/of ziekenhuizen en RWZI's zonder zorginstellingen was respectievelijk een factor 1,1 (E. coli), 1,7 (ESBL-E. coli), 3,3 (CRE), 1,6 (OXA-48* E. coli), 3,4 (overige CR E. coli) en 23 (CR K. pneumoniae en Enterobacter spp) hoger. Echter, de grootte van RWZI's en de aanwezigheid van zorginstellingen zijn aan elkaar gerelateerd.



Figuur 9-3. Concentraties CRE naar typen afvalwaterbronnen. In Figuur 9-3 zijn de CRE onderverdeeld in drie groepen: de OXA48*-E. coli, de overige CR E. coli, en de CR K. pneumoniae en Enterobacter spp, en vergeleken met E. coli en ESBL-E. coli. 'Geen ZI' betekent: geen zorginstelling aangesloten, 'VH' betekent: alleen verpleeghuizen aanwezig, 'ZKH' betekent behalve verpleeghuizen ook poliklinieken en/of ziekenhuizen aanwezig.

Risicofactoren voor het voorkomen van VRE in afvalwater

De totale VRE-prevalentie was 2 tot 2,5 keer zo hoog in de grootste RWZI's (82 en 100%) als in de kleinste RWZI's (42%). Er leek echter geen duidelijk verschil in prevalentie tussen RWZI in de categorieën < 10.000 IE tot 100.000 IE (Tabel 9-14). Opsplitsen van de VRE-types in *E. faecium*- en non-*E. faecium* VRE toonde aan dat er wel een correlatie was tussen RWZI-grootte en de prevalentie van VRE_{fm}, maar niet voor de overige VRE-soorten.

RWZI's die afvalwater ontvangen van zorginstellingen hadden een hogere prevalentie VRE (Tabel 9-15). Dit leek voor zowel VRE_{fm} als voor overige VRE het geval. Er was geen noemenswaardig verschil tussen RWZI's met enkel verzorgingshuizen aangesloten en RWZI's met naast verzorgingshuizen ook poliklinieken en/of ziekenhuizen.

Tabel 9-14. Prevalentie VRE naar grootte RWZI's.

RWZI-grootte (IE)	Aantal	Percentage VRE-positieve RWZI's		
		E. faecium	Non-E. faecium	Totaal VRE
< 10.000	24	8,3%	33%	42%
10.000 – 50.000	26	35%	35%	62%
50.000 – 100.000	25	32%	24%	48%
100.000 – 500.000	22	68%	33%	82%
>500.000	3	67%	67%	100%
Totaal	100	36%	33%	59%

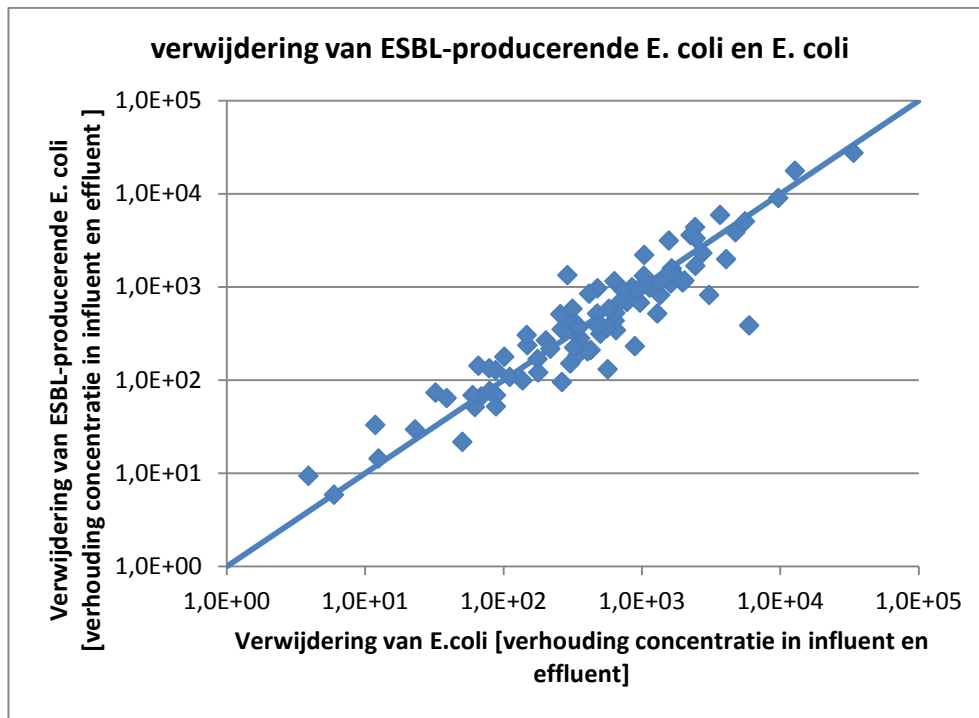
Tabel 9-15. Prevalentie VRE naar type afvalwater.

RWZI-grootte (IE)	Aantal	Percentage VRE-positieve RWZI's		
		E. faecium	Non-E. faecium	Totaal VRE
Geen ZI	12	8,3%	17%	25%
VH	44	36%	41%	70%
ZKH ^a	44	43%	30%	57%
Totaal	100	36%	33%	59%

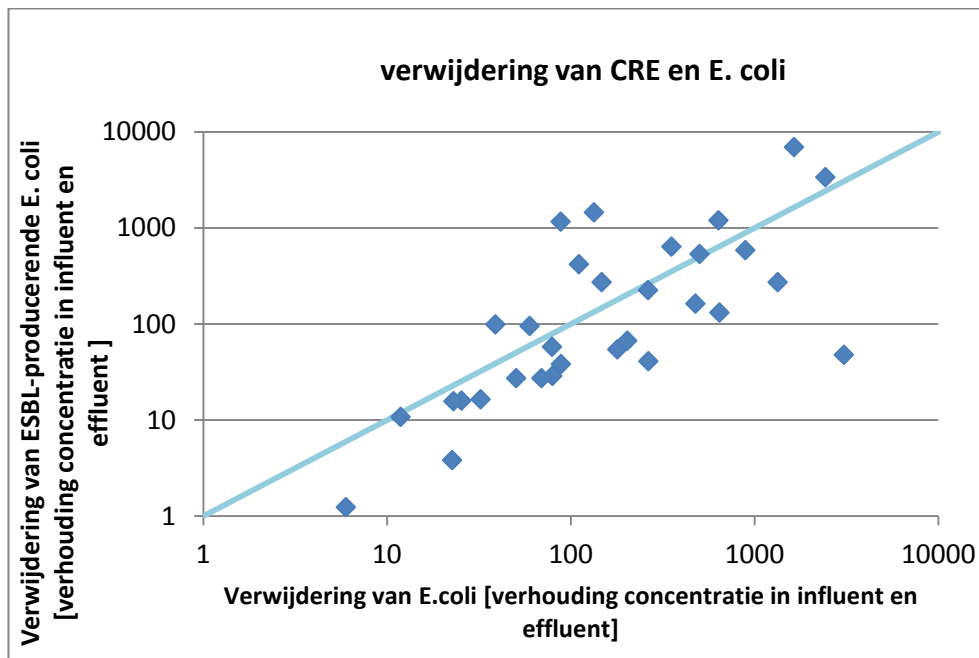
^a Behalve verpleeghuizen ook poliklinieken en/of ziekenhuizen aanwezig.

Verwijdering van resistente bacteriën en niet-resistente bacteriën

Gemiddeld produceerden ongeveer 1 op de 100 *E. coli*'s ESBL (gemiddeld 0,87% en 0,84% voor respectievelijk influent en effluent). Om te onderzoeken of in RWZI's ondanks de absolute afname van ESBL-producerende *E. coli* een relatieve toename in het percentage van ESBL-producerende *E. coli* plaatsvindt, werd de verwijdering van *E. coli* en ESBL-producerende *E. coli* per RWZI vergeleken. Deze blijkt voor deze twee typen *E. coli* gelijk te zijn (Figuur 9-4). Ook de verwijdering van CRE is nagenoeg gelijk aan die van *E. coli* (Figuur 9-5), weliswaar is de gemiddelde verwijdering van CRE iets lager dan die van ESBL (gemiddeld over alle RWZI in welk CRE gevonden werden nemen de concentraties CRE met 2,2 log af, en die van ESBL EC met 2,3).



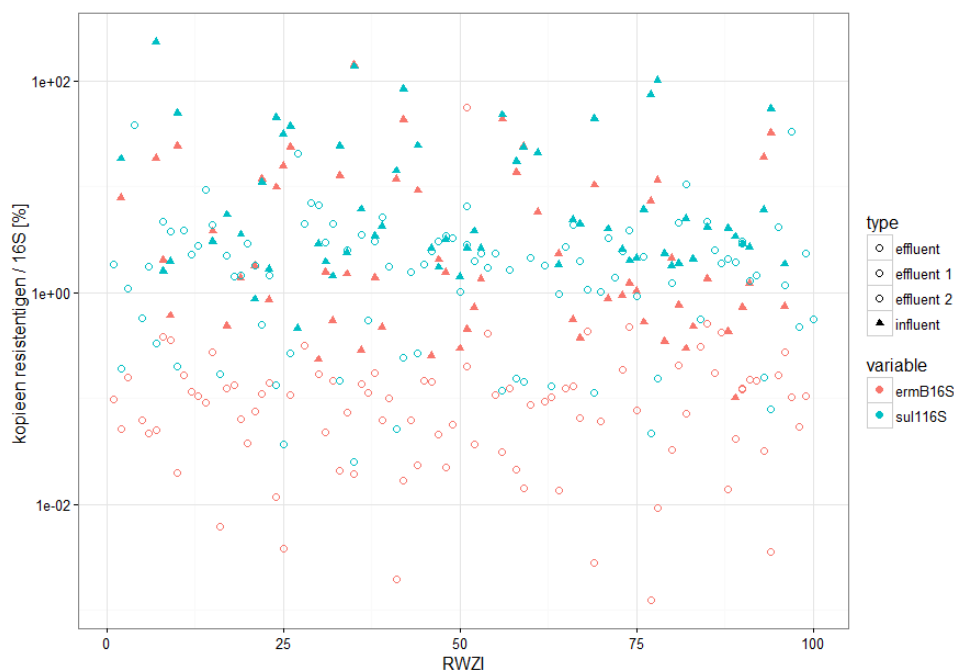
Figuur 9-4. Verwijdering van ESBL-producerende E. coli en van totale E. coli in RWZI's (de lijn geeft evenredige verwijdering aan).



Figuur 9-5. Verwijdering van CRE en van totale E. coli in RWZI's (de lijn geeft evenredige verwijdering aan).

Uitkomsten resistentiegenen in afvalwater

De hoeveelheid resistentiegenen per bacterieel DNA was voor *sul1* in effluent en influent gelijk, voor *ermB* nam de hoeveelheid resistentiegenen per bacterieel DNA af (een teken dat het percentage bacteriën die drager van *ermB* zijn tijdens de afvalwaterbehandeling afneemt) (Figuur 9-6).



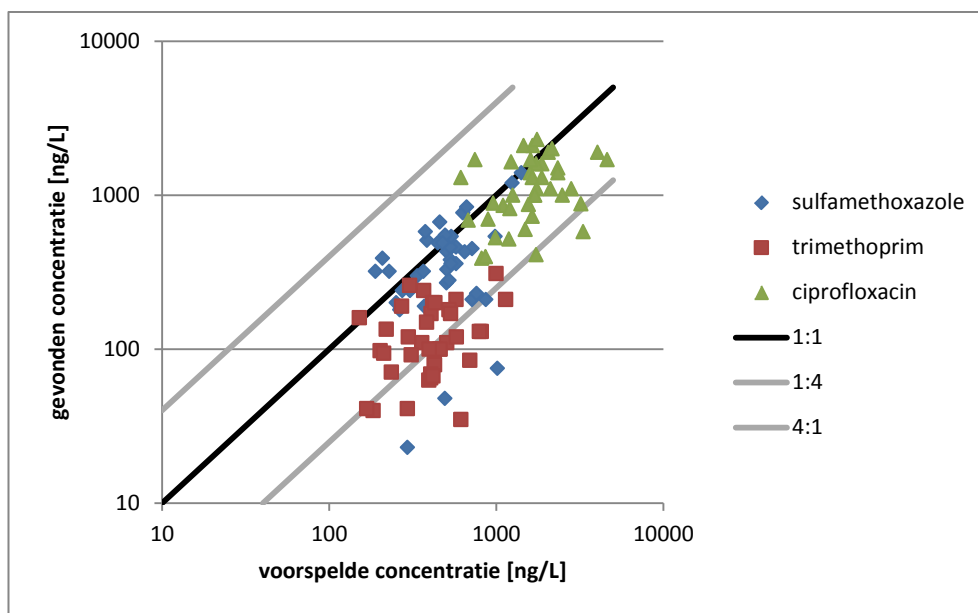
Figuur 9-6. Resistentiegenen in afvalwater – genkopieën per bacterieel DNA.

9.7 Bijlage G – Berekening van de voorspelde concentraties van antibiotica residuen in influent

Voor de berekening van de voorspelde concentraties van antibiotica in influent werden gegevens over het gebruik van antibiotica, gegevens over de uitscheiding van antibiotica en gegevens over de volumina water in de RWZI's gebruikt.

Het gebruik van antibiotica werd verkregen via de GIPdatabank van het Genees- en hulpmiddelen Informatie Project (GIP) (<https://www.gipdatabank.nl/databank.asp>). Deze bevat per antibioticum de defined daily dosages (DDD) per jaar voor geheel Nederland. Gebruik van antibiotica in ziekenhuizen valt buiten deze databank. De DDD werden met behulp van de WHO ATCC DDD databank (https://www.whocc.no/atc_ddd_index/) omgerekend naar mg antibioticum. Het werd aangenomen dat 1 DDD van de combinatie van sulfamethoxazol en trimethoprim tevens 0,8 DDD van sulfamethoxazol en 0,8 DDD van trimethoprim bevat. De uitscheiding van antibiotica (dus de percentage uitgescheiden antibiotica over toegediende antibiotica) werd uit literatuurgegevens verkregen, zoals gerapporteerd in Lienert et al. (2007), Khan en Ongerth (2004) en Verlicchi et al. (2014). Indien meer dan een waarde voor de uitscheiding beschikbaar was, werd de mediaan van de waarden gebruikt. Voor de berekening van de hoeveelheid antibiotica per RWZI werd de hoeveelheid aangesloten huishoudens (in inwonerequivalenten) met het gebruik van antibiotica

(in g antibioticum per persoon per dag) en de uitscheiding vermenigvuldigd. Voor de berekening van de concentraties van de antibiotica werd de hoeveelheid antibiotica door het volumen behandeld afvalwater op de meetdag gedeeld.



Figuur 9-7. Overeenstemming van voorspelde concentraties van drie antibiotica met de gevonden concentraties in influënten van RWZI. Voor de voorspelling werden de gebruikscijfers in de extramurale bevolking, literatuurgegevens over uitscheiding van de stoffen, en gegevens van de zuiveringsinstallaties gebruikt.

9.8 Bijlage H – Hoeveelheden afvalwater ziekenhuizen en verzorgingshuizen in Nederland

Tabel A1 geeft de input parameters op basis waarvan het waterverbruik in verzorgingstehuizen en ziekenhuizen is geschat. Tabel A2 geeft het waterverbruik voor verzorgingshuizen, ziekenhuizen, huishoudens en bedrijven en overige. Uit deze tabel blijkt dat het waterverbruik van verzorgingstehuizen en ziekenhuizen respectievelijk 0,5 en 0,7% van het totale drinkwaterverbruik in Nederland bedraagt.

Tabel A1. Berekening waterverbruik verzorgingshuizen en ziekenhuizen

Post	Waarde	Eenheid	Bron
Verzorgingshuizen	120	[L/patiënt per dag]	InwoDWI (2011)
Ziekenhuizen	382	[L/bed per dag]	InwoDWI (2011)
Verzorgingshuizen	118,593	[# patiënten] (01/01/2015)	CBS (2016)
Ziekenhuizen	55,680	[# bedden] (01/01/2011)	NK (2016)

Tabel A2. Waterverbruik verzorgingstehuizen, ziekenhuizen, huishoudens en bedrijven en overige

Ontvanger	Volume [m3/jaar]	Volume [m3/dag]	Percentage
Verzorgingshuizen	5.194.000	14.000	0,5%
Ziekenhuizen	7.763.000	21.000	0,7%
Huishoudens en bedrijven	770.043.000	2.110.000	71,8%
Overige (bijvoorbeeld industrie)	289.000.000	792.000	27,0%
Totale drinkwaterproductie:	1.072.000.000	2.937.000	100,0%

Referenties

(Centraal Bureau voor de Statistiek, 2016b)

NK (2016), <http://www.nationaalkompas.nl/zorg/huidig-zorgaanbod/INFODWI, 2011, Waterwerkblad : BEREKENINGSGRONDSLAGEN>

[Gemiddeld waterverbruik per etmaal voor mens, dier en plant, http://www.infodwi.nl/uploadedFiles/Infodwi/05 -](http://www.infodwi.nl/uploadedFiles/Infodwi/05 -)

[Voorwaarden normen en uitwerking/WB%202.1%20B%20okt%202011.pdf](http://www.infodwi.nl/uploadedFiles/Infodwi/05 - Voorwaarden normen en uitwerking/WB%202.1%20B%20okt%202011.pdf)

9.9 Bijlage I – Meetplan en methoden voor ABR in mest

9.9.1 Meetplan

In 2013 en 2014 is mest onderzocht op de aanwezigheid van ESBL-producerende *E. coli* (ESBL-EC) en AmpC-producerende *E. coli* (AmpC-EC). De mest was afkomstig van drie mestdistributeurs en bemonsterd op het moment dat deze vervoerd werd tussen agrarische bedrijven. De eindbestemming van de vervoerde mest was ofwel uitrijden over land, ofwel vernietiging. De drie mestdistributeurs bevonden zich in de provincies Gelderland, Noord-Brabant en Drenthe. In totaal zijn 97 monsters geanalyseerd afkomstig van rundvee (40), varkens (38), kalveren (13), leghennen (3) en vleeskuikens (2).

In 2016 en 2017 zijn er in totaal 25 monsters afkomstig van mestverwerkingsbedrijven onderzocht op de aanwezigheid van ESBL-EC, afkomstig van varkens (10), kalveren (5), kippen waarvan 5 leghennen, 2 vleeskuikens, en 2 moederdieren en kalkoenen (1). De mestmonsters werden genomen tijdens mesttransport naar de mestverwerker.

9.9.2 Drijfmestmonsters en isolatie van bacteriën

Drijfmestmonsters werden 1:1 verdund in gebufferd pepton water (BPW) in een filterzak en vervolgens gehomogeniseerd met behulp van een Pulsifier®. Droge mest werd 1:1 of 1:2 keer verdund in een potje (afhankelijk van hoe droog het was), en gemengd met behulp van een steriele lepel. Vervolgens werd hiervan een 10x verdunning gemaakt in een filterzak in BPW, en werd dit gehomogeniseerd met behulp van een Pulsifier®. Van de gehomogeniseerde mest werd vervolgens een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt in pepton-fysiologisch zout (PFZ). Hiervan werd 100 µl van een 10⁻¹ tot 10⁻⁴ verdunning uitgespateld op 'tryptone bile X-glucuronide' (TBX) agar voor de isolatie van *E. coli*, en 100µl en 1 ml van de 1:1 (drijfmest) of 10⁻¹ (droge mest) verdunning op ChromID® ESBL agar voor de isolatie van ESBL-producerende *E. coli*

en op 'Brilliance *E. coli* Coliform' agar (BECSA) aangevuld met 1µg/ml cefotaxime (CTX) voor de isolatie van AmpC producerende *E. coli* (2013-2014 isolaten). Ten slotte werd 20 g gehomogeniseerde mest (drijfmest) of 10 g pure droge mest opgenomen in BPW aangevuld met 1µg/ml CTX voor ophoping van ESBL-en AmpC producerende *E. coli*. Kweken werden 4 uur bebroed bij 37 °C gevolgd door 18-24 uur bij 44 °C. Daarna werden de verdachte kolonies geteld voor het bepalen van de concentraties.

Als de 'directe' kweken negatief waren (detectiegrens 1,8 kve/g voor drijfmest en 10,5 kve/g voor droge mest) werden de ophopingen afgeënt op BECSA/CTX en ESBL-chromID, en 18-24 uur gekweekt bij 37°C. Indien monsters negatief waren in de directe kweek maar positief in de ophoping wil dat zeggen dat de hoeveelheid bacteriën < 1,8 of 10,5 kve/g was, maar meer dan 0,1 kve/g.

9.10 **Bijlage J – Literatuuronderzoek naar reductie van resistente bacteriën en resistentiegenen met conventionele en innovatieve technieken voor afvalwaterzuivering**

9.10.1 *Methoden literatuuronderzoek*

Er werd literatuuronderzoek uitgevoerd in Scopus (RIVM) op titel, samenvatting en zoekwoorden met de volgende zoekopdracht voor verwijdering van bacteriën door afvalwaterzuivering:

TITLE-ABS-KEY (wastewater AND treatment) AND TITLE-ABS-KEY ("*E. coli*" OR "*Escherichia coli*" OR "fecal coliform*" OR enterobact* OR enterococ*) AND (antibiotic* OR antimicrobi* OR esbl OR vre OR cre))

En met de volgende zoekopdracht voor verwijdering van antibioticaresistentiegenen (ARG's) door afvalwaterzuivering:

TITLE-ABS-KEY (wastewater AND treatment) AND TITLE-ABS-KEY ("resistance gene*") AND (antibioti* OR "antimicrobi*"))

Hieruit werd verder geselecteerd door de titel en samenvatting te scannen op rapportage van getallen over de mate van verwijdering van de gezochte bacteriën en ARG's door afvalwaterzuivering. Hulpmiddel bij deze scan was het roodmerken van zoekwoorden in de samenvattingen van de gevonden artikelen die in een RIS-bestand waren verzameld. De gevonden publicaties werden in een Endnote-bestand bewaard. De gemaakte selecties werden collegiaal getoetst. Alle geselecteerde artikelen zijn als pdf (naam eerste auteur en publicatiejaar) verzameld. Daarna werden deze artikelen doorlopen (meest op tabellen en figuren) om verwijderingsgegevens te verzamelen.

De verwijderingsgegevens werden in één spreadsheet opgeslagen en daarin zo nodig omgerekend naar logschaal (aantal logaritmen verwijdering door afvalwaterzuivering). Het spreadsheet bevatte de volgende kolommen: Artikel, bacterie, ARG, studieschaal (laboratorium, pilot, veld), type zuivering, log verwijdering, verwijzing naar tabel of figuur met de desbetreffende gegevens en opmerkingen. Hierbij is -1 log verwijdering door afvalwaterzuivering de reductie in concentratie met een factor tien, -2 log komt overeen met een factor honderd, enzovoorts. Voorts houdt +1 log 'verwijdering' een toename in na passage van afvalwaterzuivering. Dit doet zich voor bij de ARG's. De verzamelde gegevens, werden herhaalde malen gecontroleerd, met name de verwijderingen van ARG's groter dan nul. Het aantal log

verwijdering door extra zuivering naast conventionele zuivering werd apart verzameld of berekend.

De gegevens werden met behulp van de statistische software R (versie 3.2.2) en Mathematica (versie 11, Wolfram, Illinois) gegroepeerd naar bacterie of ARG versus type afvalwaterzuivering en kengetallen voor de log verwijdering werden berekend (gemiddelde, minimum en maximum).

9.10.2 Resultaten

De log verwijderingen van bacteriën en ARG's door afvalwaterzuivering zijn samengevat in Tabellen 9-16 tot en met 9-19 en in Figuren 9-8 en 9-9.

Meermaals wordt het probleem van overleving en reactivatie of hergroei van de bacteriën na zuivering gesignaleerd. Wist et al. (2002) en Rincon en Pulgarin (2007) en Rizzo (2013) zien na UV-behandeling een terugkeer van de bacteriegemeenschap, Li et al. (2013) (Via Fiorentino et al., 2015) en Rizzo (2013) na chlorering, en Moreira (2016) en Sousa (2016) na ozonering. Bij geavanceerde oxidaties is er geen blijvend desinfecterend effect, gezien de reactieve HO-radicalen met korte halfwaardetijd. Bij UV-behandeling kunnen bacteriën herstellen van dna-schade (photoreactivation) en zich weer vermeerderen na blootstelling aan zichtbaar licht (Oguma et al., 2001 via Rizzo 2013, Hijnen 2006). Bij chlorering wordt de celwand doorlaatbaarder, waardoor de kans op genoverdracht toeneemt (Guo, 2015).

Lijst van begrippen, woorden en afkortingen

Log verwijdering door afvalwaterzuivering	-1 log verwijdering door afvalwaterzuivering is de reductie in concentratie met een factor tien, -2 log komt overeen met een factor honderd, enzovoorts. +1 log 'verwijdering' houdt een toename in na passage van afvalwaterzuivering. Dit doet zich voor bij de ARG's
Lab	Experimenten in het laboratorium
Pilot	Experimenten in proefinstallaties
Veld	Waarnemingen bij rioolwaterzuiveringsinstallaties
EC	<i>E. coli</i>
FC	Thermotolerante bacteriën van de coligroep
FS	Fecale streptokokken
TC	Totale bacteriën van de coligroep
ST	Stafylokokken
ARG	Antibioticaresistentiegen
aaC1	Gen voor resistentie tegen aminoglycosides (gentamycine)
ampC	Gen voor resistentie tegen ampicilline
cpe	Genen voor resistentie tegen carbapenamases
erm	Genen voor resistentie tegen macrolides
intI1	Genen voor intI1 integrons (mobiele DNA)
meta	Genen voor resistentie tegen verschillende antibiotica (1 metagenome studie, Bengtsson-Palme et al. (2016)
OXA	Genen voor resistentie tegen carbapenems

qnr	Genen voor resistentie tegen quinolonen
sul	Genen voor resistentie tegen sulfonamides
tet	Genen voor resistentie tegen tetracyclines
vanA	Gen voor resistentie tegen vancomycine
CONV	Conventionele afvalwaterzuivering (2 stappen)
CONV+MBR	Conventioneel met membraan-bioreactor
CW	Constructed Wetland (kunstmatig moeras)
FILTR	Verschillende soorten (zand)filtratie
GAC	Filtratie met Granulair Actief Kool
MEMBR	Membraan-bioreactor
O3	Ozon
O3COMB	Ozon in combinatie met zandfiltratie en/of actiefkoolfiltratie
OTHER	Overig: meest conventioneel met verschillende, deels experimentele, extra zuiveringstappen
OX	Oxidatie: chemische desinfectie met chloor, chloordioxide, perazijnzuur, waterstofperoxide, Fenton oxidatie, al of niet in combinatie met zonlicht
UV	Ultraviolet bestraling

Tabel 9-16. Log verwijdering van bacteriën door afvalwaterzuivering voor alle bacteriën en per type afvalwaterzuivering.

Alle bacterien Lab

Zuivering	Gemiddeld	Min	Max	# data	# studies
CONV	-3,1	-3,1	-3,1	1	1
FILTR	-3,0	-3,1	-2,8	3	1
O3	-4,3	-8,2	-2,4	19	3
OTHER	-1,6	-6,2	-0,2	30	2
OX	-2,3	-6,0	-0,2	52	5
UV	-3,7	-4,0	-3,0	6	3

Alle bacterien Pilot

Zuivering	Gemiddeld	Min	Max	# data	# studies
CONV	-2,3	-2,5	-2,0	3	1
FILTR	-1,5	-2,8	-0,1	10	3
GAC	-0,9	-1,3	-0,1	6	1
O3	-1,5	-2,2	-0,5	8	2
O3comb	-1,7	-2,4	-1,0	18	1

Alle bacterien Veld

Zuivering	Gemiddeld	Min	Max	# data	# studies
CONV	-1,6	-3,5	0,1	85	14
FILTR	-2,4	-2,7	-2,2	3	1
OTHER	-1,4	-5,4	0,9	14	3
OX	-1,8	-3,6	0,0	8	2

Tabel 9-17. Log verwijdering van ARG's door afvalwaterzuivering voor alle ARG's en per type afvalwaterzuivering.

Alle ARG's Lab

Zuivering	Mean	Gemiddeld	Max	# data	# studies
CONV	-1,4	-4,2	2,3	18	1
FILTR	-1,8	-2,8	-0,6	18	2
MEMBR	0,5	-0,4	1,5	6	1
O3	-5,3	-8,3	-2,0	20	2
OTHER	-3,5	-5,9	-1,1	13	1
UV	-3,9	-5,9	-2,1	4	1

Alle ARG's Pilot

Zuivering	Mean	Gemiddeld	Max	# data	# studies
FILTR	-1,4	-2,2	-0,9	8	1
O3	-0,8	-2,1	-0,1	4	1

Alle ARG's Veld

Zuivering	Mean	Gemiddeld	Max	# data	# studies
CONV	-1,6	-5,8	2,3	282	19
CONV+MBR	-2,2	-2,9	-1,7	5	1
CW	-0,6	-2,1	2,6	42	2
FILTR	-0,9	-1,4	0,2	7	1
MEMBR	2,0	1,1	3,5	11	1
OTHER	-2,0	-2,8	-0,2	5	2
OX	-0,4	-1,0	0,1	20	3
UV	-0,3	-0,9	0,4	39	3

Tabel 9-18. Log verwijdering van bacteriën door afvalwaterzuivering per bacterie en per type afvalwaterzuivering.

Lab

BAC	Zuivering	Gemiddeld	Min	Max	# data	# studies
EC	CONV	-3,1	-3,1	-3,1	1	1
EC	FILTR	-3,0	-3,1	-2,8	3	1
EC	OTHER	-1,3	-3,3	-0,2	28	1
EC	OX	-3,0	-6,0	-1,7	22	5
EC	UV	-3,8	-4,0	-3,0	4	2
FC	O3	-3,9	-8,2	-2,4	12	2
FC	OX	-2,4	-2,9	-2,0	4	1
FC	UV	-3,6	-3,6	-3,6	1	1
FS	O3	-4,8	-5,9	-3,1	6	2
FS	OTHER	-5,3	-6,2	-4,3	2	1
FS	OX	-1,7	-2,6	-0,2	22	2
FS	UV	-3,5	-3,5	-3,5	1	1
TC	O3	-6,2	-6,2	-6,2	1	1
TC	OX	-2,1	-2,7	-1,8	4	1

Pilot

BAC	Zuivering	Gemiddeld	Min	Max	# data	# studies
EC	CONV	-2,5	-2,5	-2,5	1	1
EC	FILTR	-1,4	-2,8	-0,1	4	3
EC	GAC	-0,4	-0,7	-0,1	2	1

EC	O3	-1,2	-1,3	-1,0	2	1
EC	O3comb	-1,2	-1,3	-1,0	6	1
FC	FILTR	-2,6	-2,6	-2,6	1	1
FC	O3	-0,5	-0,5	-0,5	1	1
FS	CONV	-2,0	-2,0	-2,0	1	1
FS	FILTR	-1,3	-2,5	-0,6	3	2
FS	GAC	-1,3	-1,3	-1,3	2	1
FS	O3	-2,0	-2,2	-1,9	3	2
FS	O3comb	-1,6	-1,9	-1,4	6	1
ST	CONV	-2,3	-2,3	-2,3	1	1
ST	FILTR	-1,2	-1,3	-1,1	2	1
ST	GAC	-1,1	-1,2	-1,0	2	1
ST	O3	-1,4	-1,4	-1,4	2	1
ST	O3comb	-2,1	-2,4	-1,8	6	1

Veld

BAC	Zuivering	Gemiddeld	Min	Max	# data	# studies
EC	CONV	-2,0	-2,8	0,0	29	6
EC	FILTR	-2,7	-2,7	-2,7	1	1
EC	OTHER	-5,4	-5,4	-5,4	1	1
EC	OX	-1,5	-3,6	0,0	6	1
FC	CONV	-1,7	-2,6	0,0	28	6
FC	OTHER	-1,7	-3,0	-0,6	6	2
FC	OX	-2,5	-2,5	-2,5	1	1
FS	CONV	-1,5	-3,5	0,1	20	3
FS	FILTR	-2,2	-2,2	-2,2	1	1

Veld

BAC	Zuivering	Gemiddeld	Min	Max	# data	# studies
ST	FILTR	-2,4	-2,4	-2,4	1	1
TC	CONV	-0,6	-2,5	-0,2	8	3
TC	OTHER	-0,4	-2,4	0,9	6	1
TC	OX	-2,5	-2,5	-2,5	1	1

Tabel 9-19. Log verwijdering van ARG's door afvalwaterzuivering per ARG en per type afvalwaterzuivering.

Lab

ARG	Zuivering	Mean	Gemiddeld	Max	# data	# studies
aacC1	CONV	-1,0	-2,3	1,0	3	1
aacC1	FILTR	-0,6	-0,6	-0,6	1	1
aacC1	MEMBR	0,0	0,0	0,0	1	1
ampC	CONV	-1,4	-2,9	1,0	3	1
ampC	FILTR	-2,0	-2,0	-2,0	1	1
ampC	MEMBR	0,4	0,4	0,4	1	1
cpe	O3	-5,0	-6,7	-3,2	5	2
cpe	OTHER	-3,3	-5,5	-1,1	6	1
erm	CONV	-1,4	-3,2	2,0	3	1
erm	FILTR	-2,1	-2,8	-1,0	4	2
erm	MEMBR	0,2	0,2	0,2	1	1
intl1	O3	-5,1	-6,2	-3,5	5	2
qnr	O3	-5,1	-6,9	-2,0	3	2
qnr	UV	-4,2	-5,9	-2,5	2	1

sul	CONV	-1,8	-4,2	2,3	3	1
sul	FILTR	-1,7	-2,7	-0,7	7	2
sul	MEMBR	1,2	1,2	1,2	1	1
sul	O3	-6,5	-8,3	-5,5	3	2
sul	UV	-3,7	-5,2	-2,1	2	1
tet	CONV	-1,9	-3,3	0,5	3	1
tet	FILTR	-2,1	-2,6	-0,8	4	2
tet	MEMBR	-0,4	-0,4	-0,4	1	1
vanA	CONV	-0,7	-2,4	2,3	3	1
vanA	FILTR	-0,8	-0,8	-0,8	1	1
vanA	MEMBR	1,5	1,5	1,5	1	1
vanA	O3	-5,4	-5,5	-5,3	4	1
vanA	OTHER	-3,7	-5,9	-1,2	7	1

Pilot

ARG	Zuivering	Mean	Gemiddeld	Max	# data	# studies
ampC	O3	-0,5	-0,5	-0,5	1	1
cpe	O3	-0,1	-0,1	-0,1	1	1
erm	FILTR	-1,4	-1,6	-1,1	2	1
erm	O3	-2,1	-2,1	-2,1	1	1
sul	FILTR	-1,3	-1,9	-1,0	4	1
tet	FILTR	-1,6	-2,2	-0,9	2	1
vanA	O3	-0,3	-0,3	-0,3	1	1

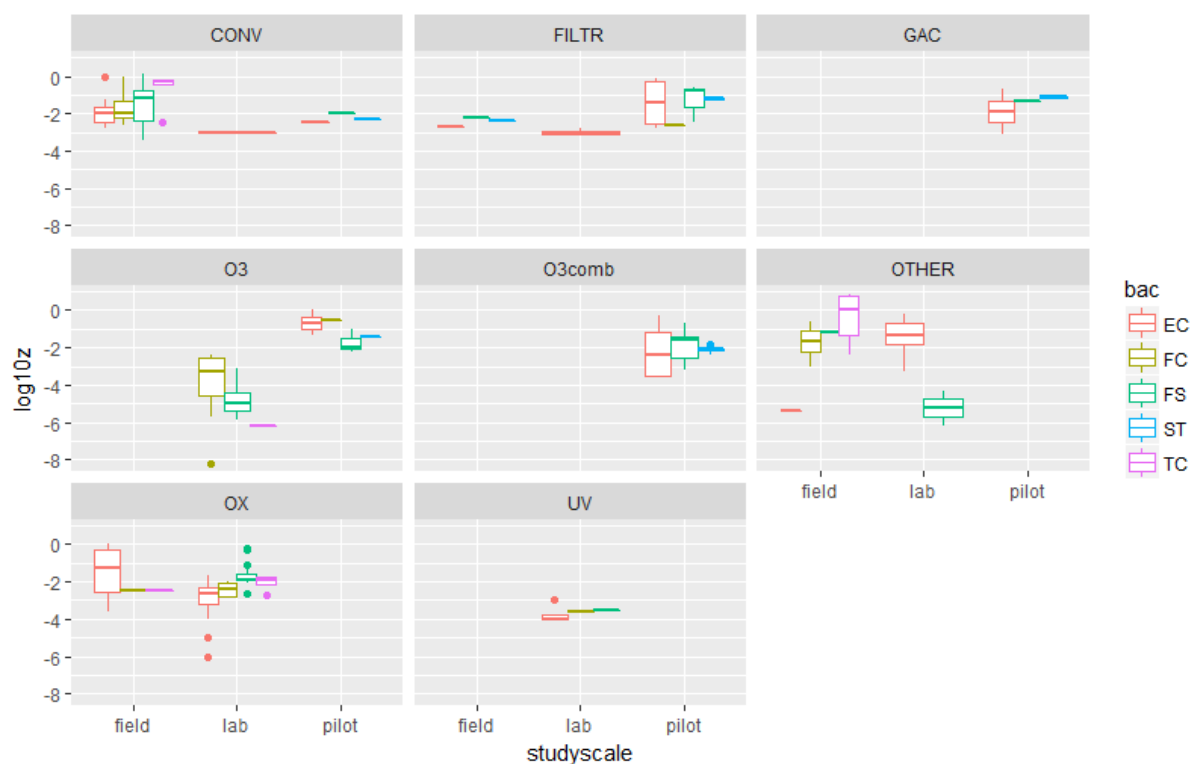
Veld

ARG	Zuivering	Mean	Gemiddeld	Max	# data	# studies
ampC	CW	-0,7	-2,1	1,8	5	1
cpe	CONV	-1,6	-3,1	-0,3	21	6
cpe	MEMBR	1,7	1,1	2,2	2	1
erm	CONV	-1,6	-3,0	-0,3	7	4
erm	CW	-0,6	-1,5	-0,1	5	1
erm	MEMBR	1,9	1,9	1,9	1	1

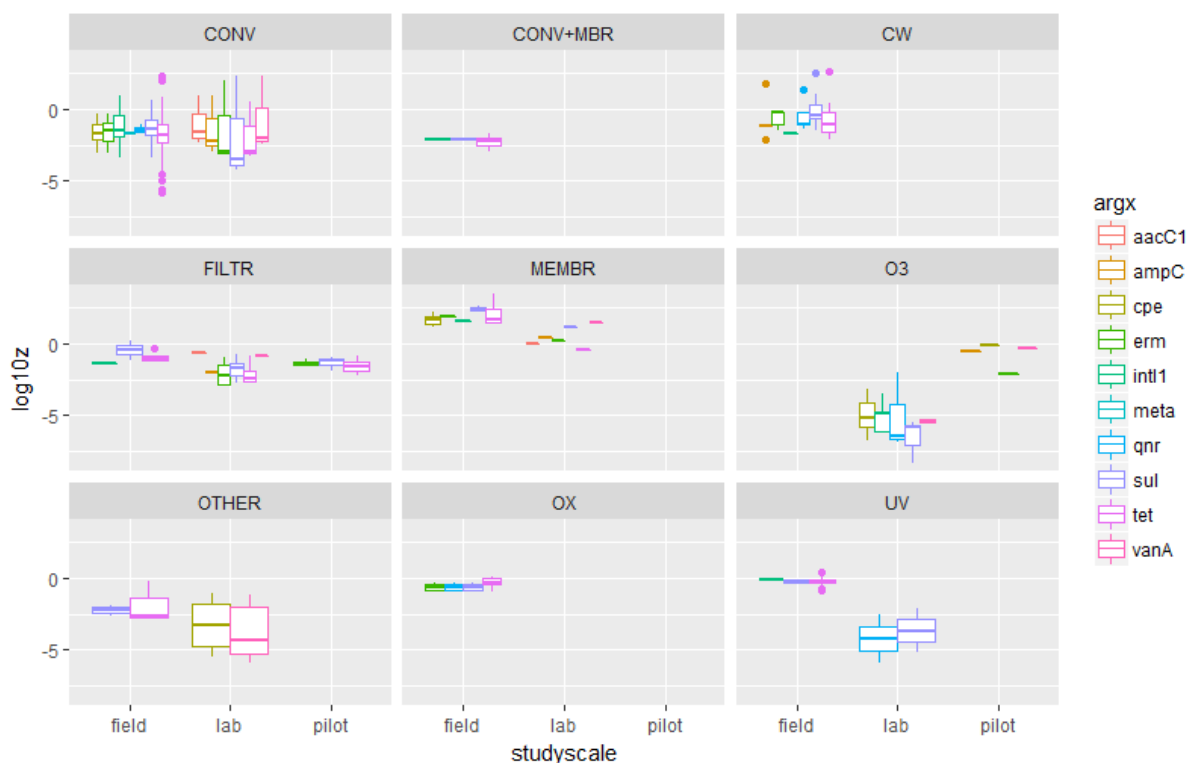
Veld

ARG	Zuivering	Mean	Gemiddeld	Max	# data	# studies
erm	OX	-0,7	-1,0	-0,3	2	1
intl1	CONV	-1,3	-3,4	0,9	28	7
intl1	CONV+MBR	-2,2	-2,2	-2,2	1	1
intl1	CW	-1,7	-1,7	-1,7	1	1
intl1	FILTR	-1,4	-1,4	-1,4	1	1
intl1	MEMBR	1,6	1,6	1,6	1	1
intl1	UV	-0,1	-0,2	-0,1	3	2
meta	CONV	-1,7	-1,7	-1,7	1	1
qnr	CONV	-1,4	-1,7	-1,0	3	2
qnr	CW	-0,5	-1,4	1,4	5	1
qnr	OX	-0,7	-1,0	-0,3	2	1
sul	CONV	-1,3	-3,4	0,6	60	12
sul	CONV+MBR	-2,1	-2,1	-2,1	1	1
sul	CW	0,0	-1,5	2,5	7	2
sul	FILTR	-0,4	-1,1	0,2	2	1
sul	MEMBR	2,5	2,2	2,7	2	1
sul	OTHER	-2,2	-2,6	-1,9	2	2

sul	OX	-0,7	-1,0	-0,3	2	1
sul	UV	-0,3	-0,5	-0,2	6	2
tet	CONV	-1,7	-5,8	2,3	162	16
tet	CONV+MBR	-2,3	-2,9	-1,7	3	1
tet	CW	-0,8	-2,1	2,6	19	2
tet	FILTR	-0,9	-1,3	-0,4	4	1
tet	MEMBR	2,1	1,4	3,5	5	1
tet	OTHER	-1,9	-2,8	-0,2	3	2
tet	OX	-0,3	-1,0	0,1	14	3
tet	UV	-0,3	-0,9	0,4	30	3



Figuur 9-8. Box-whisker plots van de log verwijdering van bacteriën door afvalwaterzuivering per bacterie en per type afvalwaterzuivering.



Figuur 9-9. Box-whisker plots van de log verwijdering van ARG's door afvalwaterzuivering per ARG en per type afvalwaterzuivering.

9.10.3

Bronnen

Zhang et al., 2014, Vukoje et al., 2015, Venieri et al., 2012, Van Aken and Lin, 2011, Templeton et al., 2009, Telles Benatti et al., 2002, Stampi et al., 2002, Soda et al., 2008, Scheurer et al., 2015, Samra and Kuo, 2013, Rizzo et al., 2013c, Rizzo et al., 2013a, Rizzo et al., 2012, Rizzo et al., 2014b, Rizzo et al., 2014a, Reinthaler et al., 2003, Ragazzo et al., 2013, Pereira et al., 2014b, Pereira et al., 2014a, Pablos et al., 2012, Nagulapally et al., 2009, Munakata and Kuo, 2014, Moriarty et al., 2008, Michael et al., 2012, Mendez et al., 2004, Martins da Costa et al., 2006, Luczkiewicz et al., 2011, Lucena et al., 2004, Liu et al., 2012, Li et al., 2015, Kuo and Chen, 2006, Kuo and Chan, 2012, Korzeniewska et al., 2013, Koivunen et al., 2003, Karaolia et al., 2014, Kadir and Nelson, 2014, Jung et al., 2009, Huang et al., 2013, Harris et al., 2014, Haack et al., 2009, Guardabassi et al., 2002, Garcia et al., 2007, Finch and Smith, 1987, Elmi et al., 2014, Drieux-Rouzet and Jarlier, 2014, Da Silva et al., 2006, Childress et al., 2014, Canter, 2008, Bréchet et al., 2014, Biswal et al., 2014, Arturo-Schaan et al., 1995, Yuan et al., 2016a, Yang et al., 2016, Tewfike et al., 2016, Sousa et al., 2017, Simões et al., 2016, Poornima Parvathi et al., 2015, Pillay and Olaniran, 2016, Park et al., 2016, Pak et al., 2016, Osińska et al., 2017, Narciso-da-Rocha and Manaia, 2017, Michael-Kordatou et al., 2017, Macku'ak et al., 2015, Luprano et al., 2016, Lüddeke et al., 2015b, Lopes et al., 2017, Kibbee and Örmeci, 2017, Karaolia et al., 2017, Kalaiselvi et al., 2016, Hu et al., 2016, Hocquet et al., 2016, Heß and Gallert, 2015, Fiorentino et al., 2015, Ferro et al., 2016, Ferro et al., 2014, Espinoza-Quiñones et al., 2016, Dunlop et al., 2015, de Cazes et al., 2016, Czekalski et al., 2016, Conte et al., 2017, Calero-Cáceres and Muniesa,

2016, Blaak et al., 2015, Arora and Kazmi, 2016, Alexander et al., 2016, Adamek et al., 2016

9.11 Bijlage K – Mest: Bestuurlijke en wettelijke kaders

Onderstaande tabel bevat een opsomming van de belangrijkste wetten en de uitvoeringsregelgeving die mestproductie en -toepassingen beïnvloeden.

Tabel 4-20. Overzicht wetgeving en uitvoeringsregelgeving op het gebied van mest.

Naam wet	Jaar inwerkingtreding	Uitvoeringsregelgeving/documenten
Wet dieren	2011	Besluit houders van dieren Besluit diergeneeskundigen Regeling identificatie en registratie van dieren Besluit identificatie en registratie van dieren Regelingen van gemeenten, provincies en waterschappen Regels voor huisvesting en verzorging van dieren Welzijnseisen voor dieren: Regels voor fokken
Gezondheids- en welzijnswet voor dieren	1992	Regeling preventie, bestrijding en monitoring van besmettelijke dierziekten en zoonosen en TSE's Besluit diergeneeskundigen Besluit gebruik sera en entstoffen Regeling aanwijzing entstoffen infectieuze bovine rhinotracheitis Regeling aanwijzing panel 'gE-Aujeszky' standaardsera en onderzoek Aujeszky-entstoffen
Meststoffenwet	1986	Uitvoeringsregeling Meststoffenwet Uitvoeringsbesluit Meststoffenwet Dierproductierechten Regeling ontheffing productierechten Dierlijke mest gebruiksnorm en gebruiksruijme Vrijstelling kleine bedrijven en hobbydieren Perceelsregister voor agrarische ondernemers
Wet ammoniak en veehouderij (Wav)	2002	Regeling ammoniak en veehouderij (Rav) Besluit emissiearme huisvesting
Wet milieubeheer (WMB), Omgevingswet (per 2019)	1979	
Wet geurhinder en veehouderij	2006	Besluit emissiearme huisvesting
Wet verantwoorde groei melkveehouderij	2014	AMvB grondgebondenheid Vrijstelling AMvB grondgebondenheid
Wet ruimtelijke ordening (Wro)	2006	Besluit ruimtelijke ordening Structuurvisies Bestemmingsplannen

Ruimtelijke aspecten

Een deel van Nederland heeft relatief arme zandgronden die minder geschikt zijn voor akkerbouw, maar wel geschikt zijn voor veehouderij. Laagveengebieden zijn vanwege de bodemdalingsproblematiek alleen

geschikt voor een relatief extensieve vorm van melkveehouderij. Via structuurvisies, provinciale verordeningen, ruimtelijke-inrichtingsplannen en gemeentelijke bestemmingsplannen wordt de aanwezigheid van intensieve veehouderij in gebieden geregeld (onder meer de aanwijzing van locaties/gebieden, grootte van percelen en toepassing van mest).

Veehouderij, melkquota en dierproductierechten

Aanvullend op de ruimtelijke inrichting van Nederland worden plaatsgebonden dierproductierechten verstrekt voor varkenshouders en pluimveebedrijven, waarmee het aantal te houden dieren per bedrijf of oppervlakte wordt gereguleerd. De interim-wet op een verantwoorde groei van de melkveehouderij (2014) scherpt de eisen aan de grondgebondenheid van melkveehouderijen aan om een verantwoorde groei mogelijk te maken na de opheffing van het melkquotum. Sinds de opheffing van het melkquotum in 2015 is het aantal melkkoeien toegenomen. Deze onbedoelde toename wordt in overleg tussen de sector en de overheid momenteel aangepakt, onder meer via de 'Stoppersregeling'.

Meststoffenwet

Daarnaast bestaat er specifieke wet- en regelgeving om milieuproblemen door veeteelt in Nederland te beperken. De Meststoffenwet, de Wet op de ammoniakemissie, en de Wet op de geurhinder zijn hier voorbeelden van. Vanaf 2019 zal de Omgevingswet ook invloed kunnen hebben op de ontwikkelingen in de veehouderij, inclusief de milieubelasting en effecten op de fysieke leefomgeving. De Meststoffenwet regelt de gebruiksruijme voor toepassing van nutriënten (stikstof en fosfaat). Sinds de opheffing van het melkquotum in 2015 is de gebruiksruijme voor fosfaat de belangrijkste rem op de groei van melkveehouderij, maar overschrijding ervan is aan de orde (zie vorige paragraaf). Nederlandse boeren hebben na een verzoek daartoe tot 2018 meer ruijme om stikstof aan te wenden dan de boeren in de andere EU-lidstaten ('derogatie'), namelijk tot 250 kilogram stikstof per hectare per jaar in plaats van 170. Eén van de EU-voorwaarden hieroor is wel dat Nederland de trends in nitraatconcentraties monitored in de bovenste grondwaterlaag. In 2016 werd de Meststoffenwet geëvalueerd (zie box).

Resultaten evaluatie van de Meststoffenwet

Het mestbeleid is niet effectief genoeg om overal in Nederland de in Europees verband afgesproken doelen voor schoon oppervlaktewater te halen. Deze doelen komen wel in zicht als de fosfaatbelasting uit de landbouw met 40% wordt verminderd en de stikstofbelasting met 20%. Dit staat echter op gespannen voet met de bemestingsadviezen, zo luiden enkele conclusies van de PBL-Evaluatie van de Meststoffenwet. De huidige aanpak van het mestprobleem loopt dus tegen zijn grenzen aan (PBL, 2017).

Wet dieren

Deze wet met uitvoeringsregelgeving biedt een kader voor het omgaan en het voederen van dieren, het gebruik van diergeneesmiddelen (inclusief antibiotica) en meer in het algemeen het dierenwelzijn. De wet levert geen of slechts een beperkte bijdrage aan de dynamiek van meststromen. Voor verschillende groepen zoals kalveren, varkens,

vleeskuikens en leghennen is er aanvullende regelgeving, bijvoorbeeld minimum maten voor de stallen voor het welzijn van kalveren.

Met de Wet dieren is het mogelijk om curatieve, preventieve, en groeibevorderende toediening van antibiotica aan vee te reguleren. Momenteel is de toepassing van antibiotica in de veehouderij aan (strengere) regels gebonden. In principe mogen antibiotica slechts worden gebruikt na goedkeuring door een gecertificeerd dierenarts.

Opslag, bewerking en verwerking

Voor opslag, transport en verwerking van mest gelden strenge regels. De overheid wil bijvoorbeeld het vervoer en opslag van mest in beeld hebben. Daarom moet bij elk mesttransport een Vervoersbewijs dierlijke meststoffen (VDM) ingevuld worden. De gegevens worden geregistreerd om zo te controleren waar de mest vandaan komt en naartoe gaat. Bij een transport over meer dan 10 kilometer is altijd bemonstering en analyse van de mest verplicht om de nutriëntenstromen goed in kaart te brengen.

Boeren zijn verplicht om mestopslagsystemen op eigen erf aan te leggen die voldoende groot is om de periode dat mest niet uitgereden mag worden volledig te overbruggen. Aan de opslag worden eisen gesteld, zodat emissies voorkomen worden. Aan inrichtingen voor drijfmest en digestaat worden andere eisen gesteld dan aan de opslag van vaste mest.

Aan mestverwerking worden ook voorwaarden gesteld. Mest voor de export moet altijd gehygiëniseerd worden

9.12 Bijlage L – Strategieën voor onderzoek naar ernst en impact van blootstelling aan resistente bacteriën in het milieu

Er zijn verschillende strategieën om de ernst en impact van de blootstelling aan antibioticaresistente bacteriën in het milieu te duiden. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen 'bottom-up' en 'top-down' benaderingen. Met een bottom-up benadering wordt met kwantitatieve blootstellingsgegevens de kans op infectie berekend. Met een top-down benadering worden met de waargenomen ziektelast de blootstellings- en infectierisico's gekwantificeerd. Voor beide is informatie vereist over de aanwezigheid van ABR in de verschillende compartimenten van de blootstellingsroutes (milieu, mest, water, voedsel, etc.) en de gevolgen voor de volksgezondheid (de zogenaamde dosis-responserelaties). Indien de gezondheidsgevolgen gestandaardiseerd uitgedrukt worden als DALY's¹¹, kunnen deze vergeleken worden met die van andere ziekteverwekkers (zie bijvoorbeeld Prüss, 2003).

Epidemiologische studies

Epidemiologische studies volgen een top-down benadering. Er wordt onderzoek verricht aan relatief grote groepen mensen met als doel het identificeren van risicofactoren. Een voorbeeld van een risicofactor is het optreden van ziekte als gevolg van zwemmen in verontreinigd water.

¹¹ DALY's (Disability Adjusted Life Years) zijn gedefinieerd als het aantal verloren (gezonde) levensjaren.

Voor onderzoek naar resistente bacteriën kan vooral gebruik worden gemaakt van twee epidemiologische methoden. Met een cohortstudie wordt het optreden van een effect (bijvoorbeeld dragerschap van een resistent bacterium) in mensen met een bepaalde blootstelling vergeleken met mensen zonder deze blootstelling. Er kan ook een bepaalde groep onderzocht worden zonder van tevoren te weten hoe vaak een bepaalde blootstelling voorkomt. Het voordeel van een cohortstudie is dat de rol van risicofactoren gevoeliger opgespoord kan worden. Echter, niet alle risicofactoren kunnen tegelijkertijd bestudeerd worden, terwijl dit beter kan bij de tweede type onderzoek. In principe kan met deze methoden ook de rol van risicofactoren voor een gezondheidsuitkomst onderzocht worden. In de praktijk is dat echter niet haalbaar, omdat de prevalenties van infecties met resistente bacteriën in Nederland in het algemeen zeer laag zijn en daarmee studies met heel veel deelnemers nodig zijn.

Op het gebied van ABR in het milieu kunnen epidemiologische studies goed ingezet worden om dragerschap van resistente bacteriën bij groepen met een bepaalde blootstelling te onderzoeken. Blootstelling door zwemmen of andere recreatie in oppervlaktewater is daarbij relevant, omdat dit een veel voorkomende blootstellingsroute is (ongeveer 10% van de bevolking zwemt in oppervlaktewater (Schets et al., 2015), en BRMO in zwemwater aangetoond werden (Blaak et al., 2014). Andere blootstellingsroutes omvatten beroepsmatige blootstelling aan afvalwater (bij medewerkers van RWZI's of mestverwerkende bedrijven/loonwerkers), omdat daar de blootstelling als hoog aangenomen kan worden.

Kwantitatieve microbiologische risicoanalyse

Een kwantitatieve microbiologische risicoanalyse (QMRA, de Engelse afkorting) is een modelleringstechniek die de keten van blootstelling, opname, kolonisatie, infectie en ziektelast beslaat. Benodigde informatie bestaat onder meer uit blootstellingswaarden (bijvoorbeeld de concentratie ABR in recreatiewater) en blootstellingskansen (bijvoorbeeld de kans dat een persoon een bepaalde hoeveelheid recreatiewater binnenkrijgt). Er zijn op dit moment nog onvoldoende gegevens over de relatie tussen dragerschap en infecties om de totale gezondheidslast van BRMO te kunnen bepalen. De QMRA-methode is wel bij uitstek geschikt om verschillende blootstellingsroutes met elkaar te vergelijken. De QMRA-methode werd al eerder door het RIVM toegepast om de blootstellingsrisico's¹² van zwemmers benedenstrooms van pluimveebedrijven en RWZI's te berekenen (Schijven et al., 2015). Indien ook gegevens beschikbaar zijn over de relatie tussen blootstelling en dragerschap of tussen blootstelling en impact op de gezondheid, kan een totale gezondheidslast berekend worden.

Ziektelastschattingen met DALY's

Met ziektelastschattingen uitgedrukt in bijvoorbeeld Disability Adjusted Life Years (DALY's) worden de gezondheidsgevolgen van verschillende aandoeningen op een vergelijkbare schaal bijeengebracht. Bij voldoende informatie kunnen de afzonderlijke bijdragen van verschillende

¹² Een blootstellingsrisico is gedefinieerd als de kans dat een persoon minstens één bacterie opneemt.

risicofactoren of oorzaken op de totale ziektelast vastgesteld worden. Dat noemen we attributie. Ook hiervoor wordt gebruikgemaakt van informatie over blootstelling en dosis-responsrelaties. Attributie vindt vaak op basis van *expert judgement* plaats. Omdat informatie over attributie momenteel schaars is, zijn ziektelastschattingen vooral geschikt om de ernst van een ziekte in kaart te brengen.

9.13 Bijlage M – Begrippenlijst

ABR	Antibioticaresistentie
AmpC-E.coli	AmpC-producerende <i>E. coli</i>
BRMO	Bijzonder Resistente Micro-organismen
BZV	Biochemisch zuurstof
Commensale bacteriën	Bacteriën die onschadelijk zijn voor de mens
CPE	carbapenemase producerende Enterobacteriaceae
CRE	Carbapenemresistente Enterobacteriaceae
CTX-M	ESBL-resistentiegen
DALY	Disability Adjusted Life Year
DWA	droogweerafvoer
Effluent	Uitgaande water van een afvalwaterzuiveringsinstallatie
ESBL-EC	ESBL-producerende <i>E. coli</i>
ESBL-Ent	ESBL-producerende Enterobacteriaceae
IBA	Individuele Behandeling Afvalwater
Influent	Inkomende water van een afvalwaterzuiveringsinstallatie
IRAS	Institute for Risk Assessment Sciences
KPC	Carbapenemase resistentiegen
KVE	kolonievormende eenheden
LC	Liquid Chromatography
Milieu	water, bodem, lucht
MS	Mass spectrometry
NCOH	Netherlands Centre for One Health
NDM	Carbapenemase resistentiegen
OXA-48	Carbapenemase resistentiegen
QMRA	kwantitatieve microbiologische risicoanalyse
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
Rav	Regeling ammoniak en veehouderij
RO	Reverse osmose
RWZI	Rioolwaterzuiveringsinstallatie
UU	Universiteit Utrecht
vanA-gen	Vancomycine resistentiegen
vanB-gen	Vancomycine resistentiegen
VDM	Vervoersbewijs dierlijke meststoffen
VRE	Vancomycine resistente enterokokken
WHO	Wereldgezondheidsorganisatie
WUR	Wageningen Universiteit

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag