

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 10 december 2019

**KENMERK** CGM/191210-01


**ONDERWERP** Inschaling van werkzaamheden met actief slib  
uit afvalwaterzuiveringsinstallaties

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG19-254\_2.8-000 getiteld  
'Transformation as an horizontal gene transfer phenomena in activated sludge samples' van  
de Technische Universiteit Delft deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met actief slib afkomstig van een grootschalige afvalwaterzuiveringsinstallatie. De aanvrager wil gaan onderzoeken óf en onder welke condities horizontale genoverdracht bij verschillende soorten micro-organismen in actief slib plaatsvindt. Daartoe zijn er *in vitro* kweeksystemen ontwikkeld, waarin slibmonsters uit de afvalwaterzuiveringsinstallatie zullen worden opgekweekt. Aan de kweekcultures zal een plasmide met een breed gastheerbereik worden toegevoegd om de natuurlijke transformatie en horizontale genoverdracht te monitoren. De aanwezigheid van pathogeniteitsklasse 3 micro-organismen in slibmonsters bij aanvang en tijdens de voorgenomen werkzaamheden is niet uit te sluiten, hoewel de hoeveelheden naar verwachting laag zijn. De aanvrager is voornemens slibmonsters te kweken in een afgesloten systeem en open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II met handschoenen uit te voeren. De COGEM adviseert om desinfectantia te gebruiken die effectief zijn tegen uiteenlopende micro-organismen en tegen schimmel- en bacteriesporen, en signaleert de noodzaak om handschoenen tot over de mouw te dragen tijdens de open handelingen om besmetting van de medewerker te voorkomen. Onder de voorgenomen inperkingsmaatregelen acht de COGEM de milieurisico's verwaarloosbaar klein indien deze werkzaamheden op ML-II worden uitgevoerd.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo  
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

# Inschaling van werkzaamheden met actief slib uit afvalwaterzuiveringsinstallaties

## COGEM advies CGM/191210-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met actief slib van een grootschalige afvalwaterzuiveringsinstallatie (IG19-254). Actief slib wordt gebruikt tijdens de biologische zuivering van afvalwater, zoals bij de zuivering van rioolwater. De aanvrager wil gaan onderzoeken óf en onder welke condities in actief slib natuurlijke transformatie en horizontale genoverdracht ('horizontal gene transfer'; HGT) bij verschillende soorten micro-organismen plaatsvindt. Daartoe zijn er *in vitro* kweeksystemen ontwikkeld, waarin slibmonsters uit de afvalwaterzuiveringsinstallatie zullen worden opgekweekt. Aan de kweekcultures zal tevens een plasmide met genen coderend voor het 'green fluorescent protein' (GFP) en kanamycineresistentie worden toegevoegd om de natuurlijke transformatie en HGT te monitoren. Het plasmide kan zowel in Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën repliceren. De aanvrager wil monitoren hoe de verdeling van het plasmide over de verschillende micro-organismen in de slibmonsters beïnvloed kan worden door verschillende kweekcondities te testen met als doel genoverdracht te minimaliseren.

### 2. Voorgenomen werkzaamheden

#### 2.1 Samenstelling van de monsters

In het verleden heeft de aanvrager de in actieve slibmonsters aanwezige micro-organismen geanalyseerd met behulp van 'next generation sequencing' (NGS). Uit deze analyses kwam naar voren dat er, naast ongeclassificeerde micro-organismen, voornamelijk micro-organismen (bacteriën en schimmels) ingedeeld in pathogeniteitsklasse (PG) 1 en 2 in de slibmonsters voorkomen. In heel lage frequenties werden ook sequenties afkomstig van micro-organismen geclassificeerd als klasse 3 pathogenen gevonden (<0,02%). De aanvrager geeft aan dat een frequentie van <0,02% betekent dat het betreffende organisme beneden de detectiegrens blijft, en dat sequenties die met dergelijk lage frequentie gedetecteerd worden eigenlijk vals positieve signalen zijn. Hiervoor levert de aanvrager verschillende referenties aan<sup>1,2,3</sup>. Een qPCR analyse met specifieke primers heeft uitgewezen dat het laag frequente signaal voor *Bacillus anthracis* in de NGS experimenten afkomstig is van een andere *Bacillus* soort. Ook stelt de aanvrager dat eventueel aanwezige pathogene micro-organismen tijdens het afvalwaterzuiveringsproces weg geconcurrereerd worden, en levert hij NGS data waaruit blijkt dat klasse 3 pathogenen niet significant aanwezig zijn na afloop van het kweekproces.

De aanvrager geeft aan dat er niet bewust geselecteerd zal worden op bepaalde bacterie- of schimmelsoorten, ook niet onder condities waarbij antibioticum in het medium aanwezig zal zijn. Ook zal de aanvrager geen reïncultures maken van individuele micro-organismen.

#### 2.2 Kweekcondities van de slibmonsters

De aanvrager wil de slibmonsters in afgesloten systemen in volumina van 100 ml of 1 l gaan kweken. Als kweekmedium zal synthetisch medium dat het rioolmilieu nabootst worden gebruikt. Dit medium is

beschreven in de richtlijnen van de Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)<sup>4</sup>. Door dit medium in verschillende verhoudingen te verdunnen met water, kan de groei van bepaalde bacteriën worden bevorderd.

Voor de 100 ml cultures zullen erlenmeyers van 250 ml worden gebruikt. De kweken zullen overnacht onder aerobe condities bij 25°C plaatsvinden en dienen als ‘proof of principle’ met als doel te onderzoeken of micro-organismen in het slib in staat zijn het plasmide op te nemen (natuurlijke transformatie). Het plasmide zal bij aanvang van de kweek worden toegevoegd.

Voor de 1 l cultures zal de aanvrager ‘sequential batch reactors’ (SBRs) gebruiken. In de SBRs zullen aerobe en anaerobe condities elkaar in cycli van 6 uur afwisselen. De SBR-kweken zullen tussen de 1 en 4 weken worden aangehouden en hebben als doel het waterzuiveringsproces na te bootsen. Er zullen verschillende kweekcondities worden gebruikt, zoals verschillende antibioticaconcentraties, verschillende ‘feast-famine’ condities en verschillende groeisnelheden. Er zal worden gekweekt bij 25, 30 en 35 °C.

Tussen de cycli door zal de SBR deels worden gedecanteerd en opnieuw met kweekmedium worden aangevuld. Tevens zal dan het plasmide aan de kweek worden toegevoegd. In de gedecanteerde suspensie zal het optreden van HGT door middel van qPCR, ampliconsequencing en fluorescentiemeting (GFP expressie) worden gemonitord.

Open handelingen zullen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II. Het nemen van monsters en andere handelingen aan de SBR zullen zo worden uitgevoerd dat aerosolformatie en besmettingen van externe oppervlakten worden vermeden. De effluent uit de SBR wordt apart opgevangen in een gesloten vat en wordt geïnactiveerd door autoclaveren (30 minuten op 121 °C). Op eenzelfde manier zal na afloop van het experiment de inhoud van de SBR worden geautoclaveerd om micro-organismen te inactiveren. Verder zullen tijdens alle werkzaamheden handschoenen worden gedragen.

### 2.3 Plasmide pBAV1K-T5-gfp

Plasmide pBAV1K-T5-gfp zal gebruikt worden om horizontale genoverdracht te monitoren. Dit plasmide bezit een ‘origin of replication’ (ori) die zowel door Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën gebruikt kan worden, en leidt tot hoge aantallen kopieën.<sup>5</sup> De ori is afkomstig van cryptische plasmide pWV01 uit *Streptococcus cremoris* met een breed gastheerbereik.<sup>6</sup> pBAV1K-T5-gfp bezit het *nptIII* (*aphAIII*, *aph(3')IIIa*) gen dat codeert voor het type III aminoglycoside-3'-phosphotransferase (APH(3')-III) afkomstig van *Enterococcus faecalis*. Expressie van dit enzym leidt tot resistentie tegen de aminoglycosides kanamycine, neomycine, paromomycine, ribostamycine, lividomycine, butirosine en gentamicine B.<sup>7,8</sup> Ook bevat pBAV1K-T5-gfp een gen coderend voor het green fluorescent protein (GFP).

De plasmiden pBAV1K-T5-gfp en pWV01 zijn niet opgenomen op Lijst A2 behorende bij Bijlage 2 van Regeling GGO.<sup>9</sup> Bijlage 2 van Regeling GGO omvat lijsten met micro-organismen (Lijst A1), vectoren (Lijst A2), en inserties (Lijst A3) waarmee onder ML-I laboratoriumcondities ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij micro-organismen en vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die niet, op de A-lijsten staan (respectievelijk lijst A1 ‘veilige micro-organismen’, ‘lijst A2 veilige vectoren’, en ‘lijst A3 inserties’).

### 3. Overweging

#### 3.1 De aanwezigheid van micro-organismen uit pathogeniteitsklasse 3 in slibmonsters

De microbiële samenstelling van slibmonsters uit afvalwaterzuiveringsinstallaties, zoals gebruikt gaan worden in de beschreven studie, is complex en bestaat uit een mix van bacteriën, schimmels, parasieten en virussen. De slibmonsters zullen in batch (100 ml cultures) en onder op waterzuivering gelijkende condities (1 liter in SBR) gekweekt gaan worden, met als doel natuurlijke transformatie en horizontale genoverdracht van plasmide pBAV1K-5K-gfp te bestuderen onder verschillende kweekcondities.

Op basis van NGS analyses stelt de aanvrager dat in slibmonsters vooral micro-organismen uit PG 1 en 2 aanwezig zijn. In lage frequenties (<0,02%) worden sequenties van micro-organismen uit PG 3 gevonden, die volgens de aanvrager hoogstwaarschijnlijk afkomstig zijn van vals-positieve signalen. De aanvrager stelt tevens dat tijdens de afvalwaterzuivering geen verrijking van de hoeveelheid pathogene micro-organismen plaatsvindt en onderbouwt dit met literatuurgegevens. Dit geldt volgens de aanvrager ook onder de voorgenomen kweekcondities: uit NGS analyses van eerdere kweekexperimenten blijkt dat er geen significante hoeveelheden PG3 pathogenen aanwezig zijn.

De COGEM merkt op dat de aanvrager niet beschrijft hoe de monsteropwerking voor de NGS-analyse heeft plaatsgevonden. Zij wijst er op dat DNA isolatie uit bacterie- of schimmelsporen lastiger is dan uit cellen, en dat de NGS data daarom mogelijkwijs een onderschatting geven van aanwezige ruststadia van sporevormende (PG3) bacteriën en schimmels.

Hoewel de aanvrager stelt dat de PG3 organismen ten hoogste in zeer lage frequenties voorkomen op basis van eerder uitgevoerde NGS experimenten, kan de COGEM op basis van de gepresenteerde gegevens de aanwezigheid van PG3 micro-organismen in slibmonsters bij aanvang van en tijdens de experimenten niet uitsluiten. Zij acht de kans op verrijking van PG3 bacteriën en schimmels wel verwaarloosbaar klein, aangezien snelgroeiende opportunistische bacteriën (PG1 en PG2) de culture zullen overnemen. Tijdens het *in vitro* kweken van slibmonsters, acht de COGEM een toename in aantal van PG3 parasieten uitgesloten gezien de levenscyclus van deze organismen.

Tot slot merkt de COGEM op dat uit de aanvraag onduidelijk is of de aanvrager eerder geanalyseerde slibmonsters wil gebruiken in de experimenten, of nieuw verkregen slibmonsters. In het laatste geval is de werkelijke samenstelling van de monsters, en dus de aanwezigheid van PG3 micro-organismen, bij aanvang van de experimenten onduidelijk.

Samengevat concludeert de COGEM dat niet uitgesloten kan worden dat er gedurende de kweekexperimenten organismen van PG 3 aanwezig zijn.

#### 3.2 Kweekcondities

De aanvrager is voornemens slibmonsters te kweken in een afgesloten systeem en open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II met handschoenen uit te voeren.

### 3.3 Kanamycineresistentiegen

De aanvrager wil een plasmide gebruiken met een *nptIII* resistentiegen als selectiemarker. De COGEM merkt op dat dit gen, alhoewel het een breder resistentiespectrum heeft dan het gangbare *nptII* gen, niet resulteert in resistentie-ontwikkeling tegen klinisch relevante ('high risk') antibiotica.

## 4. Advies

De aanwezigheid van PG3 micro-organismen in slibmonsters bij aanvang en tijdens de voorgenomen werkzaamheden is niet uit te sluiten, hoewel de hoeveelheden naar verwachting laag zijn. De aanvrager is voornemens slibmonsters te kweken in een afgesloten systeem en open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse II met handschoenen aan. Gezien de aard van de voorgenomen inperkingsmaatregelen acht de COGEM de milieurisico's verwaarloosbaar klein indien deze werkzaamheden op ML-II worden uitgevoerd.

Als aanvullende maatregel om eventuele verspreiding te voorkomen adviseert de COGEM desinfectantia te gebruiken die effectief zijn tegen uiteenlopende micro-organismen en tegen schimmel- en bacteriesporen om onbedoeld besmette oppervlakten en materialen te ontsmetten. Mogelijkerwijs is een combinatie van desinfectantia noodzakelijk of moet de aanvrager uitwijken naar andere methoden om te ontsmetten.

Verder signaleert de COGEM de noodzaak om handschoenen tot over de mouw te dragen tijdens de open handelingen om besmetting van de medewerker via open wondjes te voorkomen.

Samenvattend acht de COGEM met het in acht nemen van bovenstaande aanvullende inperkingsmaatregelen de risico's voor mens en milieu van voorgenomen werkzaamheden op ML-II verwaarloosbaar klein.

## Referenties

1. Martins LF *et al.* (2013). Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms. PLOS One 8: e61928. 10.1371/journal.pone.0061928
2. Karimi E *et al.* (2017). Comparative Metagenomics Reveals the Distinctive Adaptive Features of the *Spongia officinalis* Endosymbiotic Consortium. Front Microbiol. 8:2499
3. Shoporov AN *et al.* (2018). Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. Microbiome 6: 68
4. OECC (2001). Test No. 303: Simulation Test - Aerobic Sewage Treatment -- A: Activated Sludge Units; B: Biofilms, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070424-e>
5. Bryksin, Anton & Matsumura, Ichiro (2010). Rational Design of a Plasmid Origin That Replicates Efficiently in Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. PloS One. 5: e13244. 10.1371/journal.pone.0013244.
6. Leenhouts KJ, Tolner B, Bron S, Kok J, Venema G, *et al.* (1991). Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1. Plasmid 26: 55–66.
7. Fong & Berghuis (2009). Structural Basis of APH(3)-IIIa-Mediated Resistance to

- N1-Substituted Aminoglycoside Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3049–3055
8. Shaw KJ *et al.* (1993). Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiol. Rev.* 57: 138-163
  9. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-07-01> (bezoekt: 6 december 2019)