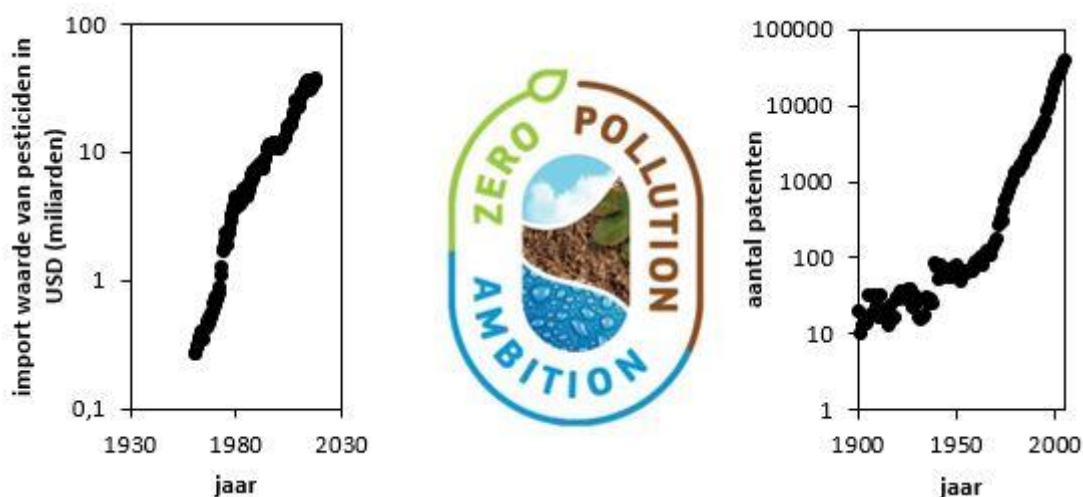


## Biologische afbreekbaarheid van organische microverontreinigingen in waterzuiveringsinstallaties

Tom Nolte, Ana Rios-Miguel, Jan Hendriks (Radboud Universiteit Nijmegen), Melanie Kuiper (waterschap Drents-Overijsselse Delta)

Organische microverontreinigingen (OMV's) worden in afvalwaterzuiveringsinstallaties niet effectief verwijderd en de monitoring ervan is vanwege het hoge aantal van deze chemicaliën in water een onmogelijke taak. Voor een goede risicobeoordeling zijn modelleringsinspanningen nodig. De belangrijkste input van deze modellen is de biologische afbreekbaarheid van OMV's in rwzi's, maar deze wordt nog niet volledig begrepen. Daarom zijn verschillende factoren onderzocht die van invloed zijn op de biologische afbraak (concentratie, stoffeigenschappen, RWZI-omstandigheden, microbiële activiteit en aanpassing) en kunnen worden geïmplementeerd in lotmodellen (Simpletreat) en in het opzetten van nieuwe afvalwaterbehandelmethoden voor verbeterde OMV-verwijdering.

De ontwikkeling, productie, registratie, en het gebruik van chemische stoffen laten wereldwijd in de laatste decennia een explosieve exponentiele groei zien, met nauwelijks vertraging in zicht (zie afbeelding 1). Chemicaliën worden door traditionele zuiveringsinstallaties slechts gedeeltelijk verwijderd en persistente chemicaliën belanden via water of slib in het milieu. Er worden organische microverontreinigingen (OMV's) aangetroffen in oppervlaktewater, zoals pesticiden, verzorgingsproducten en geneesmiddelen. In Nederland belandt jaarlijks ruim 140 ton aan farmaceutica, omzettingsproducten en onbekende chemicaliën in watersystemen.



Afbeelding 1. Marktwarde (A, FAO) en aantal patenten (B, Pubchem) van formuleringen met een selectie van 20 pesticiden, farmaceutica en stimulerende stoffen. Vanaf 1960, aan het eind van de 'pharmaceutical golden era', met veel nieuwe ontdekkingen, is een stijging zichtbaar

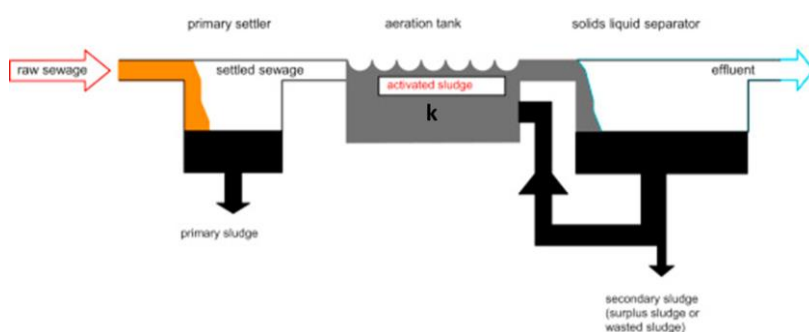
Chemische vervuiling dient beperkt te worden door emissies te verminderen [1]. Het 'Zero Pollution Action Plan' van de Europese Commissie beoogt tegen 2050 'alle bronnen' tot nul te reduceren en water en bodem te zuiveren [2]. Milieunormen moeten worden nageleefd, zodat de omgeving niet

giftig is. (Internationale) normeringen (bv. de Kaderrichtlijn Water en Europese Drinkwaterrichtlijn) zijn leidend [3] voor waterschappen, zuiveringsbedrijven en wetenschappers. Analysemethoden voor monitoring van OMV's zijn vooral gericht op een beperkte stoflijst. Omdat analyses vaak gericht zijn op normeringen is slecht bekend welke stoffen aanwezig zijn in het oppervlaktewater, grondwater en daaruit bereid drinkwater. Het aantal stoffen en de diversiteit van afbraakproducten zijn groot.



Afbeelding 2. Zuiveringsinstelling in Nijkerk, waarin OMV's werden gemeten en gemodelleerd. [nicelocal.co.nl](http://nicelocal.co.nl)

Het monitoren van miljoenen stoffen kost veel tijd en geld. Niet alle stoffen zijn meetbaar, vanwege stoffeigenschappen en strategieën van analyse of monsternamen. Vandaar dat veelal modellen worden gebruikt. De chemische wet van 25 jaar geleden in Nederland (later EU) bracht SimpleTreat: een blootstellings- en emissiemodel voor het lot van stoffen in afvalwaterzuiveringsinstallaties. SimpleTreat is een onderzoeksinstrument om risico's van stoffen te beoordelen in overeenstemming met REACH (Registratie, Evaluatie, Autorisatie en beperking van Chemicaliën)-regelgeving in de EU.



Afbeelding 3. Weergave van het beoordelingsmodel SimpleTreat. In de middelste (aerobe actief slib-) tank vindt biodegradatie plaats, met een snelheid evenredig aan  $k$

Toxiciteit voor mens en ecosysteem hangt af van de verblijftijd en concentratie. Deze worden vooral bepaald door de afbreekbaarheid van de stof. Bioafbreekbaarheid (van OMV's) wordt nog slecht begrepen en is daardoor slecht te voorspellen, hetgeen risicoanalyses bemoeilijkt. Met beter begrip en nauwkeurigere voorspelling van biologische afbraak zijn analyses te verbeteren. EU-blootstellings- en computermodellen als SimpleTreat hebben gedurende ruim 40 jaar de groeiende vraag naar assessment ondersteund. Vroeger waren assessments veelal gebaseerd op enkele simpele parameters. Door verbeterde rekenkracht en verbondenheid tussen onderzoekers, komen geavanceerde modellen (QSARs) vaker voor.

## Het CER-CEC-project

Het programma 'Contaminants of Emerging Concern' (CEC) van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO) onderzoekt bio-afbreekbaarheid van chemische verontreinigingen in waterzuiveringsinstallaties. Op deze manier kunnen emissies en gevolgen van microverontreinigingen in kaart worden gebracht en geprioriteerd. Een doel is nauwkeurigere voorspellingen door verbeteren van modellen als SimpleTreat voor emissies van OMV's uit waterzuiveringsinstallaties.

Sommige OMV's, zoals paracetamol, dienen als koolstof- en energiebronnen voor bacteriën en worden volledig afgebroken tot CO<sub>2</sub> en biomassa. Recalcitrante OMV's als diclofenac worden slechts gedeeltelijk getransformeerd. Transformatie in aerobe waterzuiveringstanks is variabel [4] en hangt dus af van stoffeïenschappen, maar ook microbiële gemeenschappen en waterzuiveringsomstandigheden. Op dit moment worden de invloed van microbiële gemeenschappen en de zuiveringsomstandigheden nauwelijks meegenomen in lotmodellen. In het CER-CEC-project zijn combinaties van invloeden van chemische en biologische processen geanalyseerd om het gedrag van OMV's bij zuivering te voorspellen.

## Resultaten

Verwijdering bestaat uit onder andere uit biobeschikbaarheid. Om dit te beschrijven is gewerkt met de volgende twee processen:

### Zuur/basereacties

- Waterstofionen zorgen voor ladingveranderingen in OMV's.
- Hoe meer negatief de lading en hoe meer polair de OMV, hoe hoger de wateroplosbaarheid en bio-beschikbaarheid.

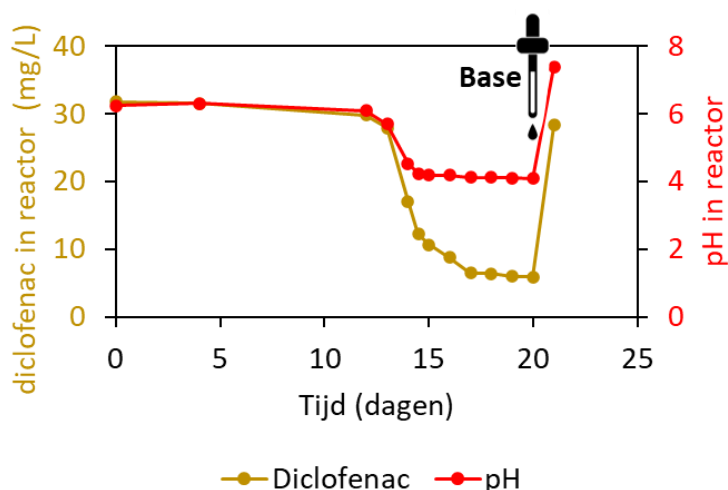


### Sorptie

- Aan bijvoorbeeld slib of bio-inactieve zwevende deeltje (ZD).
- Hoe sterker de stof sorbeert (aan bijv. ZD), hoe lager de bio-beschikbaarheid voor afbraak.



In het CER-CEC-project zijn deze theorieën experimenteel onderzocht: de pH ging bijvoorbeeld omlaag (naar 4) in een bioreactor met 100 maal verdund actief slib, mogelijk door celsterfte. Tegelijkertijd nam de concentratie, oftewel biobeschikbaarheid, van diclofenac af. De biobeschikbaarheid nam weer toe wanneer de zuurgraad weer naar 7 werd gebracht. Deze bevindingen suggereren een omkeerbare sorptie naar slib (afbeelding 4).



Afbeelding 4. Diclofenac-concentraties in een nutriëntenmedium geïnoculeerd met biomassa uit een bioreactor ('Pharmafilter' uit Delft). Diclofenac-concentraties werden gemeten met een HPLC-UV [5]

Er is ook geprobeerd inzicht te krijgen in de invloed van eigenschappen van microbiële gemeenschappen op de stof-verwijdering in RWZIs. Verwijdering bestaat ook uit biochemische verwijdering die uiteen gesplitst zijn in verschillende processen. Er werd gewerkt met de volgende processen:



#### Biologische afbraak

- via metabole redoxreacties (weergeven als een 'Pacman').
- Hoe groter het chemische oxidatiepotentiaal van de stof (bijv. weinig halogenering), hoe hoger het biodegradatiepotentiaal daarvan in een aerobe tank.
- Hoe kleiner en gunstiger de geometrie van de stof (bijv. weinig sterische hindering door tert-butylgroepen), hoe gemakkelijker interacties en hoger het biodegradatiepotentiaal.

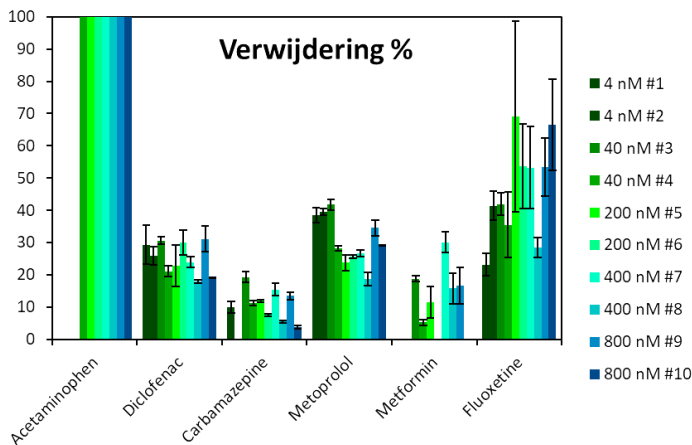


#### Adaptatie

- van de bacteriële kolonie (vermeerdering van Pacmans).
- Hoe meer een stof 'lijkt' op een natuurlijke stof, bijvoorbeeld een nutriënt, hoe groter de kans dat afbraak van deze stof via bestaande metabole paden plaatsvindt.
- Hoe hoger de concentratie van de stof, hoe hoger het energetische potentiaal (drijvende kracht) voor adaptatie van microbiota, die nieuwe metabole paden ontwikkelen of bestaande paden uitbreiden.

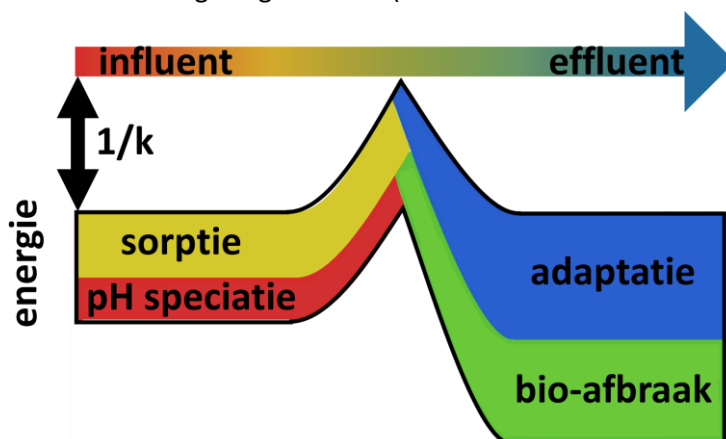
Ook deze theorieën zijn onderzocht. Wat betreft de OMV paracetamol, lijkt de chemische structuur sterk op aromatische aminozuren als tyrosine. Er zijn sequenties bepaald van DNA en RNA van microbiota die op paracetamol groeien als koolstofbron. Hierbij werden genen met een hoge expressie opgemerkt, die betrokken zijn bij de afbraak van aromatische aminozuren [5]. Er werden verschillende amidases die paracetamol omzetten geïdentificeerd. Deze resultaten suggereren dat OMVs die 'lijken op' natuurlijke metabolieten sneller worden omgezet, omdat ze reeds bestaande genen en enzymen aanroepen/gebruiken.

Een lage OMV-concentratie impliceert een trage massaoverdracht van OMV's in cellen, waardoor er geen inductie van afbraakgenen kan plaatsvinden. We namen lagere biotransformatiesnelheden waar bij lagere concentraties [6]. Hogere OMP-concentraties gedurende lange tijd zorgen voor een selectiedruk voor micro-organismen, die daarmee sneller evolueren. Hogere influentconcentraties van OMVs correleren met een hogere verwijdering in rwzi's [7, 8], maar verhoging van de OMV-concentratie over 2,5 maanden gaf geen noemenswaardige verbetering in verwijderingspercentage. Daarom is niet alleen concentratie, maar ook blootstellingstijd belangrijk is.



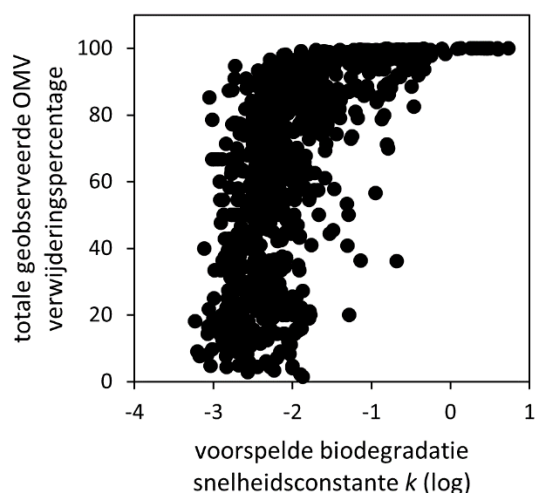
Afbeelding 5. Verwijderingspercentages bij verschillende concentraties in een bioreactor geïnoculeerd met actief slib en een nutriëntenmedium [8]. De gemeten fluoxetineconcentratie in het influent was 10 keer lager dan hier weergegeven. Elke balk is voorzien van een standaardafwijking, berekend uit een tripletmeting. “#” met nummer geeft de week aan waarin de meting werd uitgevoerd

De bovengenoemde processen karakteriseren wisselwerking tussen eigenschappen van microben, de omgeving en stoffeigenschappen, en komen voort uit eerdere hypothesen [9]. Er zijn ‘fate-processen’ (in rood t/m blauw) geparametriseerd voor biodegradatie middels energieën en frequenties. Met ‘Arrhenius-vergelijkingen’ zijn de snelheidsconstanten  $k$  berekend:  $k = \text{frequentie} \cdot e^{-\text{energie}/\text{temperatuur}}$ . Een hogere energie heeft meer effect op de  $k$  (afbeelding 6). De flexibele berekening houdt rekening met microbiële en omgevingsfactoren (hoe de stof interacteert met microben).



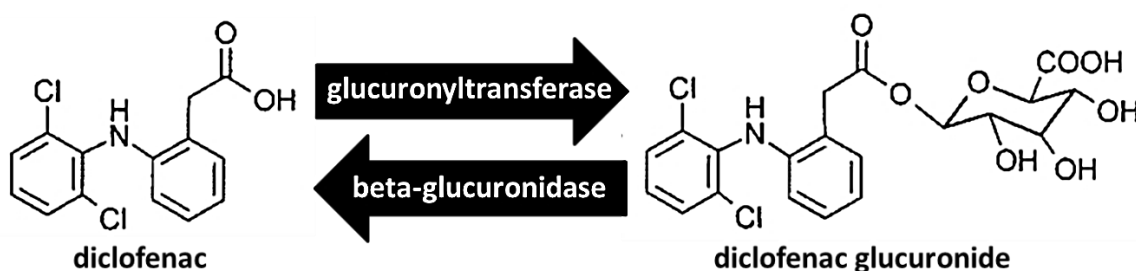
Afbeelding 6. Processen die tezamen verwijdering beïnvloeden: pH-speciatie (rood), sorptie (geel), bestaande metabole (redox-) paden (groen), acclimatie (blauw). Voor OMV-omzetting (midden) naar reactieproducten (rechts) moeten OMV's biobeschikbaar worden, bijvoorbeeld middels zuur/basereacties (links). Energieën (verticaal) zijn aan elkaar gekoppeld om een snelheidsconstante  $k$  te berekenen: grotere energie heeft meer effect op  $k$

Om de theorieën te staven zijn aanvullende data gebruikt. Hiervoor is de zuivering onderzocht van 373 OMV's in waterzuiveringsinstallaties verspreid over Nederland, België, Zweden, Canada en Japan [10]. Uit (biobeschikbare) concentraties van het afvalwater-influent en -effluent zijn verwijderingsrendementen berekend voor aerobe behandeling met actief slib. Daarna zijn deze experimentele verwijderingsrendementen vergeleken zij met voorspelde waarden voor  $k$  (afbeelding 6). Er is een verband geïdentificeerd:



Afbeelding 7. Experimentele verwijderingen van verschillende OMV's in verschillende RWZI's, gecorreleerd aan een biodegradatiesnelheidsconstante voorspeld met afbeelding 6. Data uit [10]

Soms werd een negatieve verwijdering gevonden. Dit kan betekenen dat er stof is gevormd, geringe afbraak en onnauwkeurige metingen voor verwijdering, of overschatting van sorptie. Met name stofvorming lijkt relevant: vele farmaceutica worden geconjugeerd via bijvoorbeeld glucuronidering of sulfatering in de mens. Na uitscheiding transformereren vele conjugaten terug naar hun uitgangsstof, bijvoorbeeld diclofenac:



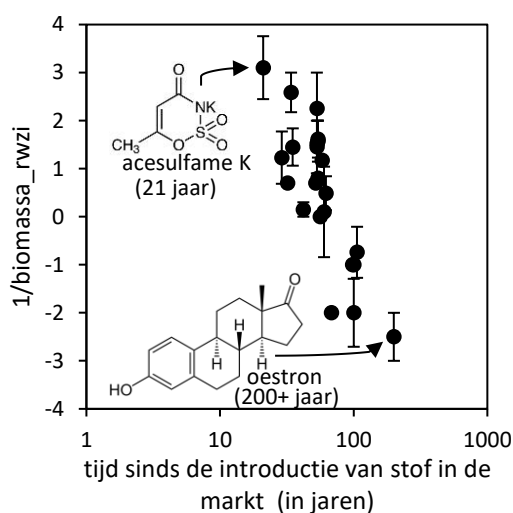
Afbeelding 8. Conjungeren van een suikergroep (glucose) aan diclofenac door het enzym glucuronyltransferase in de mens. Knippen van de binding tussen glucose en diclofenac door het enzym beta-glucuronidase tijdens afvalwaterzuivering

Afbeelding 7 is te beschrijven met formule (1), met gefitte waarden voor  $k_{50}$  (de  $k$ -waarbij 50% verwijdering optreedt) en  $\beta$ . Biologische en wiskundige beginselen zeggen dat  $\beta$  de diversiteit van de microbiota in de installatie karakteriseert. Is diversiteit ‘oneindig klein’ ( $\beta = \infty$ ) dan is er slechts 1 type bacterie aanwezig, en is er óf 100% afbraak, óf 0% verwijdering: 1 bacterie kan de stof wél of niet transformeren.  $k_{50}$  hangt af van hoeveel de stof de microbiota heeft beïnvloed, in een blootstellingstijd ( $t$ ) om ‘afbraak-relevante’ biomassa te genereren (wet van Haber [11]), vergelijking (2):

$$(1) \quad \text{verwijderingspercentage} = \frac{100}{1 + \left(\frac{k}{k_{50}}\right)^{-\beta}}$$

$$(2) \quad k_{50}t = -\ln(1 - \text{biomassa})$$

Biomassa zou dus evenredig moeten zijn aan blootstellingstijd: hoe langer de OMV in het milieu is, hoe meer biomassa er is om OMV's af te breken. Deze bewering hebben is getest: ‘milieu-residentietijden’ zijn benaderd door terug te rekenen vanuit data waarop stoffen werden toegelaten [12]: data sinds patenten. De gevonden relatie is weergegeven in afbeelding 9.



Afbeelding 9. Relatie tussen ‘milieuresidentietijd’ (x-as) en waargenomen bio-afbreekbaarheid in zuiveringsinstallaties (y-as) voor verschillende OMV's. Biomassa (y-as) uitgedrukt als OMV-biodegradatie inductieconcentraties ( $nM$ ,  $\log$ )

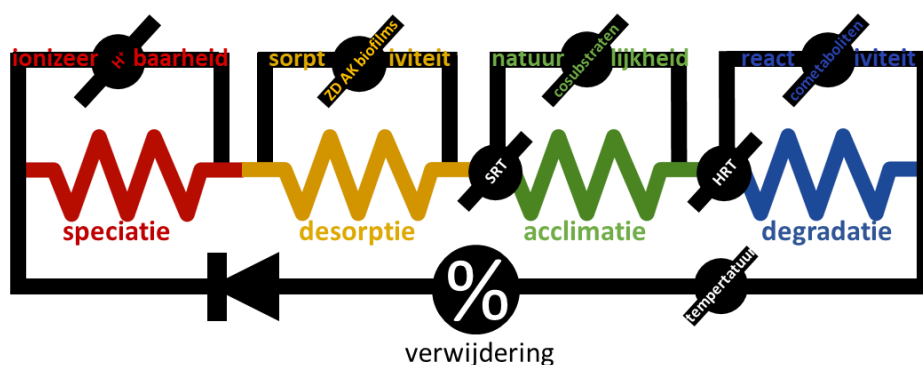
Afbeelding 9 suggereert dat het quotiënt van biomassa en tijd constant is. Stoffen die al 100 jaar geleden in het milieu zaten, laten hogere bio-afbreekbaarheid zien, via hogere biomassa, dus lagere  $k_{50}$  of inductieconcentratie (IC). Bij lagere  $k_{50}$  of IC is er meer biomassa beschikbaar gekomen voor transformaties. Microben detecteren (en induceren door) OMV's dus al bij lage concentraties. Bij hogere  $k_{50}$  of IC is er nog niet veel tijd geweest om de ‘juiste’ metabole paden te doen evolueren. Ter verfijning zijn de onderzoekers op zoek naar meerjarige residentietijden en -concentraties. Grootschalige meetcampagnes zijn echter een recent begrip. We zijn vooralsnog aangewezen op indicatoren als cumulatieve ontwikkeling van productievolumes/consumpties.

## Aanbevelingen

Verschillende zaken kunnen helpen om modellen te verbeteren, bijvoorbeeld een betere documentatie van 'metadata', gekoppeld aan databases met OMV-concentratie metingen (temperatuur, nutriëntenconcentratie, SRT/HRT, microbiële gemeenschap, gesuspendeerde of zwevende deeltjes (ZD)). Bovendien zouden standaardmethoden voor bemonstering en metingen (HPLC-MS) databases vergelijkbaar maken. Groepering van biotransformatiemechanismen (transformatieproducten, genen en betrokken cofactoren, enz.) op basis van de (co)metabole routes die ze ondergaan, kan voorspelling van afbraak/lot verbeteren [7].

CER-CEC streeft ook naar ontwikkeling van verbeterde en rendabele afbreekbaarheid en verwijdermethoden voor OMV's. Idealiter gaan bestaande milieu-netwerken OMV's verwerken. Als het afvalwater bijvoorbeeld stikstofrijk is, kan afbraak van stikstofrijke OMV's hierin beter tot zijn recht komen. Afvalwater waarin microben ingesteld zijn op afbraak van eiwitten (bijvoorbeeld afvalwater van slachthuizen), zal eerder geneigd zijn om ook 'eiwit-achtige' OMV's af te breken. Als het afvalwater aerob is zal dit OMV's met hoog oxidatiepotentiaal makkelijker afbreken; anaerob afvalwater zal OMV's met een hoog reductiepotentiaal makkelijker afbreken.

Soms zijn metabole paden niet of nauwelijks aanwezig. Projectresultaten wijzen er collectief op dat verhoging van de effectieve concentratie, of 'interactie frequentie' tussen stoffen en biomassa de afbraakcapaciteit kan verhogen. Toegang tot (co)metabole netwerken van OMV's zou dus moeten worden verbeterd. Weerstand voor biologische afbraak (afbeelding 10) kunnen worden omzeild door de omstandigheden van de waterzuivering te wijzigen (de 'schakelaars') met eerdergenoemde processen. Optimalisatiestrategieën verschillen per stof. 'Acties' dienen lang vol te worden gehouden voor structurele (meerjarige) veranderingen. Vergelijking (2) leert: hoe langer, hoe beter.



Afbeelding 10. Schakelschema voor OMV-verwijdering. Afhankelijk van operationele instellingen en of CEC 'past' in bestaande metabole paden, polariteit, zuur/basekarakter, etc. kunnen chemicaliën/nutriënten/co-metabolieten/verzuring/etc. worden toegevoegd

Het toevoegen van een base kan een OMV polariseren zodat meer stof, functionele groepen, bindingen en elektronen (bio)beschikbaar komen. Bij een grotere beschikbaarheid kunnen bacteriën zich aanpassen door transporters, enzymen etc. te produceren (evolueren), waarmee zij een (nog) hogere concentratie bewerkstelligen in de cel of de plaats waar de biotransformatie plaatsvindt bewerkstelligen. Concentratieverhoging correspondeert met een hoger biodegradatiepotentiaal. Nutriënten zijn wellicht overbodig, omdat deze in vele milieus al beschikbaar zijn. Co-metabolisme kan worden ingezet, maar daarvoor zullen stoffen moeten worden toegevoegd, hetgeen vervuiling op zich is. Zeer toxische OMV's waarvan niet-schadelijke analogen bestaan, vormen een uitzondering.



Als stoffen geloosd worden beneden een (voor mens/milieu) schadelijke limiet, kan de natuur zijn gang gaan. We moeten de natuur dan niet verhinderen om zich aan te passen naar OMV-afbraak. OMV's (en dus afvalwater) dienen dus niet onnodig verdund (dus geloosd) te worden. Houd OMV's (en afvalwatersoorten) ook waar mogelijk gescheiden ('stof-recycling') in hogere (bio-beschikbare) concentraties, zodat microben zich kunnen specialiseren. Hoge concentraties kunnen in stand worden gehouden. Niet door nieuwe lozingen, maar door per OMV (klasse) een combinatie aan redoxcondities en vaste/vloeibare stof (ZD of TSS) aan te houden. Adsorptietechnieken, zoals actief kool (AK) of zeolieten, kunnen verwijdering verbeteren [13], ook in combinatie met biofilms (bijv. algen). Dit omdat ze stoffen concentreren en daarmee 'pockets' aan activiteit creëren [14] en OMV's (makkelijker) omzetten.

Het concentreren van stoffen gaat in tegen de tweede hoofdwet van de thermodynamica: entropie (wanorde) neemt af. Een daaruit verbeterde afbraak gaat gepaard met kosten, die tevoorschijn komen bij, bijvoorbeeld, het onderhouden van een biofilm of het afvangen of verwerken van groeiende biomassa. Algen zijn een goedkoper alternatief voor oxygenering van afvalwater. Naast algen kunnen bestaande installaties worden geïmplementeerd met zonlicht (of geavanceerde oxidatie) als zuiveringstechniek. Dit stimuleert afbraak via reactieve zuurstofverbindingen (zogenoemde 'ROS'), terwijl het ook de temperatuur verhoogt. Als natuurlijke buffers stabiliseren/verlagen algen de pH doordat ze CO<sub>2</sub> opnemen. 'Ingrepen' in CO<sub>2</sub>-uitstoot zijn ook relevant vanwege het doel de EU in 2050 klimaatneutraal te maken.

Veranderingen in RWZI-werking beïnvloeden ook het biochemisch zuurstofverbruik (BOD) en kunnen voor toxiciteit zorgen via productie van metabolieten. Afbraak vergroot de CO<sub>2</sub>-voetafdruk via broeikasgassen. Per jaar komt ongeveer 140 ton aan farmaceutische stoffen in Nederlandse watersystemen terecht, wat na acclimatie en afbraak jaarlijks 140 ton CO<sub>2</sub> oplevert (bij een elementenverhouding van 1:1). Aangezien farmaceutica ongeveer 20 procent van de totale stoffen uitmaken [15], is de lozing (140x5=) 700 ton, ongeveer 0.5% van de totale uitstoot van waterschappen [16]. In termen van CO<sub>2</sub> niet zorgwekkend, zodat afbraak (en aankoop CO<sub>2</sub>-emissierechten) is geoorloofd. Gelet op de exponentiele stijgingen (afbeelding 1), zullen OMV's urgenter worden. Een gecoördineerde aanpak op continentale schaal op basis van emissies en beschikbaarheid zal leidend zijn.

## Conclusie

Bovenstaande studies bieden de onderzoekers een raamwerk om biologische afbraaksnelheden te berekenen. Deze zijn getest en zijn implementeerbaar in populaire SimpleTreat/Box-modellen. De toekomstverwachting is dat de resultaten, geïmplementeerd in modellen als SimpleTreat, een betere risico-inschatting (door bijvoorbeeld het RIVM) zullen bewerkstelligen. De studies in het CER-CEC-project dragen bij aan een beter begrip van het lot en afbraak van bestaande en opkomende chemicaliën. Daaruit vloeit advies voort voor verdere modelverbetering en een rendabele optimalisatie van de biologische afbraak. Dit advies bestaat uit het gecontroleerd aanpassen van RWZI-omstandigheden, zodat effectieve concentraties van OMV's (lokaal) gedurende langere tijd worden verhoogd en/of hoog worden gehouden. Bijvoorbeeld in parallelsystemen of tanks, of via adsorptie aan AK. Deze aanpassingen zijn OMV-specifiek en OMV-klasespecifiek.

## Referenties

1. Schwarzenbach, R.P. et al. (2006). 'The challenge of micropollutants in aquatic systems'. *Science*, 2006. **313**(5790): p. 1072-7.
2. Schaible, C. (2020). *EU Industrial Strategy for Achieving the 'Zero Pollution' Ambition Set with the EU Green Deal (Large Industrial Activities)*. Brussels: European Environmental Bureau.
3. European Communities (2008). 'Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council'. *Off. J. Eur. Comm.*, 14.
4. Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern B. (2015). 'A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring'. *Water Research*, **72**: p. 3-27.
5. Rios-Miguel, A.B. et al. (2022). 'Microbial paracetamol degradation involves a high diversity of novel amidase enzyme candidates'. *BioRxiv*.
6. Evenblij, H., Schuman, E., Kuiper, M. (2020). 'Verwijderingsrendementen van medicijnresten op 18 rwzi's. Waterschap Drents Overijsselse Delta (WDOD) database'. *H2O Water Matters*, 2020. 28-31.
7. Rios-Miguel, A.B., Jetten, M.S.M., Welte, C.U (2021). 'Effect of concentration and hydraulic reaction time on the removal of pharmaceutical compounds in a membrane bioreactor inoculated with activated sludge'. *BioRxiv*.
8. Nolte, T.M., et al. (2018). 'Quantitative structure-activity relationships for primary aerobic biodegradation of organic chemicals in pristine surface waters: starting points for predicting biodegradation under acclimatization'. *Environmental Science-Processes & Impacts* **20**(1): p. 157-170.
9. Nolte, T.M., et al. (2022). 'Robust calculus for biodegradability in wastewater generalized across thousands of chemicals and conditions'. *Environmental Science and Technology*. In Review.
10. Alexander, M. (1975). 'Environmental and microbiological problems arising from recalcitrant molecules'. *Microb. Ecol.* **2**(1): p. 17-27.
11. Haber, F. (1924). *Zur Geschichte des Gaskrieges. In Fuenf Vortraege aus den Jahren 1920 – 1923*. Julius Springer, Berlin. p. 76–92.
12. Rios Miguel, A.B.(2021). *PhD Thesis. Microbiology*. 2022, Radboud University: Nijmegen.
13. Gorodylova, N., et al. (2021). 'Modified zeolite-supported biofilm in service of pesticide biodegradation'. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **28**(33): p. 45296-45316.
14. Piai, L., et al. (2020). 'Biodegradation and adsorption of micropollutants by biological activated carbon from a drinking water production plant'. *J. Hazard. Mater.*, **388**: p. 122028.
15. Golovko, O., et al. (2021). 'Occurrence and removal of chemicals of emerging concern in wastewater treatment plants and their impact on receiving water systems'. *Science of The Total Environment*, **754**(142122).
16. Arcadis (2021). *Klimaatmonitor Waterschappen Verslagjaar 2020 Unie van Waterschappen*. AS3-Public. Unie van Waterschappen, Den Haag.