

# VERKENNENDE MONITORING VAN HORMOONVERSTORENDE STOFFEN EN PATHOGENEN OP RWZI'S MET AANVULLENDE ZUIVERINGSTECHNIEKEN



RAPPORT

2005  
32

VERKENNENDE MONITORING VAN HORMOONVERSTORENDE  
STOFFEN EN PATHOGENEN OP RWZI'S MET AANVULLENDE  
ZUIVERINGSTECHNIEKEN

RAPPORT

2005

32

ISBN 90.5773.320.x



stowa@stowa.nl www.stowa.nl  
TEL 030 232 11 99 FAX 030 232 17 66  
Arthur van Schendelstraat 816  
POSTBUS 8090 3503 RB UTRECHT

Publicaties van de STOWA kunt u bestellen bij:  
Hageman Fulfilment POSTBUS 1110, 3300 CC Zwijndrecht,  
TEL 078 623 05 00 FAX 078 623 05 48 EMAIL info@hageman.nl  
onder vermelding van ISBN of STOWA rapportnummer en een afleveradres.

# COLOFON

Utrecht, 2006

UITGAVE STOWA, Utrecht

## AUTEURS

ir. J.G.M. Derksen (Grontmij | Aquasense)  
dr.ir. E.J.T.M. Leenen (Grontmij)  
dr.ir. J.H. Roorda (Grontmij)

## BEGELEIDINGSCOMMISSIE

ir. M.M.A. Bentvelsen (Hoogheemraadschap van Delfland)  
ing. A. Hammenga (Waterschap Hunze en Aa's)  
ir. E. Majoor (Waterschap Velt en Vecht)  
ing. G.B.J. Rijs (RIZA)  
ir. C.A. Uijterlinde (STOWA)  
dr. ir. S.R. Weijers (Waterschap de Dommel)  
drs. A.C.L. Withagen (Waterschap Hollandse Delta)

## FOTO'S OMSLAG

Zandfiltratie RWZI Steenwijk (Waterschap Reest&Wieden, Meppel)  
Luchtfoto RWZI Utrecht (Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, Houten)  
Inwendig onderzoek forel (Grontmij Aquasense, Amsterdam)

DRUK Kruyt Grafisch Advies Bureau

STOWA rapportnummer 2005-32  
ISBN 90.5773.320.X

# TEN GELEIDE

De afgelopen tijd staan hormoonverstorende stoffen geregeld in de belangstelling. Uit diverse onderzoeken is naar voren gekomen dat de emissie van hormoonverstorende stoffen vanuit de rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) een aanzienlijk aandeel kan leveren in de totale emissie. Bij vissen in het ontvangende oppervlaktewater zijn oestrogene effecten aangetoond, vooral in regionale wateren waar het RWZI-effluent op een relatief klein oppervlaktewater wordt geloosd. Op RWZI's zou een aanvullende zuiveringstechniek een bijdrage kunnen leveren aan de reductie van de emissie van deze stoffen vanuit de RWZI's. Uit een voorbereidende literatuurstudie is naar voren gekomen dat nog onvoldoende bekend is over de effectiviteit van aanvullende zuiveringstechnieken (STOWA, 2003).

In dit verkennende onderzoek is op een achttal RWZI's gemeten aan hormoonverstorende stoffen. De onderzochte nageschakelde technieken zijn zandfilters, een actief koolfilter, helofytenfilters en een nageschakelde MembraanBioReactor (MBR). Naast de conventionele RWZI's is ook gemeten aan een MBR.

Naast hormoonverstorende stoffen zijn ook pathogenen gemeten. Pathogenen staan in de belangstelling vanwege de nieuwe Europese Zwemwaterrichtlijn, waarin de normen voor bacteriologische kwaliteit zijn aangescherpt. In aanvulling op de reeds genoemde zuiveringstechnieken is ook een RWZI met UV-desinfectie bemonsterd.

Het doel van dit verkennende onderzoek is om een idee te krijgen van de mogelijkheden van nageschakelde zuiveringstechnieken en een MBR om hormoonverstorende stoffen en pathogenen te verwijderen.

Utrecht, februari 2006  
de directeur van STOWA, ir. J.M.J. Leenen

# SAMENVATTING

## ALGEMEEN

Uit onderzoeken is naar voren gekomen dat de emissie van hormoonverstorende stoffen vanuit de rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) een aanzienlijk aandeel leveren in de totale emissie. Vooral in regionale wateren waar het RWZI-effluent op een relatief klein oppervlaktewater wordt geloosd, zijn in het ontvangende oppervlaktewater bij mannelijke vissen oestrogene effecten aangetoond. Op RWZI's kan een aanvullende zuiveringstechniek een bijdrage leveren aan de reductie van emissie van deze stoffen. In een voorbereidende literatuurstudie is naar voren gekomen dat nog onvoldoende bekend is over de effectiviteit van aanvullende zuiveringstechnieken. Om deze reden is op een achttal RWZI's een verkennend monitoringsonderzoek naar hormoonverstorende stoffen uitgevoerd. Daarnaast zijn in dezelfde meetcampagne enkele (indicatoren voor) fecale verontreinigingen en pathogene micro-organismen meegenomen. Pathogenen zijn van belang vanwege de aangescherpte Europese Zwemwaterrichtlijn.

Het doel van het onderzoek is te verkennen wat de effectiviteit van een aantal aanvullende zuiveringstechnieken is op RWZI's ten aanzien van hormoonverstorende stoffen en pathogenen. In dit onderzoek zijn de volgende aanvullende zuiveringstechnieken bemonsterd: zandfiltratie, actief koolfiltratie, nageschakelde membraanbioreactor, UV-desinfectie en helofytenfiltratie. Daarnaast is als op zichzelf staand zuiveringsconcept gemeten aan een membraanbioreactor.

## HORMOONVERSTORENDE STOFFEN

De monitoring is gericht op de stofgroepen die de grootste bijdrage leveren aan het vrouwelijkende (oestrogene) effect: natuurlijke vrouwelijke hormonen, synthetische hormonen uit 'de pil' en nonylfenolen en nonylfenol-ethoxylaten (industriële reinigingsmiddelen). Daarnaast is de totale oestrogene activiteit bepaald volgens de methode van de ER-calux assay,

De in dit onderzoek gemeten concentraties en oestrogene activiteit in het influent van de RWZI, het effluent van de RWZI en het effluent van de aanvullende zuiveringstechnieken, liggen binnen ranges die in andere onderzoeken zijn gevonden. Het blijkt dat door geen van de onderzochte aanvullende zuiveringstechnieken alle oestrogene activiteit wordt verwijderd. Op stofniveau worden in het RWZI-effluent oestron en nonylfenol(ethoxylat)en regelmatig en 17 $\beta$ -oestradiol incidenteel aangetroffen. De andere stoffen worden in het RWZI-effluent niet of nauwelijks meer gedetecteerd.

Een extra verwijdering van hormoonverstorende stoffen is in dit onderzoek aangetoond bij nabehandeling door een actief koolfilter en door een nageschakelde MBR. Ook de 'gewone' MBR laat in vergelijking met een conventionele RWZI een grotere reductie van deze stoffen zien. Zandfiltratie geeft een wisselend resultaat met zowel een toename als een afname van de concentraties en de oestrogene activiteit. Het horizontaal doorstroomd helofytenfilter laat een stijging zien, die veroorzaakt wordt door uitwerpselen van vogels. Het verticaal doorstroomd helofytenfilter liet in dit onderzoek wel een verdere reductie van de stoffen zien.

De gevonden restconcentraties (ook na aanvullende zuivering) zijn milieurelevant. In het RWZI-effluent is de bijdrage aan de oestrogene activiteit vooral afkomstig van de natuurlijke hormonen oestron en  $17\beta$ -oestradiol en in mindere mate van de industriële detergent nonylfenol. Ook sterk hormoonverstorende stoffen die in een concentratie lager dan de detectielimiet aanwezig zijn (m.n.  $17\alpha$ -ethinyloestradiol, het actieve bestanddeel uit 'de pil') kunnen een bijdrage leveren.

### PATHOGENEN

Er zijn twee indicatoren voor fecale verontreiniging, te weten *Escherichia coli* en intestinale enterococci, gemeten alsmede een indicator voor het gedrag van virussen, namelijk bacteriofagen. In het influent van de RWZI's zijn hoge aantallen indicatoren gevonden. Het gevonden rendement van de RWZI is 2-5 log-eenheden. Het extra rendement van de meeste aanvullende zuiveringstechnieken is groter dan 1-2 log-eenheden. De resultaten van de zandfiltratie zijn niet eenduidig (zowel een toename als een afname is gevonden). De in dit onderzoek bemonsterde UV-installatie laat een beperkte reductie van micro-organismen zien.

Om het effluent van een RWZI te laten voldoen aan de nieuwe normen van de Europese Zwemwaterrichtlijn voor oppervlaktewater is een verwijdering van minimaal 4 log-eenheden nodig (rendement minimaal 99,99%), op basis van de concentraties in het influent van RWZI's. Uit het hier gepresenteerde (indicatieve) onderzoek blijkt dat het effluent van het actief koolfilter, het verticaal doorstroomd helofytenfilter, de nageschakelde MBR en de MBR voldoen aan de normen in de nieuwe Europese Zwemwaterrichtlijn. Als nageschakelde zuiveringsstap is zandfiltratie niet voldoende om de norm te halen. Bij een verbeterd ontwerp van de UV-installatie (dosis, intensiteit en contacttijd) zal de norm waarschijnlijk wel gehaald worden.

In de helofytenfilters is naast deze indicatoren ook de pathogeen *Campylobacter* gemeten, die in vogelpoep wordt gevonden. In het horizontaal doorstroomd helofytenfilter is een aanzienlijke toename van *Campylobacter* gevonden, wat samenhangt met de aanwezigheid van vogels. In het verticaal doorstroomd helofytenfilter, met een geringere aanwezigheid van vogels, is een afname ten opzichte van de *Campylobacter* waarden in het RWZI-effluent gevonden.

### AANBEVELINGEN

De gemeten oestrogene reactiviteit in het RWZI-effluent en ook na aanvullende zuivering is nog steeds milieurelevant. Daarom is meer aandacht voor de effectiviteit van aanvullende zuiveringstechnieken voor het verwijderen van oestrogene activiteit gewenst. Daarbij wordt aanbevolen om in eerste instantie de totale oestrogene activiteit te meten (bijvoorbeeld door middel van de ER-calux assay). Pas bij de noodzaak voor meer detailinformatie zouden de individuele stoffen gemeten kunnen worden, waarbij de belangrijkste bijdrage aan de oestrogene activiteit geleverd wordt door  $17\beta$ -oestradiol, oestron en mogelijk  $17\alpha$ -ethinyloestradiol. Aansluiting bij lopende onderzoeksprogramma's naar vergaande zuivering op RWZI's wordt aanbevolen.

Over de rol van zwevende stof in relatie tot de hormoonverstorende stoffen is onvoldoende bekend. Onderzoek geeft zowel een prominente rol als een ondergeschikte rol aan. Omdat de rol van slib van belang is voor de effectiviteit en de keuze van een nageschakelde zuiveringstechniek, verdient dit aspect nader onderzoek.

Praktijkervaring met en kennis over desinfectie van RWZI-effluent is in Nederland nog schaars. In het licht van de Europese Zwemwaterrichtlijn wordt aanbevolen om een inventariserende studie uit te voeren waarin gerealiseerde projecten met desinfectietechnieken voor de behandeling van RWZI-effluent in kaart worden gebracht. In een dergelijke studie moet aandacht zijn voor de verbetering van de bacteriologische kwaliteit, het onderhoud, de kosten en andere aspecten.

# DE STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. Dat zijn alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen en de provincies.

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van inventarisaties van de behoefte bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstituten en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, zonodig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n zes miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: 030 -2321199.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 8090, 3503 RB Utrecht.

Email: [stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl).

Website: [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl)



# SUMMARY

## GENERALLY

From research it became clear that emissions of endocrine disrupting chemicals (EDC's) from wastewater treatment plants (wwtp's) significantly contribute to the total emission of these components. Especially in the regional situation where effluent of wwtp's is discharged on relatively small surface waters, estrogenic effects are demonstrated at male fish. Additional treatment of effluent from a wwtp may contribute to a reduction in the emission of these components. In a preparatory literature study, it appeared that there is insufficient knowledge about the efficiency of additional treatment. For this reason a tentative monitoring research was carried out to study the removal efficiency for EDC's at eight wwtp's in the Netherlands. In the same measuring campaign, attention was paid to a few faecal contaminations (indicators) and pathogenic micro-organisms. Pathogens are of importance because of the accentuated European Bathing Water Directive.

The research objective was to investigate the effectiveness of additional treatment technologies with regard to EDC's and pathogens. The following treatment technologies were subjected to research: rapid sand filtration, activated carbon filtration, a membrane bioreactor, post-treatment with a membrane bioreactor, UV-disinfection and a constructed wetland.

## ENDOCRINE DISRUPTING COMPONENTS

Measurements were carried out on (groups of) compounds that are related to feminisation (estrogenic effects): natural feminine hormones, synthetic hormones from 'the pill' and substances from industrial cleaning products (nonylphenol(ethoxylat)en). Next to this, the total estrogenic activity was determined by carrying out the ER-calux assay.

The concentrations of EDC's and the ER-calux in raw sewage, wwtp-effluent and treated wwtp-effluent were in the same range as found by other researchers. None of the additional treatment techniques was able to remove all the estrogenic activity. Frequently detected components were estrone and nonylphenol(ethoxylat)en and in some samples also 17 $\beta$ -oestradiol was found. All other substances could hardly be detected in the wwtp-effluent.

An additional removal of EDC's was found by the activated carbon filtration and the post-treatment of the wwtp-effluent by a MBR. In comparison to the conventional wwtp, shows the 'normal' MBR an larger reduction of EDC's. The rapid sand filtration shows varying results, with sometimes an increase and sometimes a decrease of estrogenic activity. The horizontal constructed wetland showed an increase, due to excrements of birds. The vertically flushed wetland showed a decrease of EDC's.

The concentrations of EDC's after additional treatment of wwtp-effluent are relevant to the environment. The estrogenic activity of the wwtp-effluent is mainly due to the natural hormones estrone and 17 $\beta$ -oestradiol and to a smaller extent to the industrial detergent nonylfenol. A significant part of the estrogenic activity might also be related to components that could not be detected above the detection limit, especially 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol (the pill).

### **PATHOGENS**

Two indicators for faecal contamination have been measured, namely *Escherichia coli* and intestinal enterococci, as well as an indicator for viruses, bacteriophages. High concentrations have been found in the raw wastewater. The wwtp shows a 2-5 LOG removal, the additional removal by advanced treatment steps is 1-2 LOG units. The removal efficiency of rapid sand filtration varied. Next, the UV-installation showed a limited removal efficiency of microorganisms.

For the European Bathing Water Directive, the removal efficiency of pathogens in wwtp-effluent should be more than 4 LOG units. In this research, such a removal efficiency was found for activated carbon filtration, vertically flushed constructed wetland, and the MBR systems. The rapid sand filtration itself was insufficient for the removal of at least 4 LOG units. An improvement of the design of the UV disinfection system (dose, intensity and contacttime) will result in the needed removal efficiency.

The pathogen *Campylobacter* was found in the constructed wetlands, which relates to excrements of birds. Especially in the horizontally flushed system, the amounts were relatively high. The vertically flushed system showed a decrease in *Campylobacter*, due to less birds around.

### **RECOMMENDATIONS**

The measured estrogenic rest activity in wwtp-effluent, also after additional treatment of effluent, is still relevant for the environment. Therefore more research is desirable into the effectiveness of additional treatment technologies for the removal of endocrine disrupting components. It is recommended start measuring by determining the total estrogenic activity (e.g. via the ER-calux assay). When based on this result the necessity for more detail information is required, individual components might be measured. It was shown that the most significant contribution to the estrogenic activity is caused by 17 $\beta$ -oestradiol, estrone and possibly 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol. Affiliation with on-going research, towards additional treatment at wwtp's, is recommended.

Insufficient information became available about the role of suspended solids in relation to EDC's. This research presents a prominent role, as well as an inferior role. Because suspended solids are an important factor for the efficiency and the selection of an additional treatment process, this aspect needs further research.

Practical experience with and knowledge about disinfection of wwtp-effluent is scarce in the Netherlands. In the light of the European Bathing Water Directive it is advised to perform an inventory study in which realised projects with disinfection techniques for the treatment of wwtp-effluent are summarised. In such a study, attention has to be paid to the improvement of the bacteriologic quality, maintenance, costs and other aspects.

# STOWA IN BRIEF

The Institute of Applied Water Research (in short, STOWA) is a research platform for Dutch water controllers. STOWA participants are ground and surface water managers in rural and urban areas, managers of domestic wastewater purification installations and dam inspectors. In 2002 that includes all the country's water boards, the provinces and the State.

These water controllers avail themselves of STOWA's facilities for the realisation of all kinds of applied technological, scientific, administrative-legal and social-scientific research activities that may be of communal importance. Research programmes are developed on the basis of requirement reports generated by the institute's participants. Research suggestions proposed by third parties such as centres of learning and consultancy bureaux, are more than welcome. After having received such suggestions STOWA then consults its participants in order to verify the need for such proposed research.

STOWA does not conduct any research itself, instead it commissions specialised bodies to do the required research. All the studies are supervised by supervisory boards composed of staff from the various participating organisations and, where necessary, experts are brought in.

All the money required for research, development, information and other services is raised by the various participating parties. At the moment, this amounts to an annual budget of some six million euro.

For telephone contact STOWA's number is: +31 (0)30-2321199.

The postal address is: STOWA, P.O. Box 8090, 3503 RB, Utrecht.

E-mail: [stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl).

Website: [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl).

# VERKENNENDE MONITORING VAN HORMOONVERSTORENDE STOFFEN EN PATHOGENEN OP RWZI'S MET AANVULLENDE ZUIVERINGSTECHNIEKEN

## INHOUD

|          |  |          |
|----------|--|----------|
|          | TEN GELEIDE  |          |
|          | SAMENVATTING   |          |
|          | STOWA IN HET KORT  |          |
|          | SUMMARY  |          |
|          | STOWA IN BRIEF   |          |
| <b>1</b> | <b>INLEIDING</b>   | <b>1</b> |
|          | 1.1 Achtergrond en doelstelling                                | 1        |
|          | 1.2 Leeswijzer   | 2        |
| <b>2</b> | <b>VERWACHTINGEN OP BASIS VAN DE LITERATUUR</b>                | <b>3</b> |
|          | 2.1 Hormoonverstorende stoffen                                 | 3        |
|          | 2.2 Pathogenen   | 4        |
| <b>3</b> | <b>ONDERZOEKSOPZET</b>   | <b>6</b> |
|          | 3.1 Uitgangspunten   | 6        |
|          | 3.2 Selectie van parameters                                    | 7        |
|          | 3.2.1 Routinematige metingen                                   | 7        |
|          | 3.2.2 Selectie van hormoonverstorende stoffen                  | 7        |
|          | 3.2.3 Effectmeting   | 8        |
|          | 3.2.4 Selectie van (indicatoren voor) pathogenen               | 8        |
|          | 3.3 Beschrijving onderzochte RWZI's                            | 9        |
|          | 3.4 Selectie monsterpunten                                     | 10       |
|          | 3.5 Monstername protocol                                       | 10       |
|          | 3.6 Analysemethoden  | 11       |
|          | 3.6.1 Natuurlijke en synthetische hormonen en bisfenol A       | 11       |
|          | 3.6.2 Nonylfenol(ethoxylat)en                                  | 12       |
|          | 3.6.3 ER-calux assay   | 12       |
|          | 3.6.4 Indicatoren voor fecale verontreiniging en Campylobacter | 13       |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>4</b>   | <b>RESULTATEN HORMOONVERSTOORDERS</b>                            | <b>14</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Natuurlijke hormonen, synthetische hormonen en bisfenol A</b> | <b>14</b> |
|            | 4.1.1 Natuurlijke en synthetische hormonen                       | 15        |
|            | 4.1.2 Bisfenol A   | 16        |
| <b>4.2</b> | <b>Nonylfenolen en nonylfenoethoxylaten</b>                      | <b>17</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Gemeten oestrogene activiteit (ER-calux assay)</b>            | <b>20</b> |
| <b>5</b>   | <b>RESULTATEN (INDICATOREN VOOR) PATHOGENEN</b>                  | <b>23</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Algemeen</b>  | <b>23</b> |
| <b>5.2</b> | <b>E. coli en intestinale enterococcen</b>                       | <b>23</b> |
| <b>5.3</b> | <b>F-specifieke bacteriofagen</b>                                | <b>24</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Campylobacter</b>   | <b>25</b> |
| <b>5.5</b> | <b>Resultaten per zuivering</b>                                  | <b>26</b> |
|            | 5.5.1 Indicatoren voor pathogenen                                | 26        |
|            | 5.5.2 Campylobacter  | 28        |
| <b>6</b>   | <b>DISCUSSIE</b>   | <b>29</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Hormoonverstoorders</b>                                       | <b>29</b> |
|            | 6.1.1 Resultaten RWZI's en vergaande zuiveringstechnieken        | 29        |
|            | 6.1.2 Betekenis restconcentraties                                | 31        |
|            | 6.1.3 Verantwoordelijke stoffen                                  | 32        |
|            | 6.1.4 Vergelijking theoretische en gemeten activiteit            | 33        |
|            | 6.1.5 Vergelijking met andere onderzoeken                        | 34        |
| <b>6.2</b> | <b>Indicatoren voor fecale verontreiniging en pathogenen</b>     | <b>36</b> |
|            | 6.2.1 De herziene Europese zwemwaterrichtlijn                    | 36        |
|            | 6.2.2 Campylobacter en F-specifieke bacteriofagen                | 38        |
|            | 6.2.3 Verwijderingsrendement                                     | 39        |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN</b>                               | <b>40</b> |
| <b>7.1</b> | <b>Conclusies</b>  | <b>40</b> |
| <b>7.2</b> | <b>Aanbevelingen</b>   | <b>42</b> |
| <b>8</b>   | <b>LITERATUUR</b>  | <b>44</b> |

BIJLAGE 1 Voorselectie hormoonverstorende stoffen voor monitoring RWZI's

BIJLAGE 2 Monsternamprotocol en schema RWZI's + overzicht bemonstering

BIJLAGE 3 Analysemethode hormonen en bisfenol A

BIJLAGE 4 Analysemethode nonylfenol(ethoxylat)en

BIJLAGE 5 Analysemethode ER-calux assay

BIJLAGE 6 Resultaten hormoonverstorende stoffen

BIJLAGE 7 Resultaten pathogenen

BIJLAGE 8 Resultaten reguliere bemonstering op RWZI's

BIJLAGE 9 Samenvatting onderzoek Waterschap Reest en Wieden - overgenomen uit H<sub>2</sub>O

# 1

## INLEIDING

### 1.1 ACHTERGROND EN DOELSTELLING

Uit verschillende onderzoeken in de afgelopen jaren is naar voren gekomen dat hormoonverstorende stoffen<sup>1</sup> effecten kunnen veroorzaken bij organismen in het oppervlaktewater. Zo is van bepaalde stoffen aangetoond dat zij bij mannelijke vissen vrouwelijke kenmerken teweeg kunnen brengen. Hormoonverstorende stoffen komen voor een belangrijk deel via effluënten van RWZI's in het oppervlaktewater terecht (Vethaak *et al.*, 2002; Gerritsen *et al.*, 2003).

Hormoonverstorende stoffen staan volop in de belangstelling. In STOWA-verband zijn in de afgelopen jaren verschillende onderzoeken uitgevoerd om inzicht te ontwikkelen in de aard en omvang van deze problematiek in de Nederlandse wateren. In 2003 verscheen de literatuurstudie van STOWA, "Verwijdering van hormoonverstorende stoffen in RWZI's", waarin een overzicht wordt gegeven van de verwijdering van hormoonverstorende stoffen in conventionele en geavanceerde zuiveringssystemen in het licht van de huidige en toekomstige Nederlandse zuiveringspraktijk. Vervolgens is een prioriteitenlijst opgesteld die gebruikt kan worden bij het monitoren van hormoonverstorende stoffen in oppervlaktewater (STOWA, 2004). Het hier gepresenteerde onderzoek is de vervolgstap die als doel heeft om inzicht te verkrijgen in het verwijderingsrendement van nageschakelde technieken. Daartoe is een verkennend monitoringsonderzoek uitgevoerd bij een achttal Nederlandse RWZI's waar ook één of meerdere extra zuiveringsstappen zijn geïnstalleerd. De resultaten van dit monitoringsonderzoek zijn in de onderhavige rapportage beschreven.

Daarnaast is de mogelijkheid onderzocht om in dezelfde bemonsteringsronde het vóórkomen van pathogenen in influenten en effluent, alsmede de verwijderingsrendementen van de verschillende zuiveringsstappen, indicatief te berekenen. Deze groep stoffen staat in de belangstelling vanwege de nieuwe Europese zwemwaterrichtlijn (Bronnda, 2003). Besloten is om in dit monitoringsonderzoek enkele (indicatoren voor) fecale verontreiniging en pathogenen mee te nemen. Als in deze rapportage wordt gesproken over pathogenen, worden tevens indicatororganismen voor pathogenen bedoeld.

Dit onderzoek is uitgevoerd bij verschillende RWZI's. Ook zijn diverse zuiveringssystemen betrokken die in de belangstelling staan voor het bereiken van een verbeterde effluentkwaliteit. Deze RWZI's zijn voorzien van een extra zuiveringsstap: zandfiltratie, actief kool filtratie (korrelkool), membraanfiltratie, helofytenfiltratie en UV-desinfectie. Tenslotte is ook een Membraanbioreactor (pilotinstallatie) in het onderzoek meegenomen. De doelstelling van het onderzoek is te bepalen in hoeverre de aanvullende zuiveringstechnieken een verbetering van de effluentkwaliteit ten aanzien van hormoonverstorende stoffen en pathogenen kunnen bewerkstelligen.

<sup>1</sup> Hormoonverstorende stoffen worden internationaal EDC's (Endocrine Disrupting Chemicals) genoemd.

## 1.2 LEESWIJZER

In hoofdstuk 2 wordt ingegaan op hetgeen reeds bekend is uit de literatuur over het gedrag van hormoonverstorende stoffen in RWZI's en de verwachtingen die er bestaan ten aanzien van vergaande zuiveringstechnieken.

In hoofdstuk 3 wordt de onderzoeksopzet toegelicht. Er wordt onder andere ingegaan op de karakteristieken van de onderzochte zuiveringen, de keuze van stoffen, (indicatoren voor) pathogenen en andere parameters als ook de voorbehandeling, opwerking en analyse van de monsters.

In hoofdstuk 4 worden de resultaten van de meting van hormoonverstoorders besproken en kort bediscussieerd, in hoofdstuk 5 die van de (indicatoren voor) pathogenen. Om in de hoeveelheid gegevens het overzicht te kunnen bewaren, zijn de resultaten puntsgewijs gegeven. Een uitgebreide samenvattende bespreking van de resultaten is in hoofdstuk 6 gegeven. Ter verduidelijking is een deel van de resultaten grafisch weergegeven. In de bijlagen zijn alle resultaten uit de monitoring terug te vinden.

Vanuit de meer puntsgewijze bespreking van de belangrijkste bevinding is in hoofdstuk 6 een integrale bespreking van de resultaten te vinden. De betekenis en consequenties van de resultaten worden in dit hoofdstuk bediscussieerd. Ook wordt een vergelijking gegeven van de resultaten met de uitkomsten van vergelijkbaar onderzoek.

Tenslotte worden in hoofdstuk 7 de belangrijkste conclusies en aanbevelingen van deze studie weergegeven.

## 2

# VERWACHTINGEN OP BASIS VAN DE LITERATUUR

## 2.1 HORMOONVERSTORENDE STOFFEN

De afgelopen jaren zijn hormoonverstorende stoffen gemeten in en rond RWZI's in Nederland en daarbuiten. Een overzicht van de resultaten is gebundeld in de STOWA-rapportage 'Verwijdering van hormoonverstorende stoffen in rioolwaterzuiveringsinstallaties' (STOWA, 2003). Voor het monitoringsonderzoek is nieuwe aanvullende informatie gebruikt die in een korte aanvullende literatuurscan is geselecteerd. Belangrijke aanvullende resultaten komen uit het eindrapport van het Europese POSEIDON project (Ternes *et al.*, 2004) waarin onder andere onderzoek is verricht naar de verwijdering van oestrogenen in RWZI's, soms met aanvullende zuivering. Ook de resultaten van een uitgebreid monitoringsonderzoek in Nordrhein-Westfalen, Duitsland (Friedrich *et al.*, 2005) zijn gebruikt.

In tabel 2.1 wordt een overzicht gepresenteerd van gepubliceerde concentraties van de stoffen die in het hier gepresenteerde monitoringsonderzoek ook gemeten zijn. De gepubliceerde concentraties van de verschillende groepen van hormoonverstorende stoffen blijken zich binnen een forse bandbreedte te bevinden. De verwijderingsrendementen voor RWZI's variëren ook. Ten aanzien van de verwijdering van hormoonverstorende stoffen in nageschakelde technieken en de MBR zijn slechts enkele gepubliceerde resultaten te vinden. De verwijdering van hormoonverstorende stoffen in RWZI's vindt voornamelijk plaats door adsorptie aan slibdeeltjes en door biologische afbraak in de zuivering (STOWA, 2003).

TABEL 2.1

GEMIDDELDE RANGES VAN GEMETEN CONCENTRATIES VAN HORMOONVERSTORENDE STOFFEN EN ER-CALUX ASSAY IN INFLUENTEN EN EFFLUENTEN VAN NEDERLANDSE EN EUROPESE RWZI'S (STOWA, 2003)

|  |            | Influent RWZI     | Effluent RWZI      |
|--|------------|-------------------|--------------------|
| Natuurlijke vrouwelijke hormonen           |            |                   |                    |
| bisfenol A                                 | (µg/l)     | 4 – 12            | <0,3               |
| 17α-oestradiol (E2-17α)                    | (ng/l)     | 4,9 <sup>a</sup>  | <d.l. <sup>b</sup> |
| oestron (E1)                               | (ng/l)     | 44 ± 17           | 3,4 <sup>a</sup>   |
| 17β-oestradiol (E2)                        | (ng/l)     | 11 ± 8            | <d.l.              |
| oestriol (E3)                              | (ng/l)     | 72 ± 27           | 2,3 – 3            |
| Synthetische vrouwelijke hormonen (de pil) |            |                   |                    |
| Mestranol (MES)                            | (ng/l)     | n.b. <sup>c</sup> | n.b.               |
| 17α-ethinyloestradiol (EE2)                | (ng/l)     | 3 ± 0,6           | 2,6 <sup>a</sup>   |
| Nonylfenol(ethoxylat)en (NPnEO's)          |            |                   |                    |
| nonylfenol (NP)                            | (µg/l)     | <0,2 – 145        | <0,6 – 1,5         |
| nonylfenol monoethoxylaar (NP1EO)          | (µg/l)     | <0,8 – 1.850      | <1,9 – 2,2         |
| nonylfenol diethoxylaar (NP2EO)            | (µg/l)     | <0,8 – 1.850      | <1,9 – 2,2         |
| ER-calux assay                             | (ng EEQ/l) | 1,1 – 120         | 0,03 – 16          |

<sup>a</sup> mediaan, Nederland; <sup>b</sup> d.l. = detectie limiet = 1-5 ng/l; <sup>c</sup> n.b. = niet bekend



De in de (internationale) literatuur gepubliceerde verwijderingsrendementen zijn weergegeven in tabel 2.2. De verwijderingsrendementen zijn afhankelijk van de ingaande concentraties van de verschillende stoffen.

**TABEL 2.2 GEMETEN VERWIJDERINGSRENDEMENTEN VAN HORMOONVERSTORENDE STOFFEN EN ER-CALUX ASSAY OP RWZI'S, AANVULLENDE ZUIVERING (T.O.V. RWZI-EFFLUENT) EN MBR (STOWA, 2003; TERNES ET AL., 2004; FRIEDRICH ET AL., 2005))**

|  |     | RWZI     | ZF <sup>a</sup> | AK   | MF   | naMBR | UV <sup>b</sup> | helofyt | MBR  |
|--|-----|----------|-----------------|------|------|-------|-----------------|---------|------|
| Natuurlijke vrouwelijke hormonen           |     |          |                 |      |      |       |                 |         |      |
| bis fenol A (BPA)                          | (%) | 93-97    | n.b.            | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | n.b. |
| 17 $\alpha$ -oestradiol (E2-17 $\alpha$ )  | (%) | 100      | n.b.            | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | n.b. |
| oestron (E1)                               | (%) | 61 - 94  | >90             | >90  | n.b. | n.b.  | 50 - 90         | n.b.    | >90  |
| 17 $\beta$ -oestradiol (E2)                | (%) | 85 - 100 | >90             | >90  | 70   | n.b.  | >90             | n.b.    | >90  |
| oestriol (E3)                              | (%) | 95 - 97  | 50 - 90         | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | n.b. |
| Synthetische vrouwelijke hormonen (de pil) |     |          |                 |      |      |       |                 |         |      |
| Mestranol (MES)                            | (%) | n.b.     | n.b.            | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | n.b. |
| 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol (EE2)       | (%) | 19-85    | 70              | 95   | 70   | n.b.  | 10 - 50         | n.b.    | >90  |
| Nonylfenol(ethoxy)lat)en (NPnEO's)         |     |          |                 |      |      |       |                 |         |      |
| nonylfenol (NP)                            | (%) | 40-92    | n.b.            | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | 90   |
| nonylfenol monoethoxylaate (NP1EO)         | (%) | 80       | n.b.            | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | n.b. |
| nonylfenol diethoxylaate (NP2EO)           | (%) | 80       | n.b.            | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | n.b. |
| ER-calux assay                             | (%) | 90 - 95  | n.b.            | n.b. | n.b. | n.b.  | n.b.            | n.b.    | n.b. |

Afkortingen: RWZI = Effluent na nabezinking op RWZI, ZF = Zandfiltratie, AK = Aktief Kool Filtratie, MF = Micro- en Ultrafiltratie, naMBR = MembraanBioReactor nageschakeld aan nabezinking RWZI, helofyt = helofytenfilter, MBR = MembraanBioReactor.

<sup>a</sup> biologisch actief; <sup>b</sup> 100 maal hogere dosis UV dan voor desinfectie

Uit bovenstaande tabellen blijkt dat slechts beperkt data van andere metingen beschikbaar zijn. In een groot aantal studies worden metingen gepresenteerd van influent en aan effluent van RWZI's. De bandbreedte van de metingen is vaak groot, waardoor het moeilijk is om verwijderingsrendementen te berekenen. Gegevens over de verwijdering van hormoonverstorende stoffen in geavanceerde (nageschakelde) zuiveringstechnieken zijn schaars.

## 2.2 PATHOGENEN

De afgelopen decennia zijn verschillende microbiologische bepalingen gedaan in influent en effluent van RWZI's. Aanvullende zuiveringen zijn helaas wat minder vaak geanalyseerd. Indien analyses worden uitgevoerd betreft dit meestal indicatoren voor fecale verontreinigingen, bacteriofagen (bacterievirussen), protozoa (*Cryptosporidium*, *Giardia*) en humane virussen (noro-, entero-, rota- en/of reovirussen). In 2004 heeft Grontmij voor het RIZA een korte literatuurstudie over in- en effluentconcentraties van *E. coli* en intestinale enterokokken uitgevoerd om zogenaamde richtgetallen te kunnen vaststellen van deze indicatoren uit RWZI's (Grontmij, 2004; RIZA, 2005). Deze richtgetallen worden weergegeven in tabel 2.3.

**TABEL 2.3 RICHTGETALLEN VOOR INDICATOREN VOOR FECALE VERONTREINIGING (KVE/L) IN INFLUENT EN EFFLUENT VAN RWZI (GRONTMIJ, 2004)**

| Indicator                  | Influent       | range                             | Effluent       | range                           |
|----------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|---------------------------------|
| <i>E. coli</i>             | $4 \cdot 10^7$ | $5 \cdot 10^5 - >1 \cdot 10^8$    | $2 \cdot 10^5$ | $1 - 4,4 \cdot 10^5$            |
| Intestinale enterokokken   | $3 \cdot 10^5$ | $4,2 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^7$   | $1 \cdot 10^5$ | $1 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^5$   |
| therm. coli's <sup>a</sup> | $5 \cdot 10^6$ | $2,7 \cdot 10^5 - 5,2 \cdot 10^7$ | $5 \cdot 10^5$ | $8 \cdot 10^4 - 1,1 \cdot 10^6$ |

<sup>a</sup> therm. coli's = thermotolerante bacteriën van de coligroep

De efficiency van desinfectiestappen is minder vaak gerapporteerd. Indien deze gerapporteerd worden zijn vaak de kritische pathogenen bepaald en minder vaak indicatoren voor fecale verontreiniging. De meeste gegevens zijn beschikbaar uit studies voor de drinkwaterbereiding. Enkele resultaten van verwijdering van pathogenen, gemeten door het RIVM in Nederlandse RWZI's, zijn samengevat in tabel 2.4. In tabel 2.5 zijn de door het RIVM gerapporteerde rendementen van zuiveringsprocessen in de drinkwaterbereiding voor enkele pathogenen weergegeven. Deze getallen zijn een indicatie voor de mogelijke reductie in RWZI-effluenten, maar zijn daarvoor in Nederland niet bekend.

TABEL 2.4 GEMETEN CONCENTRATIES PATHOGENEN IN INFLUENT VAN RWZI EN ELIMINATIECAPACITEIT VAN RWZI (LODDER EN DE RODA HUSMAN, 2005)

| Micro-organisme               | Influent            | LOG-verwijdering |
|-------------------------------|---------------------|------------------|
| Virussen (pvd/l) <sup>a</sup> |                     |                  |
| F-specifieke fagen            | 10 <sup>6</sup>     | 1,6              |
| Somatische fagen              | 10 <sup>6</sup>     | 1,1              |
| Norovirussen                  | 2 · 10 <sup>5</sup> | 1,8              |

<sup>a</sup> pvd/l= plaquevormende deeltjes per liter

TABEL 2.5 ELIMINATIECAPACITEIT VAN PATHOGENEN DOOR ZUIVERINGSPROCESSEN IN DE DRINKWATERBEREIDING (RIVM, 1996)

| Zuivering                | Micro-organisme | LOG-verwijdering | Bepalende factoren                     |
|--------------------------|-----------------|------------------|--|
| Coagulatie/snelfiltratie | Virussen        | 1 - 2            | Procesontwerp, temperatuur, coagulant  |
|                          | Cryptosporidium | 2 - 2,5          |  |
| Chloor                   | Virussen        | 2 - >4           | Concentratie, contacttijd, temperatuur |
|                          | Cryptosporidium | 0 - 2            |  |
| Langzame zandfiltratie   | Virussen        | 1,5 - >3         | Temperatuur, aanwezigheid schmutzdecke |
|                          | Cryptosporidium | 1,2 - >3,7       |  |
| Ozon                     | Virussen        | 2 - >3           | Concentratie, contacttijd, temperatuur |
|                          | Cryptosporidium | 1 - 4            |  |
| UV                       | Virussen        | 2 - 5            | Dosis, troebelheid, opgeloste stof     |
|                          | Cryptosporidium | 0 - 1            |  |
| Actief Koolfiltratie     | Virussen        | 0                |  |
|                          | Cryptosporidium | 0                |  |
| Membraan(ultra)filtratie | Virussen        | 3 - 5            | Systeemintegriteit                     |
|                          | Cryptosporidium | >4               |  |

# 3

## ONDERZOEKSOPZET

### 3.1 UITGANGSPUNTEN

Er zijn talloze stoffen die hormoonverstorend kunnen werken. Hierbij moet gedacht worden aan stoffen met een vervrouwelijkende (oestrogene) of vermannelijkende (androgene) werking. Ook zijn er stoffen die juist tegen vervrouwelijking of vermannelijking werken (anti-oestrogenen en anti-androgenen). Daarnaast is verstoring van andere hormoonsystemen zoals de schildklierhormoonhuishouding mogelijk.

De hier gepresenteerde studie is beperkt tot de vervrouwelijkende (oestrogene) stoffen. Deze groep van hormoonverstorende stoffen is verreweg het beste onderzocht. Tevens heeft de voorafgaande literatuurscan naar het gedrag van hormoonverstorende stoffen in RWZI's zich gericht op oestrogene stoffen.

De nadruk heeft bij de huidige studie vooral gelegen op de nageschakelde technieken en de vraag of deze in staat zijn de effluent concentraties verder te verlagen. Om deze reden, en omdat bekend is dat influentconcentraties sterk kunnen fluctueren, is niet voor elke zuivering het influent bemonsterd.

Uitgangspunt was alleen te meten onder omstandigheden waarin de RWZI's het grootste deel van de tijd functioneerden, om de representativiteit van het monster zo veel mogelijk te waarborgen. Dat wil zeggen dat tijdens droog weer afvoer is gemeten, hetgeen representatief is voor circa 80% van de tijd, en niet tijdens de 'first flush' na een regenbui. Daarnaast zijn alle monsterpunten tenminste tweemaal bemonsterd om de kans op toevalstreffers te verlagen.

In deze studie is een selectie gemaakt van de vervrouwelijkende (oestrogene) stoffen die vermoedelijk de belangrijkste bijdrage leveren aan het totale oestrogene effect. Om deze veronderstelling te verifiëren en omdat er ook stoffen zijn die anti-oestrogeen werken, is tevens de ER-calux assay uitgevoerd. Dit is een effectmeting, waarmee het totale oestrogene potentie van alle bekende en onbekende oestrogene en anti-oestrogene stoffen tezamen wordt bepaald.

In deze studie is gekozen om de monsternamen voor de micro-organismen niet steriel uit te voeren. Er werden schone potten gebruikt en gewerkt van schoon naar vuil water: eerst werd het effluent bemonsterd, daarna de zuiveringsstap(en) en als laatste het influent. Indien men op deze manier werkt zal er (nagenoeg) geen kruisbesmetting kunnen plaatsvinden. Tevens werd verondersteld dat indien er een besmetting met vuil water plaatsvindt dit tot hoge meetresultaten zou leiden en dit meteen waarneembaar zou zijn (1 gram feces bevat ongeveer 10 log-eenheden *E. coli*). Van belang is ook dat meteen na monsternamen het monster gekoeld (4-6 °C) bewaard en getransporteerd werd en binnen 24 uur geanalyseerd werd, zodat afsterving niet tot nauwelijks van invloed op het meetresultaat is.

Het monitoringsprogramma bestaat uit drie groepen van bepalingen te weten, namelijk:

- 1 Routinematige metingen
- 2 Hormoonverstoorders (inclusief effectmeting)
- 3 Indicatoren voor fecale verontreiniging en pathogenen

De chemische analyses zijn zoveel mogelijk in hetzelfde extract uitgevoerd. Voor de nonylfenol(ethoxylat)en was het echter noodzakelijk een andere extractiemethode toe te passen.

In de volgende paragrafen wordt het monitoringsprogramma verder uitgewerkt. De selectie van parameters wordt onderbouwd in paragraaf 3.2. Paragraaf 3.3 beschrijft de onderzochte zuiveringsinstallaties, terwijl paragraaf 3.4 ingaat op de geselecteerde monsterpunten. De opbouw van de monstercodes wordt beschreven in paragraaf 3.5. Het monsternameprotocol wordt toegelicht in paragraaf 3.6. In paragraaf 3.7 tenslotte wordt ingegaan op de analysemethoden.

## 3.2 SELECTIE VAN PARAMETERS

### 3.2.1 ROUTINEMATIGE METINGEN

Bij elke meetronde zijn een aantal routinematige metingen meegenomen ter controle van het functioneren van de RWZI. Het betreft onder andere CZV, BZV, zwevend stof,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ , NKj,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{P}_{\text{totaal}}$  en de hoeveelheid neerslag.

De monstername van de hormoonverstoorders en pathogenen is zodanig gepland dat deze samenviel met de routinematige bemonsteringen van de RWZI, die door het waterschap reeds werden uitgevoerd.

### 3.2.2 SELECTIE VAN HORMOONVERSTORENDE STOFFEN

Bij de selectie van hormoonverstorende stoffen met een oestrogene werking is uitgegaan van:

- 1 De stoffen uit de literatuurscan 'Verwijdering van hormoonverstorende stoffen in rioolwaterzuiveringen' (STOWA, 2003).
- 2 Een lijst van hormoonverstoorders die worden aanbevolen voor monitoring (STOWA, 2004).
- 3 Overige stoffen waarvan in (recente) literatuur is gebleken dat zij hormoonverstorend zijn en mogelijk relevant voor het watermilieu.

Deze eerste screening levert een lijst van 33 stoffen op (zie bijlage 1). Uit deze lijst is een verdere selectie gemaakt. Op grond van de onderstaande factoren is een afweging gemaakt (met uitzondering van de kosten) die in bijlage 1 is terug te vinden. De factoren die een rol hebben gespeeld zijn:

- Is de RWZI een relevante verspreidingsroute voor deze stof(groep)?
- Draagt de stof in belangrijke mate bij aan de totale mate van hormoonverstoring?
- Bestaat er een betrouwbare en goed gevalideerde analysemethode?
- Wat zijn de analysekosten? Is de stof bijvoorbeeld opgenomen in een analysepakket?

De gehanteerde criteria leiden tot selectie van de volgende stoffen (tussen haakjes staan veel gebruikte afkortingen voor deze stoffen):

- Natuurlijke vrouwelijke hormonen: 17 $\alpha$ -oestradiol (E2-17 $\alpha$ ), 17 $\beta$ -oestradiol (E2), oestron (E1), oestriol (E3)
- Synthetische hormonen uit 'de pil': 17  $\alpha$ -ethyniloestradiol (EE2) en mestranol (MES)
- Detergenten: de nonylfenol(ethoxylat)en, namelijk nonylfenol (NP), nonylfenolmonoethoxylaate (NPEO1), nonylfenoldiethoxylaate (NPEO2) en de som van hogere nonylfenolethoxylaten (drie tot zestien ethoxylaateketens: NPEO10).

Naast bovengenoemde stoffen wordt ook bisfenol A (BPA) gerapporteerd omdat deze stof in het analysepakket van de natuurlijke en synthetische hormonen zit. Ondanks dat de bijdrage van deze stof aan het totale oestrogene effect bij realistische milieuconcentraties verwaarloosbaar is. Recent onderzoek (Oehlmann *et al.*, 2005) heeft echter aangetoond dat slakken erg gevoelig zijn voor bisfenol A. Deze groep organismen zouden bij milieurelevante concentraties (ng/l) wél hormoonverstorende effecten kunnen ondervinden.

### 3.2.3 EFFECTMETING

De bovengenoemde stoffen zijn onder andere geselecteerd omdat zij tezamen vermoedelijk de grootste bijdrage leveren aan het totale oestrogene effect. Er kunnen echter ook nog andere, bekende of onbekende stoffen zijn die niet gemeten worden maar wel een bijdrage leveren aan het totale oestrogene effect.

Behalve de analyse van individuele stoffen is er daarom ook een effectmeting, de ER-calux assay, uitgevoerd. Met deze meting wordt de gezamenlijke oestrogene potentie van alle vrouwelijkende stoffen tezamen bepaald. In de test wordt gebruik gemaakt van een menselijk borstkankercellijn die, na de binding van stoffen aan de oestrogenen receptor, licht gaat uitzenden. Hoe meer licht wordt uitgezonden, hoe meer oestrogene stoffen aanwezig zijn in het monster. De oestrogene potentie wordt uitgedrukt in 17- $\beta$  oestradiol equivalenten.

Niet elke stof is even hormoonverstorend, of met andere woorden, niet elke stof heeft dezelfde oestrogene potentie. Van de gemeten stoffen is bekend wat hun potentie in de ER-calux assay is. Deze wordt uitgedrukt ten opzichte van 17- $\beta$  oestradiol met behulp van Estradiol Equivalent Factoren (EEFs). Aanname hierbij is dat de stoffen elkaars werking niet versterken of verzwakken. Op deze wijze kan de theoretisch verwachte oestrogene potentie in Estradiol Equivalenten (EEQs) worden berekend. Door deze te vergelijken met de in de ER-calux assay gemeten potentie, wordt het mogelijk om een inschatting te maken of er – naast de geanalyseerde, bekende oestrogenen – nog andere stoffen aanwezig zijn in de monsters die invloed hebben op de totale oestrogene activiteit zoals bepaald met de ER-calux.

Om de vergelijking tussen verwachte en gemeten oestrogene potentie zo goed mogelijk te kunnen maken is het extract voor de ER-calux assay op vrijwel dezelfde wijze gemaakt als voor de chemische analyses.

### 3.2.4 SELECTIE VAN (INDICATOREN VOOR) PATHOGENEN

Er zijn veel pathogenen (ziekteverwekkers) die aanwezig (kunnen) zijn in zuiveringen. Het is ondoenlijk al deze pathogenen afzonderlijk te meten, omdat dit arbeidsintensief, tijdrovend en duur is. Er is daarom besloten voor de praktische oplossing om indicatoren voor fecale verontreinigingen te meten. In feces zitten de meeste humane pathogenen. Er wordt in dit onderzoek vanuit gegaan dat deze indicatoren ongeveer hetzelfde gedrag in de zuiveringen vertonen als pathogenen. Gekozen is voor:

- *Escherichia coli* (*E. coli*) en intestinale enterococci. Dit zijn groepen bacteriën, die indicator zijn voor bacteriële pathogenen in feces. Deze zijn ook gekozen, omdat dit de parameters zijn waarvoor in de herziene zwemwaterrichtlijn normen zijn opgenomen;
- F-specifieke bacteriofagen. Dit zijn bacterievirussen en zijn gebruikt als indicator voor virale pathogenen (virussen).

Voor enkele zuiveringsstappen (helofytenfilter en zandfilter) is wel een pathogeen meegenomen. Dit is *Campylobacter*, een bekende verwekker van maagdarmsstoornissen. *Campylobacter* komt veel voor in feces van (water)vogels. Van helofytenfilters wordt verwacht dat deze vogels aantrekken. Door deze parameter mee te nemen wordt gekeken in hoeverre er extra vervuiling optreedt door vogels.

### 3.3 BESCHRIJVING ONDERZOCHE RWZI'S

In het onderzoek zijn RWZI's geselecteerd die qua zuiveringsconcept zo representatief mogelijk zijn voor de Nederlandse situatie. Daarnaast zijn locaties geselecteerd die van een extra zuiveringsstap zijn voorzien, deels full-scale en deels op pilot-schaal. Daarnaast is één pilot-zuivering van het concept MBR bemonsterd. De kenmerken van de RWZI's worden in algemene zin beschreven in deze paragraaf, details over de werking tijdens de monsternamedata zijn weergegeven in bijlage 8. Een schematische weergave is gegeven in bijlage 2.

TABEL 3.1 KENMERKEN VAN DE RWZI'S A, B, C/G EN D WAAR IN HET KADER VAN HET HIER BESCHREVEN ONDERZOEK IS GEMETEN (DATA 2004)

|                                 |                   | RWZI A  |              | RWZI B                               |              | RWZI C/G  |              | RWZI D  |              |
|---------------------------------|-------------------|---|--------------|--------------------------------------|--------------|---|--------------|---|--------------|
| Type                            |                   | Conventioneel zonder VBT <sup>a</sup>                   |              | Conventioneel met VBT en slibgisting |              | Conventioneel zonder VBT  |              | Conventioneel met VBT   |              |
| Nageschakeld, incl. werking     |                   | 1. UV na NBT <sup>b</sup> werkt technisch niet optimaal |              | nvt <sup>c</sup>                     |              | 1. Continu ZF <sup>d</sup> na NBT belasting 2,5-3,5 m/h<br>2. MBR (pilot) |              | 1. Continu ZF na NBT belasting 15 m/h<br>2. Verticaal helofyt na ZF |              |
| P-verwijdering                  |                   | Bio-P   |              | Bio-P + chem-P                       |              | Bio-P   |              | Chem-P  |              |
| Slibgisting                     |                   | Nee   |              | Ja                                   |              | Nee   |              | Nee   |              |
| % Industrieel                   |                   | 19 %  |              | 36 %                                 |              | 5 %   |              | 19 %  |              |
| Ontwerpbelasting                | i.e. <sup>e</sup> | 118.000   |              | 364.000                              |              | 7.800   |              | 63.200  |              |
| Huidige belasting               | i.e. <sup>e</sup> | 74.000  |              | 167.000                              |              | 3.630   |              | 50.900  |              |
| Ontwerpdebiet                   | m <sup>3</sup> /d | 33.600  |              | 44.782                               |              | 3.600   |              | 8.520   |              |
| Huidig debiet                   | m <sup>3</sup> /d | 17.478  |              | 58.320                               |              | 720   |              | 11.055  |              |
| Slibbelasting                   | g BZV/kg ds.dag   | 0,022   |              | 0,05                                 |              | 0,027   |              | 0,04  |              |
| Slibleeftijd                    | dagen             | 34  |              | 33                                   |              | 27  |              | 32  |              |
| Hydraulische verblijftijd in AT | uren              | 62  |              | 31                                   |              | 46  |              | 55  |              |
|                                 |                   | Influent  | Effluent NBT | Influent                             | Effluent NBT | Influent  | Effluent NBT | Influent  | Effluent NBT |
| CZV                             | mg/l              | 467   | 29           | 670                                  | 34           | 558   | 21           | 468   | 26           |
| BZV <sub>5</sub>                | mg/l              | 147   | 2,4          | 251                                  | 2,2          | 209   | 1            | 201   | 2            |
| N <sub>tot</sub> -N             | mg/l              | 46  | 3,1          | 53                                   | 7,1          | 5,8   | 3,3          | 44,6  | 3,2          |
| P <sub>tot</sub> -P             | mg/l              | 13  | 4,3          | 10                                   | 1,2          | 8,5   | 0,5          | 7,2   | 0,8          |
| SS                              | mg/l              | 249   | 4,8          | 290                                  | 4,2          | 234   | 3            | nb <sup>a</sup>   | 7            |

<sup>a</sup> VBT = voorbezinktank; <sup>b</sup> NBT = nabezinktank; <sup>c</sup> nvt = niet van toepassing, want meting aan rejectiewater;

<sup>d</sup> ZF = zandfiltratie; <sup>e</sup> à 136 g TZV

TABEL 3.2 KENMERKEN VAN DE RWZI'S E, F, H EN I WAAR IN HET KADER VAN HET HIER BESCHREVEN ONDERZOEK IS GEMETEN

|                                    |                   | RWZI E   | RWZI F                   | RWZI H                 | RWZI I                        |          |              |          |              |
|------------------------------------|-------------------|--|--------------------------|------------------------|-------------------------------|----------|--------------|----------|--------------|
| Type                               |                   | 2-traps RWZI zonder VBT  | Conventioneel zonder VBT | MBR zonder VBT         | Conventioneel zonder VBT      |          |              |          |              |
| Nageschakeld, <i>incl. werking</i> |                   | 1. Discontinu dubbellaags ZF na NBT<br><i>belasting 10 m/h</i><br>2. Actief Kool na ZF<br><i>EBCT<sup>a</sup> = 20 min</i> | 1. MBR na NBT            | <i>nvt<sup>b</sup></i> | 1. Horizontaal helofyt na NBT |          |              |          |              |
| P-verwijdering                     |                   | Chem-P   | Bio-P en Chem-P          | Bio-P                  | Bio-P                         |          |              |          |              |
| Slibgisting                        |                   | Ja   | Ja                       | <i>nvt</i>             | Ja                            |          |              |          |              |
| % Industrieel                      |                   | 0 %  | nb                       | nb                     | 40 %                          |          |              |          |              |
| Ontwerpbelasting                   | i.e. <sup>c</sup> | 530.000  | 250.000                  | <i>nvt</i>             | 175.000                       |          |              |          |              |
| Huidige belasting                  | i.e. <sup>c</sup> | 360.000  | 104.000                  | <i>nvt</i>             | 166.000                       |          |              |          |              |
| Ontwerpdebiet                      | m <sup>3</sup> /d | 67.200   | nb                       | <i>nvt</i>             | 35.000                        |          |              |          |              |
| Huidig debiet                      | m <sup>3</sup> /d | 63.777   | 48.848                   | 36                     | 34.800                        |          |              |          |              |
| slibbelasting                      | g BZV/kg          | 0,055  | 0,033                    | 0,028                  | 0,046                         |          |              |          |              |
| slibleeftijd                       | ds.dag<br>dagen   | 14   | 24                       | 49                     | 15,5                          |          |              |          |              |
| Hydraulische verblijftijd in AT    | uren              | 7  | 20                       | nb                     | 16                            |          |              |          |              |
|                                    |                   | Influent   | Effluent NBT             | Influent               | Effluent NBT                  | Influent | Effluent NBT | Influent | Effluent NBT |
| CZV                                | mg/l              | 562  | 33                       | 364                    | 31                            | nb       | 19           | 465      | 48           |
| BZV <sub>5</sub>                   | mg/l              | 177  | 3,6                      | 141                    | 3,1                           | 55       | nb           | 141      | 7,1          |
| N <sub>tot</sub> -N                | mg/l              | nb   | 8,3                      | 33                     | 3,8                           | 56       | 5,5          | 39       | 7,8          |
| P <sub>tot</sub> -P                | mg/l              | nb   | 0,4                      | 6,3                    | 0,7                           | 9,4      | 1,5          | 8        | 1            |
| SS                                 | mg/l              | nb   | 7                        | Nb                     | 5,5                           | 144      | 0            | 156      | 5,1          |

<sup>a</sup> EBCT = Empty Bed Contact Time; <sup>b</sup> MembraanBioReactorals totaal zuiveringsconcept; <sup>c</sup> à 136 g TZV

### 3.4 SELECTIE MONSTERPUNTEN

In bijlage 2 wordt per meetronde een overzicht gegeven van de monsters die op elke zuivering zijn genomen. In totaal zijn 61 monsters verdeeld over 8 RWZI's, 10 typen monsters en 24 verschillende meetpunten onderzocht.

Bij de selectie van monsterpunten heeft, mede uit kosten oogpunt, de nadruk vooral gelegen op de nageschakelde technieken en de vraag of deze in staat zijn de effluent concentraties verder te verlagen. Het influent is daarom niet bij alle zuiveringen bemonsterd. Verder is de UV-desinfectie niet onderzocht op hormoonverstorende stoffen omdat verwacht werd dat deze zuiveringsstap voornamelijk effect op de indicatoren voor pathogenen heeft.

De routinematige metingen aan de RWZI's zijn gecoördineerd door de waterschappen zelf. De monsters zijn op hormonen geanalyseerd door het Instituut voor Milieuvraagstukken, op nonylfenol(ethoxylat)en door de Universiteit van Amsterdam en de ER-calux is bepaald door Bio Detection Systems. De indicatoren enterococcon, E.coli, F-specifieke bacteriofagen en Campylobacter zijn geanalyseerd door het Waterlaboratorium.

### 3.5 MONSTERNAME PROTOCOL

Om de monsternamen door de medewerkers van de RWZI of het waterschap zo soepel mogelijk te laten verlopen is een monsternamenprotocol opgesteld, met daarin de achtergrond en doelstelling van het project, een omschrijving van het type metingen, het eigenlijke monsternamenprotocol, een toelichting op de monstercodes, de werkverdeling en adressen van contactpersonen. Dit monsternamenprotocol is opgenomen in bijlage 2.

De belangrijkste punten ten aanzien van de monsternamen zijn:

- Gekoelde debietproportioneel 24-uurs bemonstering bij droogweerafvoer (DWA).
- Elk monsterpunt tenminste tweemaal in de tijd bemonsteren.
- Alle monsternamen (inclusief de monsters voor de bacteriologische bepalingen) onder zo hygiënisch mogelijke omstandigheden. Van schoon naar vuil werken (van effluent naar influent).
- Opvangen van monsters in 'oude' vaten en met 'oude' slangen, d.w.z. de monstervaten en slangen *niet* schoonmaken of vervangen voor monsternamen.
- De monsterflessen voor de analyse van hormonen, nonylfenol(ethoxylaten) en de ER-calux voorspoelen met het monster om verlies van stoffen door absorptie aan de wand van de fles zo veel mogelijk te voorkomen.
- In verband met de planning van de bacteriologische bepalingen dient monsternamen bij voorkeur op maandag, dinsdag of woensdag plaats te vinden.
- Indien conserveren om welke reden dan ook nodig blijkt, worden de monsters ingevroren.

### 3.6 ANALYSEMETHODEN

#### 3.6.1 NATUURLIJKE EN SYNTHETISCHE HORMONEN EN BISFENOL A

De natuurlijke en synthetische hormonen zijn opgenomen in één analysepakket, waarin ook bisfenol A is meegenomen. In het analysepakket zijn de volgende stoffen meegenomen: 17 $\alpha$ -oestradiol (E2-17 $\alpha$ ), 17 $\beta$ -oestradiol (E2), oestron (E1), oestriol (E3), 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol (EE2), bisfenol A (BPA) en mestranol (MES).

De monstervoorbewerking voor de chemische analyse en de ER-calux assay hebben een grotendeels identieke opwerking doorlopen. Echter, voor de chemische analyse van hormonen in complexe matrices op het niveau van enkele nanogrammen per liter is het noodzakelijk om aanvullend een extra opzuiveringsstap d.m.v. een fractionering over een HPLC kolom<sup>2</sup> uit te voeren.

De monsters zijn zo snel mogelijk na binnenkomst opgewerkt. De opwerking van de monsters bestond uit een Solid Phase Extractie (SPE), gevolgd door elutie met een extractiemiddel. Het eluaat werd ingedampt en verder gezuiverd over gecombineerde C<sub>18</sub> en NH<sub>2</sub> SPE cartridges. Deze cartridges zijn opnieuw geëluëerd. Dit eluaat is gebruikt in de ER-calux assay.

De influenten en het rejectiewater zijn voorafgaand aan de SPE procedure gefilterd over een glasvezelfilter, de effluënten niet. Dit glasvezelfilter verwijdert de grove delen en voorkomt dat de SPE-disks te snel verstopt raken. Hoewel deze filtratie nodig is om analytische problemen te voorkomen, wordt hiermee een deel van de oestrogene activiteit verwijderd. Deze hoeveelheid is niet gekwantificeerd.

Voor de chemische analyse is het extract na de boven beschreven SPE procedure verder opgezuiverd door het in te dampen, op te nemen in een buffer en te fractioneren over een C<sub>18</sub> HPLC kolom. De opgevangen fractie met de hormonen is vervolgens gederivatiseerd en geanalyseerd op een GC-ITD<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> HPLC = High Performance Liquid Chromatography

<sup>3</sup> GC-ITD = Gas Chromatography with Ion Trap Detection



Voor de chemische analyse is er voor de chemische analyses gebruik gemaakt van gedeuteerde standaarden die voorafgaand aan de SPE procedure worden toegevoegd aan het monster. Hiermee is gecorrigeerd voor de recovery en heeft de uiteindelijke kwantificering plaatsgevonden.

Deze opwerkingsmethode is – op kleine aanpassingen na – ook gebruikt voor de metingen in het LOES project (Belfroid *et al.*, 1999a; Vethaak *et al.*, 2002). De detectielimieten varieerden van <0,05 tot 5 ng/l voor de hormonen en van <8,3 tot <18 ng/l voor bisfenol A. Voor meer details over de analysemethode wordt verwezen naar bijlage 3.

### 3.6.2 NONYLFENOL (ETHOXYLAT)EN

Tot de monstervoorbewerking zijn de monsters bij -20°C opgeslagen of na aanzuren met zoutzuur (HCl) tot pH 2 - 2,5 bij 4°C bewaard (zie tabel 1 in bijlage 4 voor een overzicht).

Aan de monsters zijn interne standaards toegevoegd, waarna een Solid Phase Extractie (SPE) is uitgevoerd. De cartridges zijn geëlueerd met methanol. Het eluaat is na indampen over een kolom met aluminium oxide en droog natriumsulfaat geleid en geëlueerd met methanol. Het eluaat is ingedampt en opnieuw opgelost in methanol/water (1/1 v/v). Tot slot is het extract gefiltreerd over een 0,2 µm Acrodisk filter. Dit extract is geanalyseerd met een LC-MS<sup>4</sup>.

Om verstopping van de SPE cartridges te voorkomen zijn de influenten en het rejectiewater eerst gefiltreerd. Het filtraat (de waterfase) is opgewerkt zoals hierboven beschreven. Het residu (het zwevend stof) is na toevoeging van interne standaarden gesoxhletteerd met methanol. Het extract is ingedampt waarna water is toegevoegd. De oplossing is daarna op dezelfde manier als de watermonsters opgewerkt.

De detectielimiet was 0,05 µg/l voor alle gemeten stoffen. Voor verdere details over de opwerking en analyse van de monsters wordt verwezen naar bijlage 4.

### 3.6.3 ER-CALUX ASSAY

De ER-calux assay is uitgevoerd met extracten die bereid zijn voor de analyse van hormonen (§3.6.1 en bijlage 5 voor details). De ER-CALUX assay wordt uitgevoerd met de humane borstkanker T47D cellijn waarin van nature een oestrogeen receptor aanwezig is. In de cel is een reporter gen (ERE) aangebracht, dat gekoppeld is aan het Luc gen (luciferase). Wanneer nu een oestrogeen actieve stof de cel binnendringt, zal deze aan de ER receptor binden en deze daarmee activeren. De geactiveerde receptor zal vervolgens aan het ERE binden. Als gevolg hiervan wordt een hoeveelheid luciferase aangemaakt. Dit enzym is in staat het aan de celinhoud toegevoegde luciferine te oxideren, waarbij licht vrijkomt. De hoeveelheid licht vormt een maat voor de hoeveelheid oestrogene stoffen.

Van alle extracten zijn verdunningen gemaakt in DMSO<sup>5</sup>, welke vervolgens getest zijn in de ER-calux assay. In deze assay zijn de cellen 24 uur blootgesteld aan het extract. Het percentage DMSO tijdens de blootstelling bedroeg 0,1%.

<sup>4</sup> LC-MS = Liquid Chromatography Mass Spectrometry

<sup>5</sup> DMSO = Dimethyl Sulfoxide

De resultaten worden uitgedrukt ten opzichte van het natuurlijke oestrogene hormoon  $17\beta$ -oestradiol, als oestradiol equivalenten (ng EEQ/l). Hiertoe wordt bij elke serie analyses een calibratiecurve met  $17\beta$ -oestradiol meegenomen.

#### 3.6.4 INDICATOREN VOOR FECALE VERONTREINIGING EN CAMPYLOBACTER

Alle bepalingen zijn volgens de huidige NEN en ISO richtlijnen uitgevoerd, gekoeld getransporteerd en binnen 24 uur na monsternamen geanalyseerd. De betreffende NEN en ISO zijn weergegeven in tabel 3.3. Voor meer details over de analysemethoden wordt verwezen naar de betreffende richtlijnen.

TABEL 3.3 OVERZICHT VAN GEBRUIKTE NEN-ISO NORM VOOR ANALYSE

| Micro-organisme            | NEN-ISO                 |
|----------------------------|-------------------------|
| Escherichia coli           | NEN-EN-ISO 9308-1:2000  |
| Intestinale enterococci    | NEN-EN-ISO 7899-2:2000  |
| F-specifieke bacteriofagen | NEN-EN-ISO 10705:1:2001 |
| Campylobacter              | NEN 6269 (1996)         |

## 4

## RESULTATEN HORMOONVERSTOORDERS

## 4.1 NATUURLIJKE HORMONEN, SYNTHETISCHE HORMONEN EN BISFENOL A

De resultaten van de metingen van natuurlijk en synthetische hormonen alsmede van bisfenol A zijn te vinden in bijlage 6. In deze bijlage worden tevens de gemiddelde, minimum en maximum concentratie, het aantal monsters boven en onder de detectielimiet en de zuiveringsrendementen per zuiveringsstap gegeven. De oestriolmeting moet als indicatief worden beschouwd door problemen met de elutie van deze stof van de cartidges (zie bijlage 3 voor details). Een samenvatting van de resultaten (de ranges waarin gemeten is) is weergegeven in onderstaande tabel.

TABEL 4.1 GEVONDEN RANGES VAN CONCENTRATIES VAN HORMOONVERSTORENDE STOFFEN

| Stof<br>RWZI                   | Influent<br>A, B, C, D, G, H | Nabezinktank<br>A, B, C, D, F, I | Cont. ZF<br>C, D, F | Discont. ZF<br>E | MBR<br>G, H  |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------|--------------|
| bis fenol A (µg/l)             | 0,55 – 3,1                   | 0,015 – 2,64                     | <0,017 – 0,15       | 0,11 – 0,77      | 0,01 – 0,082 |
| 17α-oestradiol (ng/l)          | <0,6 – 9,9                   | <0,5 – <5                        | <0,5 – <5           | <0,5 – <3        | <1           |
| oestron (ng/l)                 | 41 – 150                     | <0,5 – 28                        | <0,5 – 10           | <0,5 – <3        | Nb           |
| 17β-oestradiol (ng/l)          | 8 – 34                       | <0,5 – 2,3                       | <0,5 – 1,2          | <0,5 – <3        | Nb           |
| oestriol (ng/l)                | 34 – 334                     | <1 – <5                          | 1,3 – <5            | <3               | Nb           |
| mestranol (ng/l)               | <1 – <3,5                    | <1 – <2,1                        | <1 – <2             | <1               | <2 – <2,3    |
| 17α-ethinyloestradiol (ng/l)   | 2,2 – 9,2                    | <1 – <5                          | <1 – <5             | <1 – <3          | <2,9 – <3,4  |
| nonylfenol (µg/l)              | 10 – 60                      | 0,15 – 2,4                       | 0,47 – 0,75         | 0,47 – 0,94      | <0,07 – 1,6  |
| nonylfenol monoethox. (µg/l)   | <0,05 – 52                   | <0,05 – 1,1                      | <0,05 – 0,11        | 0,27 – 0,39      | <0,05 – 0,16 |
| nonylfenol diethoxylaat (µg/l) | 0,8 – 13,0                   | 0,05 – 0,2                       | <0,05 – 0,08        | 0,07             | <0,05 – 0,11 |
| nonylfenoethox. 3-16 (µg/l)    | 12 – 290                     | <0,05 – 0,44                     | 0,04 – 0,40         | 0,08 – 0,10      | 0,13 – 0,16  |
| ER-calux (ng EEQ/l)            | 9,1 – 71,0                   | 0,18 – 5,2                       | 0,20 – 2,9          | 0,80 – 1,9       | 0,09 – 1,6   |

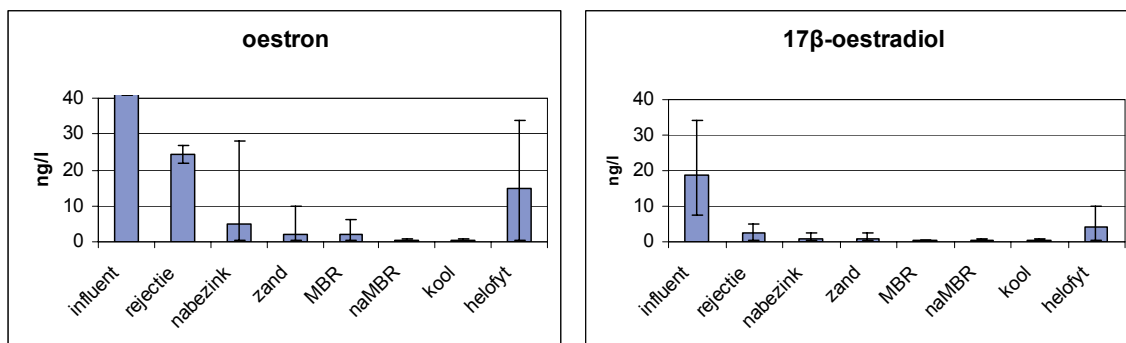
| STOF<br>RWZI                   | NA MBR<br>F   | AK FILTER<br>E | HOR. HELOFYT.<br>I | VERT. HELOFYT.<br>D |
|--------------------------------|---------------|----------------|--------------------|---------------------|
| bis fenol A (µg/l)             | 0,008 – 0,094 | 0,013 – 0,026  | 0,15 – 0,18        | <0,017              |
| 17α-oestradiol (ng/l)          | <0,6 – <2     | <0,5 – <2      | <0,6 – <1          | <1 – <2             |
| oestron (ng/l)                 | <0,6 – <2     | <0,5 – <2      | <1 – 34            | <1 – 7              |
| 17β-oestradiol (ng/l)          | <0,6 – <2     | <0,5 – <3      | <1 – 10            | <1 – <2             |
| oestriol (ng/l)                | nb            | <2             | <1                 | <1 – <2             |
| mestranol (ng/l)               | <1,2 – <2,1   | <1             | <1,1 – 1,2         | nb                  |
| 17α-ethinyloestradiol (ng/l)   | <1,2 – <3,1   | <1 – <2        | <1 – <1,6          | <1 – <2             |
| nonylfenol (µg/l)              | 0,32 – 1,2    | 0,37 – 0,67    | 0,24 – 1,0         | nb                  |
| nonylfenol monoethox. (µg/l)   | <0,05 – 0,39  | 0,35 – 0,37    | 0,30 – 0,41        | nb                  |
| nonylfenol diethoxylaat (µg/l) | <0,05 – 0,08  | <0,05 – 0,08   | 0,14 – 0,16        | nb                  |
| nonylfenoethox. 3-16 (µg/l)    | <0,05 – 0,84  | 0,11 – 0,21    | 0,36 – 0,42        | nb                  |
| ER-calux (ng EEQ/l)            | 0,06 – 0,10   | 0,21 – 0,73    | 3,0 – 22,7         | 0,12 – 0,14         |

#### 4.1.1 NATUURLIJKE EN SYNTHETISCHE HORMONEN

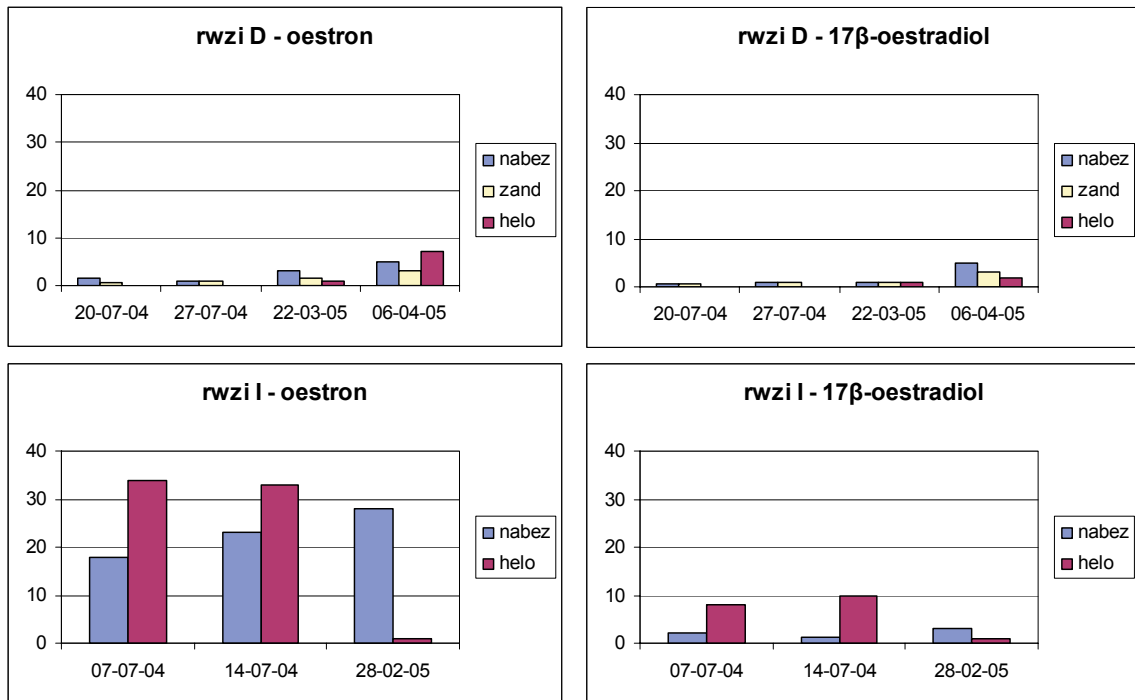
Uit deze resultaten kunnen voor de natuurlijke en synthetische hormonen de volgende conclusies worden getrokken:

- Mestranol is niet aantoonbaar in zowel influent als effluent (d.l. = 1-3,5 ng/l);
- In het influent van de RWZI's zijn alle overige onderzochte stoffen aangetoond. Het betreft vooral oestron en oestriol, maar in mindere mate ook  $17\alpha$ - en  $17\beta$ -oestradiol en ethinyloestradiol;
- In het effluent van de RWZI's is ethinyloestradiol niet meer aantoonbaar. Ook oestriol wordt niet of nauwelijks meer aangetroffen in het effluent van de RWZI's;
- $17\alpha$ -oestradiol is alleen in rejectiewater aantoonbaar (maximaal 2 ng/l);
- Na de verschillende zuiveringstappen wordt oestron nog regelmatig aangetroffen. De nageschakelde MBR installatie en actief koolfiltratie zijn wel in staat oestron tot onder de detectielimiet te verwijderen (zie figuur 4.1);
- $17\beta$ -oestradiol wordt incidenteel aangetroffen in het effluent van de nabezinktank, het zandfilter, het helofytenfilter en in rejectiewater (zie figuur 4.1);
- In rejectiewater worden relatief hoge concentraties hormonen aangetroffen, de concentraties zijn wel lager dan in het influent;
- Het horizontaal doorstroomd helofytenfilter van RWZI I laat in de eerste twee bemonsteringsrondes (juli 2004) een opmerkelijke toename zien in de gehalten oestron en  $17\beta$ -oestradiol. Deze stoffen zijn echter bij de bemonstering in februari 2005 niet aantoonbaar in het effluent van het helofytenfilter (zie figuur 4.2). In het verticaal doorstroomd helofytenfilter van RWZI D is in het effluent van het filter alleen oestron nog aantoonbaar (7 ng/l) op één van de beide bemonsteringsdagen in het voorjaar van 2005;
- De zandfilters geven geen eenduidig beeld. Het gaat hier met name om de gehalten oestron, overige stoffen worden niet of nauwelijks in effluenten aangetroffen. In enkele gevallen nemen de gehalten af, in andere gevallen echter toe;
- Het berekenen van het zuiveringsrendement is alleen zinvol voor  $17\beta$ -oestradiol en oestron, omdat de overige stoffen ook in het influent al voornamelijk onder of net boven de detectielimiet zijn aangetroffen. Het zuiveringsrendement van  $17\beta$ -oestradiol varieert voor de RWZI van >76 tot >98%, die van oestron van 90 tot >99%. Voor respectievelijk  $17\beta$ -oestradiol en oestron is het zuiveringsrendement in de MBR is tenminste 87% en 96%. Voor de overige zuiveringstappen is om genoemde reden het rendement niet goed uit te rekenen.

FIGUUR 4.1 GEMIDDELDE GEHALTEN OESTRON EN  $17\beta$ -OESTRADIOL PER ZUIVERINGSTECHNIEK. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUM CONCENTRATIE AAN. DE GEMIDDELDE INFLUENTCONCENTRATIE VAN OESTRON IS 81 NG/L, DE MAXIMALE INFLUENTCONCENTRATIE 150 NG/L. VOOR HET BEREKENEN VAN DE GEMIDDELDEN IS VOOR GEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET DE DETECTIELIMIET GENOMEN



**FIGUUR 4.2** GEHALTEN OESTRON EN 17 B-OESTRADIOL IN NG/L GEMETEN OP RWZI D EN I IN HET EFFLUENT VAN DE NABEZINKTANK, HET ZANDFILTER EN/OF HET HELOFYTFILTER. DE BEMONSTERING HEEFT PLAATSGEVONDEN IN DE ZOMER VAN 2004 EN HET VOORJAAR VAN 2005. VOOR GEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET IS DE DETECTIELIMIET GENOMEN



Verdere grafische weergave van de resultaten per RWZI geeft voor de meeste RWZI's weinig toegevoegde informatie omdat de gehalten van de natuurlijke en synthetische hormonen voor en na zuiveringsstap bijna allemaal onder de detectielimiet liggen.

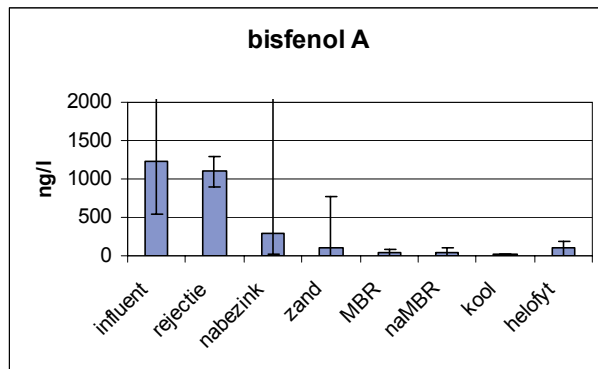
#### 4.1.2 BISFENOL A

De resultaten van de analyse van bisfenol A worden in figuur 4.3 grafisch weergegeven. Voor bisfenol A kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Bisfenol A wordt in het influent in een concentratie van gemiddeld circa 1.000 ng/l aangetroffen, met een enkele uitschieter naar 2.000 – 3.000 ng/l.
- Ook in het effluent van de RWZI's is bisfenol A in bijna alle monsters aantoonbaar, met een gemiddelde concentratie van circa 80 ng/l. Opmerkelijke uitschieter is echter RWZI A, een conventionele zuivering, waar een toename van het bisfenol A gehalte tot 1.500 – 2.500 ng/l wordt gemeten. Deze toename kan niet verklaard worden.
- Geen enkele aanvullende zuiveringstechniek is in staat gebleken om bisfenol A tot onder de detectielimiet te verwijderen.
- Het zuiveringsrendement voor bisfenol A ligt voor de conventionele zuivering (m.u.v. RWZI A) tussen de 96% en 99%.
- De zandfilters geven geen eenduidig beeld. In enkele gevallen nemen de gehalten af, in andere gevallen echter toe, in een enkel geval wel 3,6 keer tot 770 ng bisfenol A/l. Het helofytenfilter van RWZI I laat een lichte toename van het gehalte zien (maximaal 2x), terwijl na het helofytenfilter van RWZI D bisfenol A niet meer aantoonbaar is.

FIGUUR 4.3

GEMIDDELDE GEHALTE BISFENOL A PER ZUIVERINGSTECHNIEK. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUM CONCENTRATIE AAN. DE MAXIMALE INFLUENTCONCENTRATIE IS 3.100 NG/L, DE MAXIMALE CONCENTRATIE IN HET EFFLUENT VAN DE NABEZINKTANK 2.640 NG/L. VOOR HET BEREKENEN VAN DE GEMIDDELDEN IS VOOR GEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET DE DETECTIELIMIET GENOMEN



#### 4.2 NONYLFENOLEN EN NONYLFENOLETHOXYLATEN

De resultaten van de metingen van nonylfenolen en nonylfenoethoxylaten zijn te vinden in bijlage 6. In figuur 4.4 worden de gehalten per type behandeling samengevat. Bij de berekening van de gemiddelden is bij gehalten onder de detectielimiet gerekend met de detectielimiet<sup>6</sup>. In figuur 4.5 worden de resultaten per zuivering gepresenteerd.

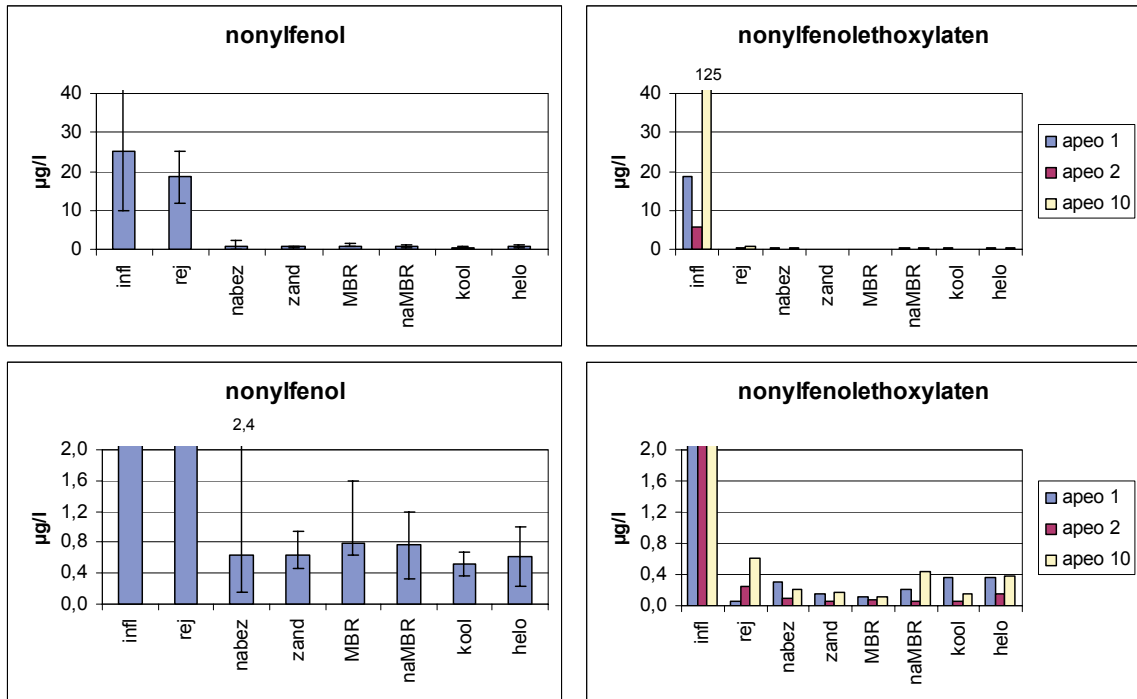
Uit de resultaten kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- In het RWZI-influent worden hoge concentraties gemeten (gemiddeld enkele tientallen tot honderden µg/l). Er zijn grote verschillen in influentconcentraties, zowel binnen de RWZI's als tussen de RWZI's onderling (figuur 4.4). Op grond van de beschikbare gegevens is het niet mogelijk een relatie te leggen met mogelijke invloedsfactoren als de bijdrage van een industriële afvalwaterlozing. Wel kan geconstateerd worden dat in alle gevallen de concentratie in het RWZI-influent van de langere nonylfenoethoxylaatketens (NPEO10) het hoogst is, gevolgd door nonylfenol (NP).
- Het aandeel dat in het influent van de RWZI's aan het zwevend stof gebonden is, verschilt aanzienlijk binnen en tussen de RWZI's (figuur 4.5). De gemiddelde bijdrage van de waterfase aan de totale concentratie is ongeveer 50% voor nonylfenol en 70% voor nonylfenoethoxylaten. In bepaalde gevallen is een trend te zien waarin de bijdrage van de waterfase aan de totale concentratie toeneemt in de volgorde NPEO1, NPEO2 en NPEO10. Deze waarneming is in overeenstemming met de hogere oplosbaarheid van de NPEO's met een langere ethoxylaatketen.
- Na zuivering zijn de concentraties afgenomen tot <2 µg/l. Dit betekent een zuiveringsrendement van >98%. Na zuivering is met name het aandeel hogere ethoxylaten sterk afgenomen en blijft vooral nonylfenol over.
- In rejectiewater (water afkomstig van uitgestort en ontwaterd zuiveringsslib) zijn relatief hoge concentraties nonylfenol aangetroffen (gemiddeld 18,7 µg/l, met name aan slib gebonden). De concentratie nonylfenoethoxylaten is <1 µg/l totaal.

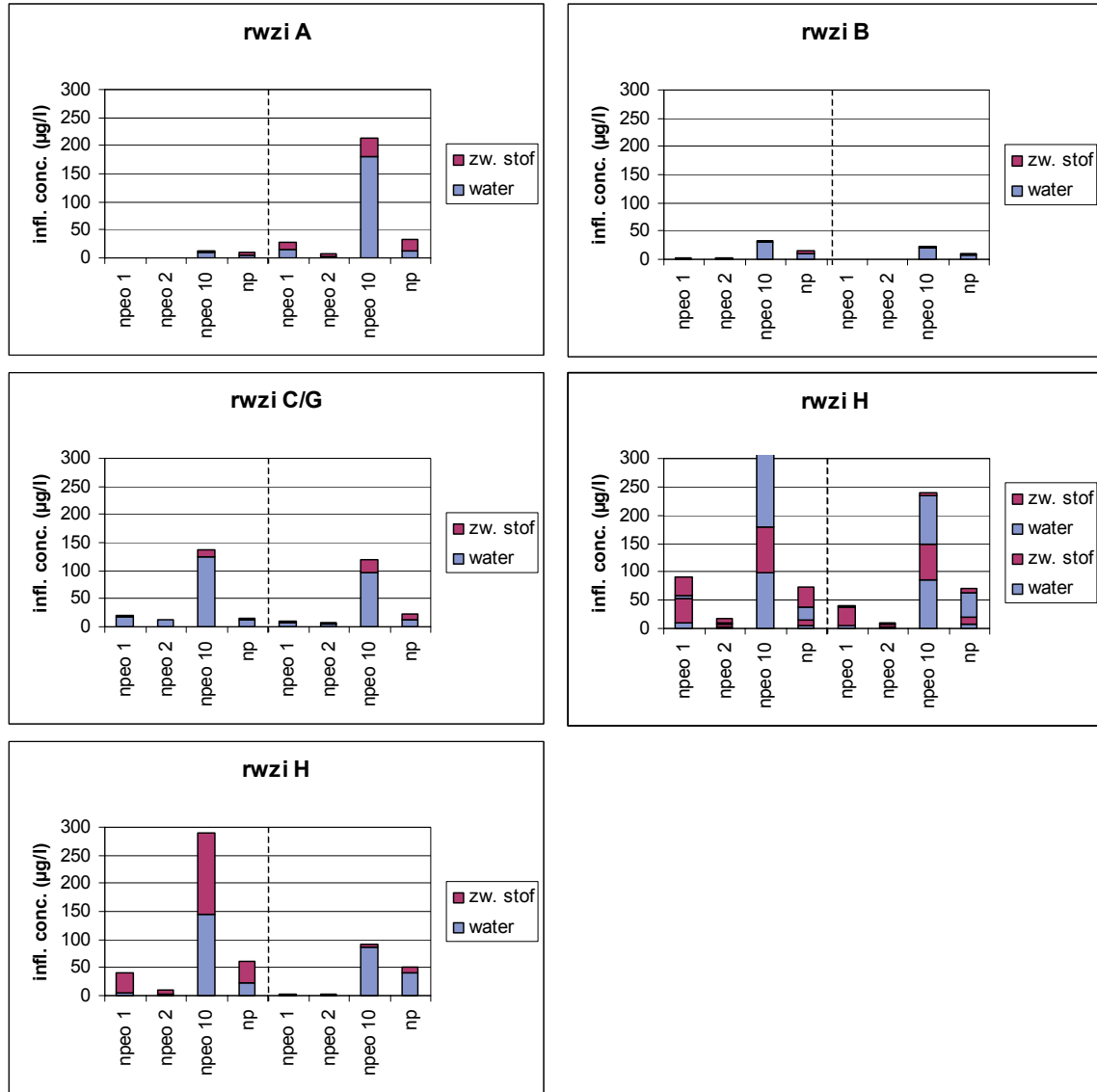
<sup>6</sup> De detectielimiet, LOD = *Limit Of Detection*, wordt gedefinieerd als driemaal de ruis in het chromatogram.

Daarnaast is er de LOQ = *Limit Of Quantification* of kwantificeringslimiet, gedefinieerd als driemaal de detectielimiet.

FIGUUR 4.4 GEMIDDELDE TOTAAL CONCENTRATIES NONYLFENOL EN NONYLFENOLETHOXYLATEN IN DE VERSCHILLENDE TYPEN MONSTERS. OM DE VERSCHILLEN TUSSEN DE BEHANDELINGEN DUIDELIJKER ZICHTBAAR TE MAKEN IS IN DE ONDERSTE HELFT DE SCHAAL AANGEPAST. VOOR NONYLFENOL ZIJN TEVENS DE MINIMUM EN MAXIMUM CONCENTRATIE WEERGEGEVEN. VOOR INFLUENT EN REJECTIEWATER IS DE CONCENTRATIE IN HET ZWEVEND STOF EN DE CONCENTRATIE IN DE WATERFASE OPGETELD. VOOR DE BEREKENING VAN HET GEMIDDELDE IS VOOR GEHALTEN BENEDEN DE DETECTIELIMIET GEREKEND MET DE DETECTIELIMIET (0,05 µG/L)



FIGUUR 4.5 INFLUENT CONCENTRATIES NONYLFENOL(ETHOXYLAT) EN IN HET WATER EN IN HET ZWEVEND STOF (OMGEREKEND NAAR  $\mu\text{G/L}$ ) IN DE VERSCHILLENDE ZUIVERINGEN. IN ELKE GRAFIEK ZIJN IN DE LINKERHELFTE DE CONCENTRATIES VOOR DE EERSTE BEMONSTERINGSRONDE WEERGEGEVEN EN IN DE RECHTERHELFTE VOOR DE TWEEDE BEMONSTERINGSRONDE. HET INFLUENT VAN RWZI C EN RWZI G IS GELIJK EN WORDT ZOWEL NAAR DE CONVENTIONELE ZUIVERING MET NAGESCHAKELDE ZANDFILTERS (RWZI C) ALS NAAR EEN MBR-INSTALLATIE GELEID (RWZI G). VOOR GEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET IS DE DETECTIELIMIET GENOMEN (0,05  $\mu\text{G/L}$ ). ALLE TOTAALGEHALTEN WAREN BOVEN DE DETECTIELIMIET





### 4.3 GEMETEN OESTROGENE ACTIVITEIT (ER-CALUX ASSAY)

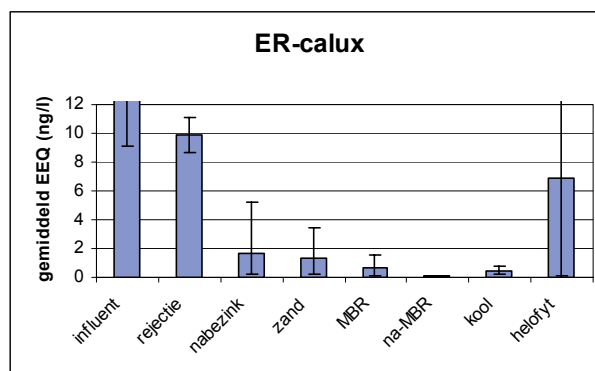
De resultaten van de ER-calux assay staan in bijlage 6. In figuur 4.6 wordt de gemiddelde gemeten oestrogene activiteit per behandeling weergegeven. In figuur 4.7 zijn de resultaten weergegeven per RWZI.

Uit de resultaten kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

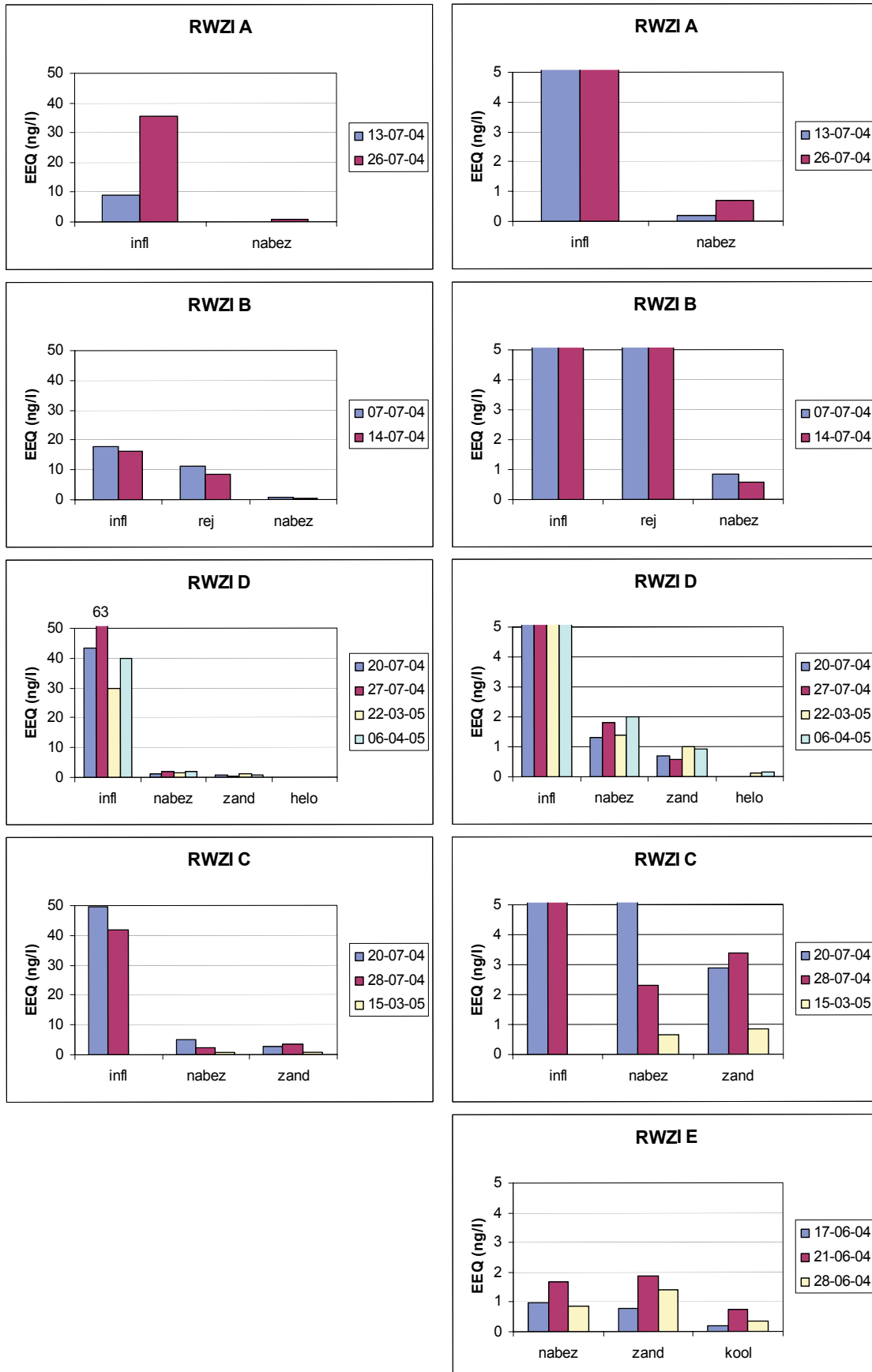
- Het beeld is in grote lijnen gelijk aan de hormonenmetingen, maar is consistent.
- In alle monsters is oestrogene activiteit gemeten.
- Na de RWZI's met aanvullende zuivering wordt een restactiviteit van 0,06 – 5,2 ng EEQ/l gemeten.
- Het zuiveringsrendement van de conventionele RWZI's varieert tussen de 89,7 en 98,0% met restactiviteiten van 0,18 – 5,2 ng EEQ/l; daarbij is de ER-calux van de slibfractie niet gemeten.
- De nageschakelde MBR en het actief kool filter is in staat om extra oestrogene activiteit te verwijderen tot een zeer lage restactiviteit van respectievelijk <0,10 ng EEQ/l en <0,73 ng EEQ/l.
- Zandfilters geven een wisselend rendement, met zowel toename als afname van de oestrogene activiteit. De restactiviteit varieert van 0,20 tot 3,4 ng EEQ/l.
- In het effluent van het horizontaal doorstroomd helofytenfilter van RWZI I worden relatief hoge restactiviteiten waargenomen (3 – 23 EEQ ng/l). In alle gevallen betreft het een toename ten opzichte van het inkomende water. In het effluent van het verticaal doorstroomd helofytenfilter van RWZI D worden echter zeer lage restactiviteiten (0,12 - 0,14 ng EEQ/l) waargenomen. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat de activiteit van het water dat het filter binnen komt wel reeds lager is dan bij RWZI I (0,93 – 1,0 ng/l voor RWZI D tegen 2,0 – 5,2 ng/l voor RWZI I).
- In rejectiewater wordt relatief hoge oestrogene activiteit gemeten (8,7 – 11,1 EEQ ng/l),

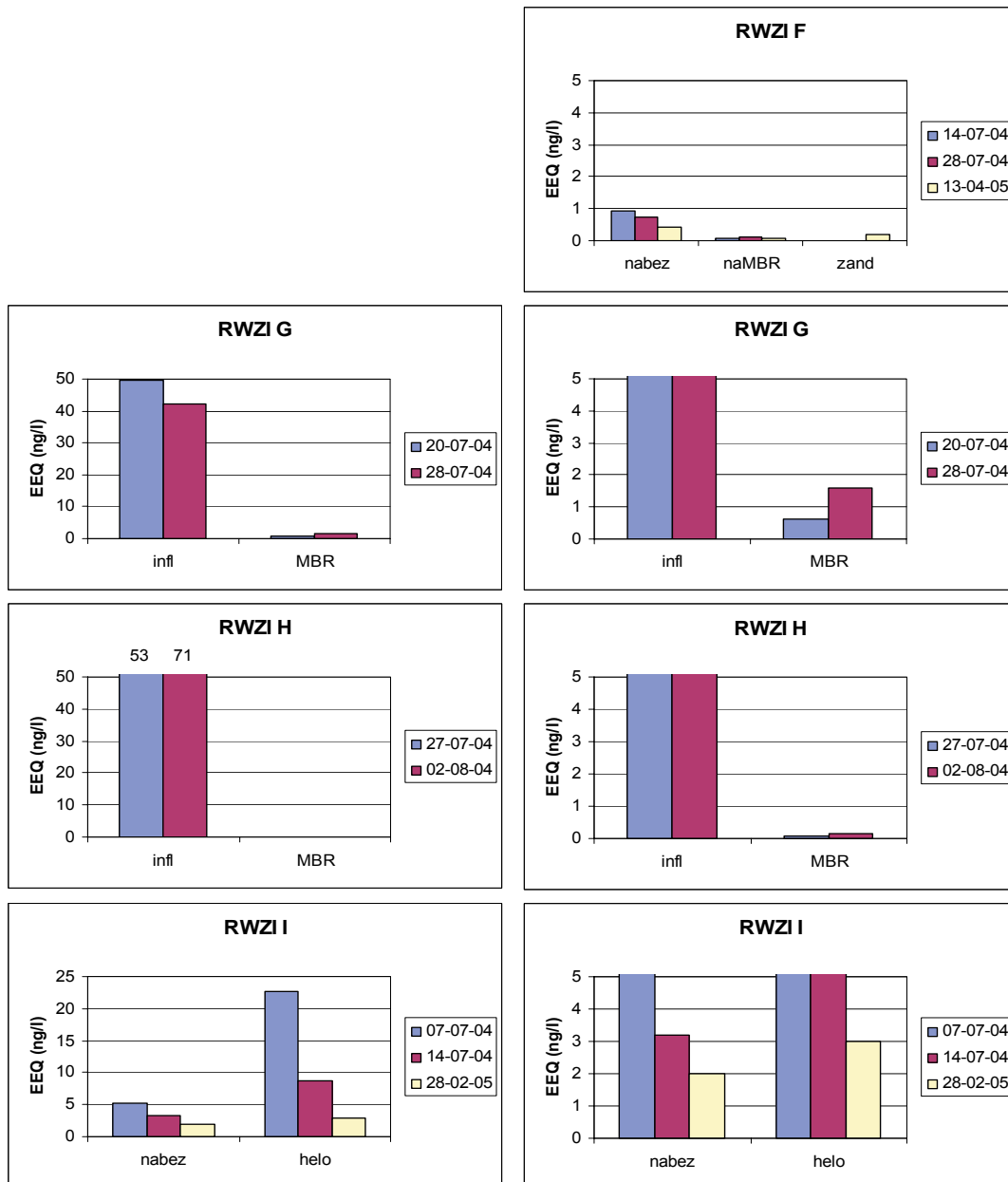
FIGUUR 4.6

GEMIDDELDE OESTROGENE ACTIVITEIT PER BEHANDELING ZOALS GEMETEN IN DE ER-CALUX ASSAY. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUM CONCENTRATIE AAN. DE GEMIDDELDE WAARDE IN HET INFLUENT IS 39,2 NG EEQ/L, DE MAXIMALE 71,0 NG EEQ/L. DE MAXIMALE WAARDE IN HET HELOFYTENFILTER IS 22,7 NG EEQ/L. ALLE ACTIVITEITEN WAREN BOVEN DE DETECTIELIMIET



FIGUUR4.7 OESTROGENE ACTIVITEIT GEMETEN IN DE VERSCHILLENDE ZUIVERINGEN OP VERSCHILLENDE BEMONSTERINGSDATA. OM DE VERSCHILLEN TUSSEN DE BEHANDELINGEN DUIDELIJKER ZICHTBAAR TE MAKEN IS ZIJN DE RESULTATEN OP LINKS EN RECHTS OP TWEE VERSCHILLENDE SCHALEN WEERGEGEVEN. ALLE ACTIVITEITEN WAREN BOVEN DE DETECTIELIMIET





# 5

## RESULTATEN (INDICATOREN VOOR) PATHOGENEN

### 5.1 ALGEMEEN

De resultaten van de metingen van alle microbiologische bepalingen zijn te vinden in bijlage 7. In tabel 5.1 worden deze samengevat.

TABEL 5.1 GEVONDEN RANGES VAN CONCENTRATIES VAN INDICATOREN VOOR FECALE VERONTREINIGINGEN ( $_{10}$ LOG (KVD/100 ML))<sup>a</sup> EN CAMPYLOBACTER ( $_{10}$ LOG (KVD/L))<sup>a</sup>

| Micro-organisme          | Influent         | Nabezinktank        | Continu ZF    | Discont. ZF    | MBR        |
|--------------------------|------------------|---------------------|---------------|----------------|------------|
| RWZI                     | A, B, C, D, G, H | A, B, C, D, E, F, I | C, D, G       | E              | G, H       |
| E. coli                  | >2,7 – 6,9       | 1,8 – 5,8           | 3,1 – 4,6     | <2             | <0 – 0,9   |
| Intestinale enterococcen | <3 – 6,2         | 1,5 – 4             | 2,5 – 3,5     | 3,1            | <0 – 0     |
| Bacteriofagen            | 2,2 – 6,5        | 1,0 – 4,6           | 1,8 – 4,0     | 2,8 – 2,9      | <1,0 – 1,8 |
| Campylobacter            | -                | 2,2 – 2,7           | 1,4 – 2,2     | -              | -          |
| Micro-organisme          | Nagesch. MBR     | Actief koelfilter   | Hor. Helofyt. | Vert. Helofyt. | UV         |
| RWZI                     | F                | E                   | I             | D              | A          |
| E. coli                  | <0               | 1,7 – 2,8           | 1,5           | 1,2 – 1,8      | 2,1 – 2,5  |
| Intestinale enterococcen | <0               | 1,3 – 2,5           | 1,3           | 0,0 – 1,0      | 1,5 – 1,6  |
| Bacteriofagen            | <1,0 – 1,0       | 2,8 – 3,2           | 1,0 – 4,4     | <1,0 – 2,2     | 1,8 – 2,4  |
| Campylobacter            |                  |                     | <0,5          | 2,2 – 4,0      |            |

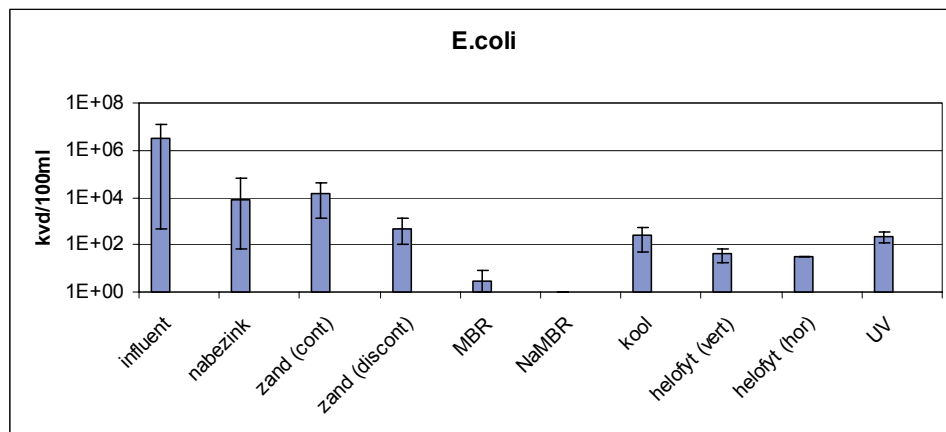
<sup>a</sup> kvd = kolonievormende deeltjes

### 5.2 E. COLI EN INTESTINALE ENTEROCOCCEN

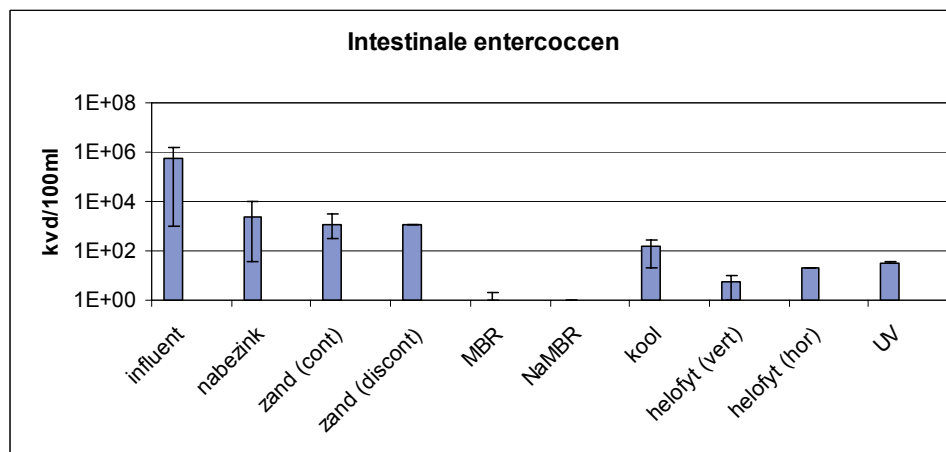
De resultaten voor de bacteriële indicatoren van fecale verontreiniging zijn weergegeven in de figuren 5.1 en 5.2. Hieruit kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- E. coli en intestinale enterococcen komen hoge aantallen voor in influent van RWZI's. De spreiding tussen de gevonden waarden is groot.
- Na aanvullende zuivering worden deze indicatoren nog aangetroffen in het effluent. Alleen bij de (nageschakelde) MBR zijn deze indicatoren nagenoeg niet meer aanwezig.
- De resultaten van de zandfiltratie zijn wisselend, soms heeft zandfiltratie geen effect (en geeft zelfs hogere aantallen dan na de nabezinkstap) en soms is er wel reductie van micro-organismen. UV geeft een reductie van de micro-organismen, maar de efficiency is laag (30-50%), terwijl eenmaal een toename van bacteriofagen is gevonden.

FIGUUR 5.1 GEMIDDELTE GEHALTEN E. COLI. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUMCONCENTRATIE AAN. VOOR HET BEREKENEN VAN DE GEMIDDELDEN IS VOORGEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET DE DETECTIELIMIET GENOMEN



FIGUUR 5.2 GEMIDDELTE GEHALTEN INTESTINALE ENTEROCOCCEN. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUMCONCENTRATIE AAN. VOOR HET BEREKENEN VAN DE GEMIDDELDEN IS VOORGEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET DE DETECTIELIMIET GENOMEN



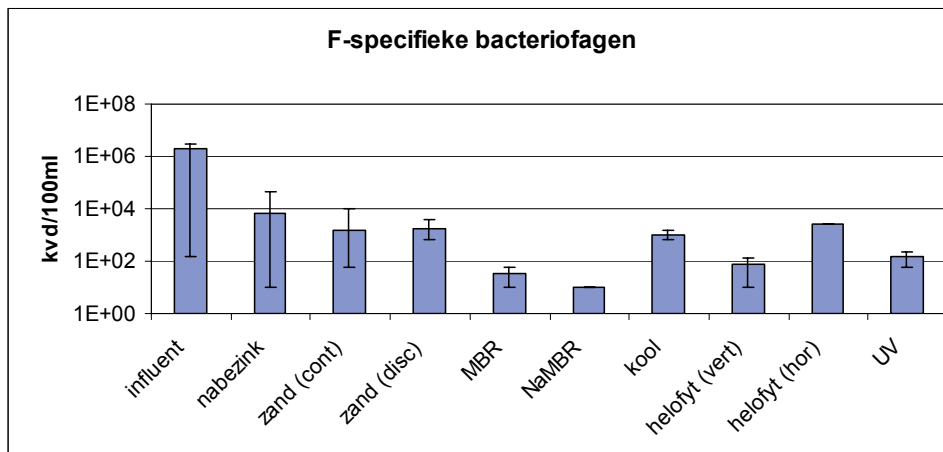
### 5.3 F-SPECIFIEKE BACTERIOFAGEN

De resultaten voor de virale indicatoren van fecale verontreiniging zijn weergegeven in de figuur 5.3. Hieruit kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- F-specifieke bacteriofagen komen in grote getale voor in influent van RWZI's. De spreiding tussen de gevonden waarden is groot.
- Na aanvullende zuivering wordt deze indicator nog in alle monsters aangetroffen.
- De (nageschakelde) MBR geeft de laagste concentratie van deze indicator, maar is geen absolute barriere voor deze bacterievirussen.

FIGUUR 5.3

GEMIDDELDE GEHALTEN F-SPECIFIEKE BACTERIOFAGEN. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUMCONCENTRATIE AAN. VOOR HET BEREKENEN VAN DE GEMIDDELDEN IS VOORGEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET DE DETECTIELIMIET GENOMEN



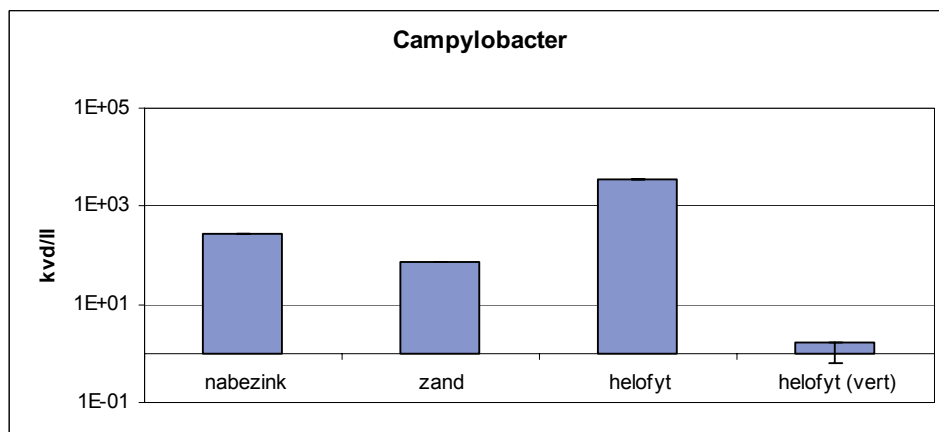
#### 5.4 CAMPYLOBACTER

De resultaten voor Campylobacter zijn weergegeven in de figuur 5.4. Hieruit kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Er is een toename geconstateerd van Campylobacter in het horizontaal doorstroomde helofytenfilter. In het verticaal doorstroomde helofytenfilter is wel een afname geconstateerd. Deze laatste meting is in de winter uitgevoerd, terwijl het horizontaal doorstroomde filter in de zomer is bemonsterd.
- Het rendement van de verschillende zandfilters voor deze pathogeen wisselend.

FIGUUR 5.4

GEMIDDELDE GEHALTEN CAMPYLOBACTER. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUMCONCENTRATIE AAN. VOOR HET BEREKENEN VAN DE GEMIDDELDEN IS VOORGEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET DE DETECTIELIMIET GENOMEN



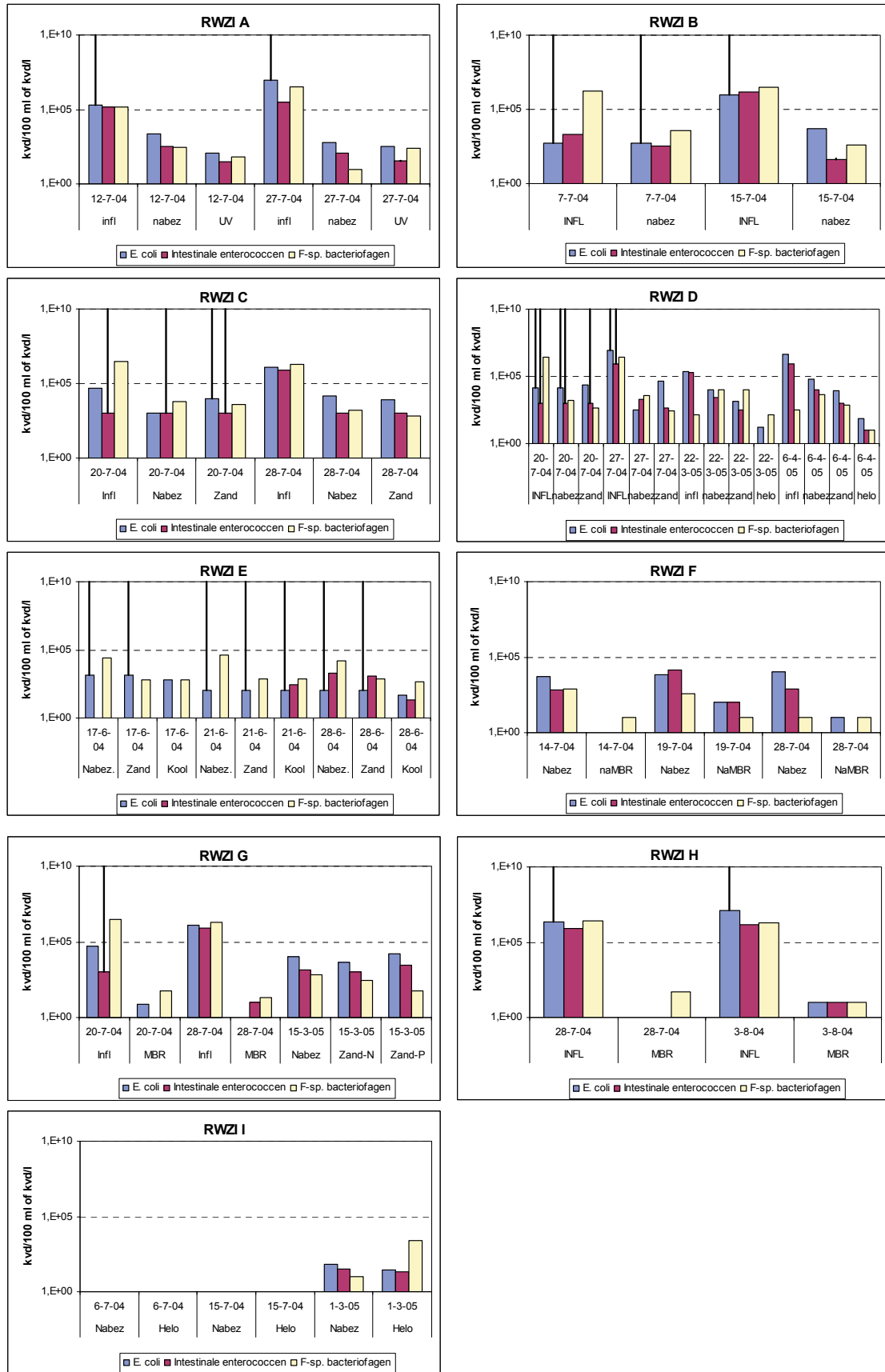
## 5.5 RESULTATEN PER ZUIVERING

### 5.5.1 INDICATOREN VOOR PATHOGENEN

Per RWZI zijn de resultaten van de indicatoren voor pathogenen grafisch weergegeven in figuur 5.5. Hieruit kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- In alle RWZI's worden de indicatoren voor pathogenen verwijderd met een rendement van meer dan 90%, alleen een membraanstap laat in de meeste gevallen een totale verwijdering zien. Beter is het om het rendement uit te drukken in een LOG-verwijdering, waarbij een reductie van tot meer dan 3 LOG-eenheden gevonden is. Voor de MBR's (RWZI's F, G en H) is een hogere reductie van meer dan 5 LOG-eenheden gevonden.
- Bij RWZI A is op de tweede monsterdag een toename in bacteriofagen na UV-behandeling. Er is wel een afname van de andere indicatoren gevonden. De afname van bacteriofagen ligt binnen de foutenmarge van de methode.
- Bij RWZI E is een geringe bijdrage van het actief-koolfilter na het zandfilter gevonden.
- Bij RWZI I is een toename van F-specifieke bacteriofagen in het helofytenfilter gevonden.
- *E. coli* en intestinale enterococci komen hoge aantallen voor in influent van alle RWZI's. De spreiding tussen de gevonden waarden is groot.

FIGUUR 5.5 RESULTATEN VAN DE INDICATOREN PER RWZI OP DE VERSCHILLENDE ANALYSEDATA (VAAK 1 DAG NA MONSTERNAME). SOMMIGE CONCENTRATIES WAREN HOGER DAN GEMETEN KON WORDEN, DIT IS AANGEGEVEN MET EEN VERTICALE LIJN IN DE BETREFFENDE STAAFDIAGRAM PER METING



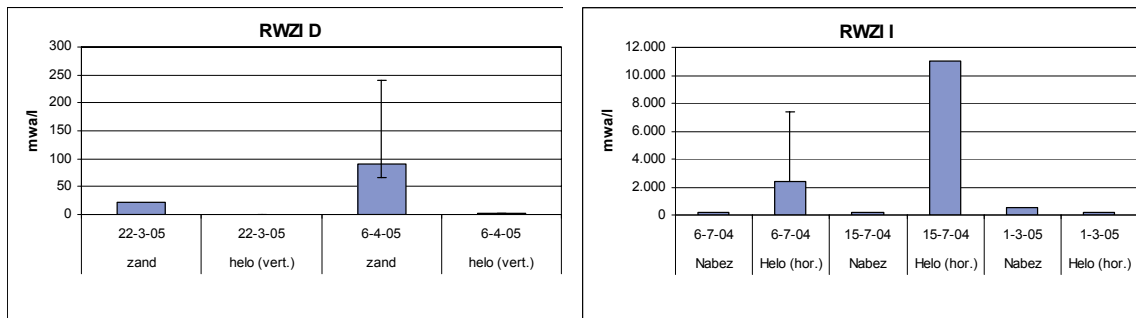


### 5.5.2 CAMPYLOBACTER

Ook voor de Campylobacter bepalingen is een overzicht gemaakt van de resultaten van de twee hierop bemonsterde RWZI's (D en I). De grafieken voor deze RWZI's zijn weergegeven in figuur 5.6. Hieruit worden de volgende conclusies getrokken:

- Bij het verticaal doorstroomd filter (RWZI D) wordt een afname van Campylobacter gevonden in de maanden maart en april 2005.
- Bij het horizontaal doorstroomd filter (RWZI I) wordt een toename van Campylobacter gevonden in de juli 2005. In de bemonstering in maart is dit niet gevonden.

FIGUUR 5.6 RESULTATEN VAN CAMPYLOBACTER BIJ RWZI D EN I



# 6

## DISCUSSIE

### 6.1 HORMOONVERSTOORDERS

#### 6.1.1 RESULTATEN RWZI'S EN VERGAANDE ZUIVERINGSTECHNIEKEN

##### RWZI'S

In het influent van de RWZI's worden natuurlijke en synthetische hormonen in aantoonbare hoeveelheden gevonden. De meest hormoonverstorende hormonen (oestron, 17 $\beta$ -oestradiol, oestriol en 17 $\beta$ -ethinyloestradiol) tot maximaal enkele honderden ng/l. In de RWZI's worden deze gereduceerd tot onder de detectielimiet (1-5 ng/l), behalve voor oestron (tot maximaal 28 ng/l gevonden) en 17 $\beta$ -oestradiol (tot 2,3 ng/l). De nonylfenolen worden wel in het effluent van de RWZI's in relatief hoge concentraties gevonden (tot 2,4  $\mu$ g/l), maar de bijdrage aan de hormoonverstoring is daarmee nog steeds gering.

Ook de resultaten van de effectmeting middels de ER-calux assay laten een reductie in de RWZI's zien, echter de restactiviteit van het RWZI-effluent is in alle gevallen aantoonbaar gemeten tot 5,2 ng EEQ/l.

De verwijdering in de RWZI's zal deels worden veroorzaakt door afbraak en deels door adsorptie van de stoffen aan het actief slib. Naar de verwijderingsmechanismen in de RWZI's is in het kader van het hier beschreven project geen onderzoek gedaan.

##### ZANDFILTRATIE

Op drie RWZI's (C, D en E) wordt het RWZI-effluent behandeld met een zandfilter. Het zuiveringsrendement voor natuurlijke en synthetische hormonen en bisfenol A was minder dan 50%. Voor nonylfenol(ethoxylat)en is dit rendement ook lager dan 50%. Ditzelfde beeld is te zien bij de ER-calux assay. Na zandfiltratie is nog steeds een oestrogene activiteit meetbaar. Door middel van zandfiltratie wordt de oestrogene activiteit verlaagd met maximaal 68%. In 4 van de 10 metingen wordt echter een toename van de oestrogene activiteit gemeten, tot 65%. Na het zandfilter is een oestrogene activiteit van 0,2 tot 3,4 ng EEQ/l gemeten. Er is geen relatie gevonden tussen het type filter (continu/discontinue) en de verwijdering van oestrogene activiteit.

Zandfiltratie is in de bemonsterde configuraties onvoldoende om de hormoonverstorende stoffen vergaand voor meer dan 50% te verwijderen. Uit de literatuur is bekend dat een deel van deze stoffen adsorbeert aan slibdeeltjes. Vanuit dit oogpunt wordt verwacht dat een zandfilter met een hoog rendement voor zwevende stof, zoals het discontinue dubbellaagszandfilter, een hoger verwijderingsrendement voor hormoonverstoorders laat zien dan een systeem met een lager rendement voor zwevende stof, zoals een continue zandfilter. Dit wordt niet onderbouwd door het beperkt aantal metingen dat in het hier beschreven project is geanalyseerd.

##### ACTIEF KOOLFILTRATIE

De actiefkoolfiltratie (RWZI E) laat ten aanzien van bisfenol A een rendement zien van rond de 90% (natuurlijke en synthetische hormonen waren in het RWZI-effluent niet aanwezig).

Voor de nonylfenol(ethoxylat)en is het rendement nagenoeg 0% en voor de ER-calux assay is het rendement maximaal 60%. Uit de literatuur is bekend dat Aktief Kool hormoonverstorende stoffen vergaand kan adsorberen. Op grond van de resultaten uit dit onderzoek kan geconcludeerd worden dat de Aktief Koolfiltratie in de hier bemonsterde configuratie onvoldoende verwijderingsrendement heeft voor nonylfenol(ethoxylat)en. Dit zou wellicht verhoogd kunnen worden door toepassing van een ander koolsoort of een andere bedrijfsvoering (grotere *Empty Bed Contact Time*), waardoor onder andere de biologische activiteit bevorderd kan worden. Deze optimalisatie stap zou middels adsorptie experimenten op labschaal kunnen worden onderzocht.

### UV-INSTALLATIE

In de ingaande en uitgaande stroom van de UV-installatie (RWZI A) is in dit onderzoek niet gemeten aan hormoonverstorende stoffen. Op grond van de literatuur wordt (bij een juist ontwerp, d.i. hogere dosering dan bij desinfectie alleen) voor hormoonverstorende stoffen een vergaande afbraak (>90%) verwacht.

### NAGESCHAKELDE MBR

In het effluent van de nabezinktank zijn nagenoeg geen natuurlijke en synthetische hormonen aangetroffen. De effectiviteit van een nageschakelde MBR (RWZI F) voor deze stoffen kon daarom niet worden vastgesteld. Ten aanzien van nonylfenol(ethoxylat)en is een geringe toename vastgesteld in het effluent van de nageschakelde MBR ten opzichte van het voedingswater (RWZI-effluent). Nonylfenol(ethoxylat)en zijn terug te vinden in detergenten en zouden in de MBR wellicht aanwezig kunnen zijn in de chemicaliën die gebruikt zijn om de membranen te reinigen. Opvallend is dat de ER-calux wel een afname van de oestrogene activiteit laat zien tot 75%.

### HELOFYTFILTER

Ten aanzien van een nageschakeld helofytenfilter lijkt een onderscheid aanwezig tussen een horizontaal doorstroomd systeem (RWZI I) en een verticaal doorstroomd systeem (RWZI D). Het horizontaal doorstroomd systeem blijkt zeer gevoelig voor invloeden van buitenaf. Ook ten aanzien van hormoonverstorende stoffen blijkt de oestrogene activiteit toe te nemen. De nonylfenol(ethoxylat)en worden enigszins gereduceerd, maar de natuurlijke en synthetische hormonen nemen met 25% toe voor het horizontaal doorstroomd helofytenfilter. De oestrogene activiteit gemeten met de ER-calux neemt zelfs toe met 50% tot 400%.

In het onderzochte horizontaal doorstroomd helofytenfilter blijkt een toename van de oestrogene activiteit plaats te vinden, tot wel 23 ng EEQ/l. Er bestaat een sterk vermoeden dat uitwerpselen van vogels die zich ophouden in de sloten de belangrijkste oorzaak zijn van deze hoge activiteit. De aanwezigheid van vogels in de sloten wordt bevestigd door de medewerkers van de RWZI. Het verloop van de gehalten aan natuurlijke hormonen in de tijd (relatief hoog in de zomer en relatief laag in de winter, zie figuur 5.6) komt overeen met de aanwezigheid van vogels. Het aantal *Campylobacter* bacteriën vertoont hetzelfde patroon in de tijd (zie paragraaf 5.4). De nonylfenolen en nonylfenolethoxylaten nemen wel af in het helofytenfilter en kunnen daarom geen verklaring vormen voor de toegenomen activiteit.

Het verticaal doorstroomd helofytenfilter laat voor de ER-calux wel een reductie zien van 75% tot 85% ten opzichte van het filtraat van een continue zandfilter. Een verticaal doorstroomd helofytenfilter wordt blijkbaar nauwelijks beïnvloed door bijvoorbeeld uitwerpselen van vogels, zoals dat bij een horizontaal helofytenfilter wel het geval is. Deze bevinding komt overeen met de metingen aan *Campylobacter* (zie onder).

### MEMBRAANBIOREACTOR

De in dit project bemonsterde MBR's (RWZI G en H) laten ten opzichte van een conventionele RWZI een verbeterde verwijdering zien van hormoonverstorende stoffen. De oestrogene activiteit van het effluent van de MBR ligt duidelijk onder de 1 ng EEQ/l, met een uitschieter naar 1,6 ng EEQ/l. Deze uitschieter kan niet verklaard worden door lekkage van de membraanrietjes omdat in dat geval ook de bacteriologische parameters zouden toenemen. Dit laatste is niet het geval. Een mogelijke verklaring zou gevonden kunnen worden in het uitlogen van chemicaliën uit de membranen.

De goede verwijdering wordt voornamelijk veroorzaakt door een betere afscheiding van zwevende stof door de membranen. Ook in vergelijking met een conventionele RWZI met een nageschakeld zandfilter is een beter rendement gevonden, hetgeen verklaard kan worden door de betere afscheiding van zwevende stof.

### REJECTIEWATER

In het rejectiewater van een slibontwateringsinstallatie worden opvallend hoge concentraties aan hormoonverstorende stoffen gemeten (RWZI B). Hieruit blijkt dat deze stoffen in hoge mate adsorberen aan het actief slib en bij ontwatering weer vrijkomen. Dit wordt bevestigd door literatuurgegevens. In de metingen die hier zijn uitgevoerd is de verhoogde concentratie in het rejectiewater niet terug te vinden in het RWZI-effluent. Een aanvullende zuivering voor rejectiewater lijkt daarom geen substantiele bijdrage te kunnen leveren aan een verlaging van de hormoonverstorende stoffen in het RWZI-effluent. Voor een specifieke situatie (grote gisting op kleine RWZI) zou dit wellicht anders kunnen uitpakken.

#### 6.1.2 BETEKENIS RESTCONCENTRATIES

In de effluenten is in alle gevallen met de ER-calux assay nog steeds een restactiviteit meetbaar. Deze varieert van 0,06 tot 5,2 ng EEQ/l. Voor 17  $\beta$ -oestradiol is een *Predicted No Effect Concentration* (PNEC) afgeleid van 1 ng/l voor *in vivo* biologische effecten (STOWA, 2003). Op basis van deze PNEC is een oestrogeen effect van het effluent niet uit te sluiten.

Er moet echter de nodige voorzichtigheid in acht genomen worden bij de vertaling van een gemeten activiteit in een *in vitro* test zoals de ER-calux assay naar een effect bij waterorganismen (*in vivo*). De oestrogene potentie in de ER-calux assay (*in vitro*) is niet gelijk aan de oestrogene potentie in organismen (*in vivo*). In het LOES-onderzoek (Vethaak *et al.*, 2002) is bijvoorbeeld aangetoond dat niet alleen de effectconcentraties in zebrafissen hoger zijn dan in de ER-calux assay (20 – 1667 keer) maar dat tegelijkertijd ook de relatieve oestrogene potentie verschilt van die in de ER-calux assay. Zo is de potentie van oestron in zebrafissen gelijk aan die van 17 $\beta$ -oestradiol (EEF=1) terwijl ethinyloestradiol in zebrafissen 100 keer potenter is dan 17 $\beta$ -oestradiol (EEF=100). In de ER-calux assay zijn deze de EEFs voor oestron en ethinyloestradiol respectievelijk 0,12 en 1,12 (zie paragraaf 6.1.3). Redenen voor de verschillen tussen in *in vitro* en *in vivo* effecten kunnen zijn dat in vissen de stof allereerst opgenomen moet worden, de stof vervolgens gemetaboliseerd kan worden en dat de affiniteit van de oestrogenenreceptor van vissen verschilt van die van mensen (in de ER-calux assay wordt een humane borstkankercellijn gebruikt).

Met behulp van de nageschakelde technieken als een nageschakelde MBR, een actief koolfilter of een verticaal doorstroomd helofytenfilter is in principe het mogelijk gebleken de activiteit tot onder de 1 ng EEQ/l te reduceren. Door het beperkte aantal metingen is de representativiteit echter beperkt.

### 6.1.3 VERANTWOORDELIJKE STOFFEN

In de effluenten van de RWZI's zijn natuurlijke hormonen en andere hormoonverstorende stoffen aangetroffen. Omdat niet elke stof even hormoonverstorend werkt, zegt de concentratie echter nog niet direct iets over de hormoonverstorende activiteit in het effluent. Sterk hormoonverstorende stoffen, zoals bijvoorbeeld 17  $\alpha$ -ethinyloestradiol, kunnen zelfs in concentraties onder de detectielimiet (mogelijk zelfs tot 0,1 ng/l) een bijdrage aan de oestrogene activiteit leveren (STOWA, 2003).

Om de bijdrage van de verschillende stoffen aan de hormoonverstorende activiteit te kunnen kwantificeren zijn de concentraties met behulp van *Estrogenic Equivalency Factors* (EEF's) omgerekend naar *Estrogenic Equivalents* (EEQ's). De EEF van een bepaalde stof A is als volgt gedefinieerd:

$$EEF_A = EC_{50\ E2} / EC_{50\ A}$$

$EC_{50\ E2}$  is de concentratie 17  $\beta$ -oestradiol (E2) waarbij de lichtuitzending 50% van de maximale lichtuitzending is.

Voor conversie naar EEQ's geldt de volgende relatie:

$$EEQ_A = [A] * EEF_A$$

Met behulp van de EEF's uit tabel 6.1 (zie Legler *et al.*, 2002, 2004; Houtman *et al.*, 2004) en de chemisch bepaalde stofconcentratie kunnen de EEQs berekend worden. Hierbij wordt aangenomen dat de stoffen concentratie-additief werken, dat wil zeggen dat ze elkaars werking niet versterken of verzwakken. De EEQs van de individuele stoffen worden dan ook opgeteld.

TABEL 6.1

EEFS DIE GEBRUIKT ZIJN VOOR DE CONVERSIE VAN CONCENTRATIES IN NG/L VAN DE VERSCHILLENDE HORMONEN NAAR EEQS IN NM  
(UIT LEGLER ET AL., 2002, 2004; HOUTMAN ET AL., 2004)

| Component                     | Afkorting | Estrogenic Equivalency Factor (EEF) |
|-------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| 17 $\alpha$ -oestradiol       | E2-17     | 0,01                                |
| 17 $\beta$ -oestradiol        | E2        | 1                                   |
| Oestron                       | E1        | 0,12                                |
| Oestriol                      | E3        | 0,13                                |
| 17 $\beta$ -ethinyloestradiol | EE2       | 1,12                                |
| Bisfenol A                    | BPA       | $1,13 \cdot 10^{-5}$                |
| Mestranol                     | MES       | 0,025                               |

Deze theoretisch berekende EEQs kunnen tevens vergeleken worden met EEQs die met de ER-CALUX<sup>®</sup> gemeten zijn.

De conversie van concentraties van de verschillende hormonen naar hun EEQs is gedaan op basis van molariteit. Voor de berekening van de EEQs zijn eerst de gevonden concentraties in ng/l omgezet in concentraties in nM.

De chemische data zijn op twee manieren gebruikt voor de berekening van de EEQs. In het eerste geval zijn alle bijdragen van de aangetroffen hormonen gesommeerd. Daarnaast is bij de tweede wijze van berekenen ook de bijdrage van hormonen die niet zijn aangetroffen in beschouwing genomen door te veronderstellen dat deze op het niveau van de vastgestelde

detectielimiet aanwezig waren. Omdat met de ER-CALUX® lagere niveau's aan humane oestrogenen kunnen worden gemeten, kunnen metingen die onder de (chemische) detectielimiet liggen toch relevant zijn voor deze effectmeting.

Uit de berekende oestrogene activiteit blijkt dat van de natuurlijke en synthetische hormonen in influenten, zowel 17 $\beta$ -oestradiol, oestron, oestriol en 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol een relevante bijdrage leveren. De bijdrage van 17 $\alpha$ -oestradiol en mestanol zijn beperkt. In effluenten is 17 $\beta$ -oestradiol over het algemeen de belangrijkste hormoonverstorende stof, gevolgd door oestron. De overige hormonen spelen een ondergeschikte rol. Toch wordt duidelijk uit de verschillen tussen de berekende EEQ's en de maximale EEQ's dat ook stoffen onder de detectielimiet theoretisch nog significant zouden kunnen bijdragen aan de verwachte oestrogene activiteit. In dit verband is met name 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol van belang.

Bisfenol A draagt niet noemenswaardig bij aan de waargenomen activiteit in de ER-calux assay. In het effluent is de theoretische bijdrage maximaal 0,00008 ng EEQ/l. Zelfs in het influent is de bijdrage met een maximaal van 0,00015 ng EEQ/l verwaarloosbaar. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat volgens recente informatie de waargenomen concentraties wel effecten op slakken zouden kunnen hebben: de *No Observed Effect Concentration* voor slakken van 7,9 ng/l wordt in alle effluenten overschreden (Oehlmann *et al.*, 2005).

De extractiemethode die door het IVM is gebruikt om het extract voor onder andere de ER-calux te bereiden, is niet speciaal gericht op de extractie van nonylfenol(ethoxylat)en. Verondersteld wordt daarom dat deze slechts ten dele zijn meegeëxtraheerd en getest in de ER-calux assay. Er is dus niet direct een vergelijking mogelijk tussen de verwachte activiteit o.b.v. chemische gehalten nonylfenol(ethoxylat)en en de gemeten activiteit in de ER-calux. Op basis van de door de UvA gemeten gehalten nonylfenol(ethoxylat)en kan echter berekend worden dat hun theoretische bijdrage aan de oestrogene activiteit in het influent enkele ng EEQ/l kan bedragen maar in het effluent minimaal is (zie tabel 6.2). Voor nonylfenoethoxylaten is er bij de berekening van uitgegaan dat alles als NPEO1 voorkomt (*worst case*).

TABEL 6.2

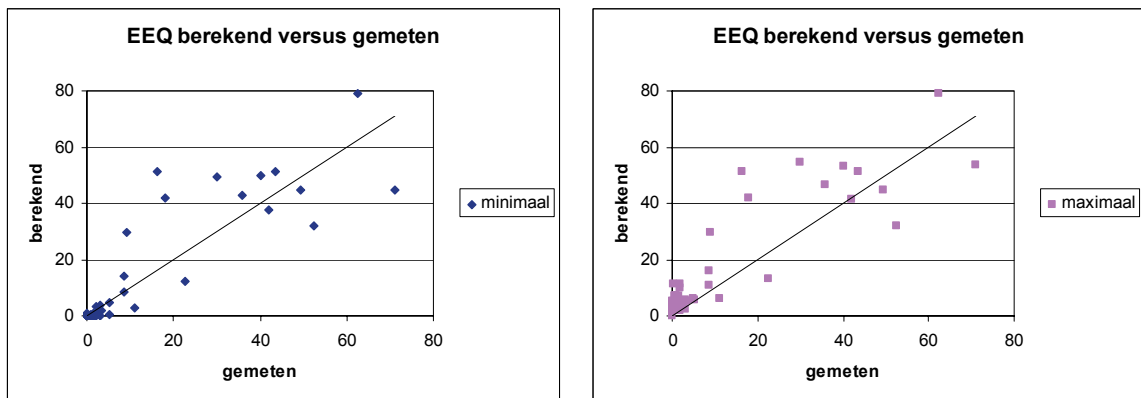
MAXIMALE EN GEMIDDELTE BIJDRAGEN VAN NONYLFENOL(ETHOXYLAT)EN AAN DE GEMETEN OESTROGENE ACTIVITEIT. GEBASEERD OP MAXIMAAL GEMETEN CONCENTRATIES. EEF'S AFKOMSTIG UIT VETHAAK ET AL. (2002)

|           | EEF                 | Influent conc. $\mu\text{g/l}$ | ng EEQ/l | Effluent conc. $\mu\text{g/l}$ | ng EEQ/l |
|-----------|---------------------|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| Maximum   |                     |                                |          |                                |          |
| NP        | $2,3 \cdot 10^{-5}$ | 60                             | 1,7      | 1                              | 0,03     |
| Som NPEOx | $3,8 \cdot 10^{-6}$ | 250                            | 1,0      | 1                              | 0,004    |
| Gemiddeld |                     |                                |          |                                |          |
| NP        | $2,3 \cdot 10^{-5}$ | 25                             | 0,7      | 0,67                           | 0,02     |
| Som NPEOx | $3,8 \cdot 10^{-6}$ | 149                            | 0,6      | 0,63                           | 0,003    |

#### 6.1.4 VERGELIJKING THEORETISCHE EN GEMETEN ACTIVITEIT

In figuur 6.1 worden de theoretische berekende activiteit en de gemeten activiteit vergeleken, zowel voor de minimaal berekende activiteit als de maximaal gemeten activiteit.

FIGUUR 6.1 BEREKENDE OESTROGENE EQUIVALENTEN (EEQ'S) VERSUS DE IN DE ER-CALUX ASSAY GEMETEN EEQ'S IN NG EEQ/L. LINKS IS DE MINIMAAL BEREKENDE EEQ WEERGEGEVEN OP BASIS VAN AANGETOONDE GEHALTEN, RECHTS DE MAXIMAAL BEREKENDE EEQ, WAARBIJ OOK GEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET ZIJN MEEGENOMEN IN DE BEREKENING. DE LIJN GEEFT AAN WANNEER DE BEREKENDE EN DE GEMETEN ACTIVITEIT GELIJK ZIJN



Uit deze figuur blijkt dat in het algemeen de berekende activiteit hoger is dan de gemeten activiteit, zowel voor de minimale als maximale berekende activiteit. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de chemisch bepaalde concentraties van de verschillende oestrogenen gecorrigeerd zijn voor hun recoveries. Dit is niet het geval voor de ER-calux assay. Omdat de recovery minder dan 100% is, betekent dit een overschatting van de berekende EEQ's. Een andere verklaring kan zijn dat er in het extract antagonisten aanwezig zijn, dat wil zeggen stoffen die in de biologische bepaling de oestrogene werking tegen gaan.

In een aantal gevallen is de gemeten activiteit hoger dan de berekende activiteit (punten onder de lijn). Een verklaring hiervoor kan zijn dat de chemisch bepaalde concentraties van de verschillende oestrogenen gecorrigeerd zijn voor hun recoveries. Dit is niet het geval voor de ER-calux assay. Omdat de recovery meer dan 100% is<sup>7</sup>, betekent dit een onderschatting van de berekende EEQ's. Een andere verklaring kan zijn dat er in de extracten onbekende stoffen aanwezig zijn die een positieve respons veroorzaken in de ER-calux assay, maar die niet chemisch gemeten zijn, zoals bij voorbeeld de stoffen die genoemd zijn in bijlage 1.

#### 6.1.5 VERGELIJKING MET ANDERE ONDERZOEKEN

Recent heeft een inventariserend onderzoek naar hormoonverstoorders plaatsgevonden bij diverse conventionele RWZI's in het beheersgebied van Waterschap Reest en Wieden (AquaSense, 2005). Dit onderzoek heeft zich voornamelijk gericht op effectmetingen en op de bijdrage van slib aan de gemeten (rest)activiteit. Behalve influent en effluent is ook rejectiewater en actief slib bemonsterd. Een eerder gepubliceerde samenvatting van deze rapportage is opgenomen in bijlage 9 (Derksen en van der Mark, 2005), het volledige rapport is digitaal beschikbaar in de Hydrotheek.

De belangrijkste conclusies uit het onderzoek zijn dat bij de onderzochte zuiveringen de oestrogene activiteit in het influent en effluent met name geassocieerd lijkt met de zwevend stof fractie. De gehalten in het actief slib lijken te verschillen per zuivering. In de effluenten is in bijna alle gevallen nog een restactiviteit meetbaar. Deze restactiviteit is zodanig dat een oestrogeen effect van het effluent niet uit te sluiten is. Verder blijkt de hoeveelheid oestrogene activiteit die met het rejectiewater wordt teruggedleid naar de zuivering verwaarloosbaar te zijn ten opzichte van de hoeveelheid die via het influent de zuivering in komt.

<sup>7</sup> De recovery lag tussen de 99 en 150%. Een recovery >100% wordt veroorzaakt door storende pieken in de chromatogrammen.

De rol van zwevend stof in het huidige onderzoek is moeilijk vast te stellen. In het huidige onderzoek is het monster voor de analyse van hormonen en de ER-calux assay zoveel mogelijk als geheel (inclusief zwevend slib) opgewerkt. Dit is een bewuste keuze geweest: voor het risico voor het ontvangende milieu is de totale oestrogene activiteit immers van belang. Gevolg is echter wel dat het niet goed mogelijk om is in het huidige onderzoek onderscheid te maken tussen opgeloste gehalten hormonen en gehalten in het zwevend stof en daarmee in de rol van slib in de verwijdering van hormonen en oestrogene activiteit. De influenten en het rejectiewater zijn voorafgaand aan de SPE procedure gefilterd over een glasvezelfilter, de effluenten niet. Hoewel deze filtratie nodig is om analytische problemen te voorkomen, wordt hiermee een deel van de oestrogene activiteit verwijderd. Hoeveel dit is, is niet gekwantificeerd.

Bij de analyse van nonylfenol(ethoxylat)en is de slibfase bij influenten en rejectiewater wel apart geëxtraheerd. De gepresenteerde gehalten zijn totaal gehalten in het water. Het aandeel nonylfenol(ethoxylat)en dat in het influent aan het zwevend stof gebonden is, blijkt aanzienlijk te verschillen binnen en tussen de zuiveringen. De gemiddelde bijdrage van de waterfase aan de totale concentratie is ongeveer 50% voor nonylfenol en 70% voor nonylfenolethoxylaten. Hoe deze verhouding in het effluent ligt is onduidelijk.

In tabel 6.3 wordt ter vergelijking een overzicht gegeven van oestrogene activiteiten zoals gemeten in Nederlandse RWZI's, afkomstig uit diverse literatuurbronnen. Hetzelfde geldt voor de internationale onderzoeken (tabel 2.1).

**TABEL 6.3** OESTROGENE ACTIVITEIT GEMETEN MET BEHULP VAN DE ER-CALUX IN DIVERSE NEDERLANDSE RWZI'S. IN NG/L EEQ TENZIJ ANDERS VERMELD.  
SPE = SOLID PHASE EXTRACTIE; SDB = SPE-EXTRACTIE M.B.V. EEN STYREENDIVINYLBENZEEN POLYMEER

| Referentie                   | Extractiemethode                    | Influent          | Effluent             | Actief slib (ng/kgds)  | Verwijdering (%)            |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|
| Deze studie                  | Glasvezelfilter (alleen infl.), SPE | 9,1 – 71<br>n=12  | 0,18 – 5,2<br>n=20   | -                      | 89,7 – 98,0 (conventioneel) |
| STOWA (2003)                 | n.b.                                | 1,1 – 120<br>n=12 | 0,03 – 16<br>n=12    | -                      | 90 – 95                     |
| Vethaak <i>et al.</i> (2002) | Liquid / liquid                     | 38 – 3.264<br>n=5 | -                    | -                      | -                           |
| Vethaak <i>et al.</i> (2002) | Gefiltr., SDB disks                 | 27 – 109<br>n=?   | 1,2 – 5,7<br>n=?     | 789 – 1.740<br>n=?     | -                           |
| Vethaak <i>et al.</i> (2002) | Ongefiltr., SPE                     | 0,64 – 75<br>n=12 | <d.l. – 0,61<br>n=10 | -                      | 88,0 – 99,9                 |
| Vethaak <i>et al.</i> (2002) | Ongefiltr., SPE                     | 3,8 – 52<br>n=5   | -                    | -                      | -                           |
| AquaSense (2005), stap 1     | Liquid / liquid<br>na bezinken      | 58 – 89<br>n=6    | <0,05 – 0,64<br>n=6  | 2.918 – 3.064<br>n = 2 | 99,3 - >99,9                |
| AquaSense (2005), stap 2     | Liquid / liquid<br>ongefiltreerd    | 84 – 122<br>n=2   | 2,1 – 5,7<br>n=2     | 7.132 – 8.180<br>n=2   | 95,3 – 97,5                 |

Uit deze tabel blijkt dat niet in alle gevallen dezelfde extractiemethode is gebruikt, waardoor de activiteiten niet altijd één op één vergelijkbaar zijn. De activiteiten gemeten na liquid / liquid extractie zijn over het algemeen hoger dan na Solid Phase Extractie. Ondanks verschillen in de extractiemethoden liggen de in het huidige onderzoek gevonden concentraties en



zuiveringsrendementen in dezelfde orde grootte als in andere onderzoeken. De concentraties aan hormoonverstorende stoffen die in dit project gemeten zijn, komen overeen met de concentraties die in andere (internationale) onderzoeken gemeten zijn (tabel 2.1).

## 6.2 INDICATOREN VOOR FECALE VERONTREINIGING EN PATHOGENEN

In deze paragrafen wordt nader ingegaan op de resultaten van de microbiologische bepalingen.

In dit onderzoek is ervoor gekozen om de bemonstering niet steriel uit te voeren, maar te werken met schone potten en van schoon naar vuil te bemonsteren. De resultaten zijn naar verwachting en er zijn geen aanwijzingen gevonden dat dit een slechte keuze was. Bij MBR bijvoorbeeld worden heel lage aantallen micro-organismen aangetroffen, indien er een besmetting zou zijn geweest door niet-schoon werken dan zouden deze waarden veel hoger liggen. Een rekenvoorbeeld: In influent zit ongeveer  $4 \cdot 10^7$  E. coli per liter. Stel 0,05 ml valt in een monsterfles dan is dit  $1,5 \cdot 10^4$  kvd E. coli. Dit is een zo grote hoeveelheid dat dit meteen zichtbaar zou zijn geweest.

Er is een grote spreiding aan indicatoren voor influent van de RWZI's gevonden, wat overeen komt met andere studies. De resultaten van de zandfiltratie zijn wisselend, soms heeft zandfiltratie geen effect (en geeft zelfs hogere aantallen dan na de nabezinkstap) en soms is er wel reductie van micro-organismen. In hoofdstuk 2 is aangegeven dat in drinkwaterzuiveringen een verwijderingsrendement van groter dan 1 LOG-eenheid gevonden wordt. De bepalende factoren hierbij zijn de temperatuur of de aanwezigheid van een schmutzdecke of het gebruikte coagulant. Het is onduidelijk waarom in deze studie zulke wisselende rendementen worden gevonden.

UV geeft een reductie van de micro-organismen, maar de efficiency is laag (30-50%). Zeer waarschijnlijk kan deze desinfectie verbeterd worden door de dosis, intensiteit en de contacttijd te optimaliseren. In vergelijking met drinkwaterzuiveringen is de troebelheid van het te behandelen water veel groter en zullen hoger dosissen, intensiteit en/of contacttijd nodig zijn om vergelijkbare resultaten te verkrijgen.

### 6.2.1 DE HERZIENE EUROPESE ZWEMWATERRICHTLIJN

Eén van de redenen dat pathogenen of de indicatoren hiervoor zijn meegenomen is dat er in 2006 een nieuwe Europese zwemwaternorm van kracht wordt. Het is nu nog niet helemaal duidelijk welke normen het zullen gaan worden, maar voor december 2005 moeten het Europese parlement en de Europese raad hierover eens worden. De voorstellen van deze twee partijen worden hieronder weergegeven. De normen en toetsingscriteria van aanvaardbare kwaliteit zijn nog onduidelijk. De categorie 'aanvaardbaar' zal slechts enkele jaren mogen bestaan, daarna vervalt deze categorie en zal aan de categorie 'goed' moeten worden voldaan.

TABEL 6.4

## VERWACHTTE NORMEN IN DE HERZIENE EUROPESE ZWEMWATERRICHTLIJN: BINNENWATER

|   | A   | B                     | C                  | D                             | E                                  | F                                  |
|---|---|-----------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|   | Parameter   | Uitstekende kwaliteit | Goede kwaliteit    | Aanvaardbare kwaliteit (Raad) | Aanvaardbare kwaliteit (Parlement) | Referentiemethoden voor de analyse |
| 1 | Intestinale enterococcon (kve <sup>a</sup> /100 ml) | 200 <sup>b</sup>      | 400 <sup>b</sup>   | 360 <sup>c</sup>              | 450 <sup>b</sup>                   | ISO 7899-1 of ISO 7899-2           |
| 2 | Escherichia coli (kve/100 ml)                       | 500 <sup>b</sup>      | 1.000 <sup>b</sup> | 900 <sup>c</sup>              | 1.100                              | ISO 9308-3 of ISO 9308-1           |

<sup>a</sup> kvd = kve= kolonievormende deeltjes of eenheden; <sup>b</sup> gebaseerd op een beoordeling van het 95-percentiel;

<sup>c</sup> gebaseerd op een beoordeling van het 90-percentiel.

TABEL 6.5

## VERWACHTTE NORMEN IN DE HERZIENE EUROPESE ZWEMWATERRICHTLIJN: KUST- EN OVERGANGSWATER

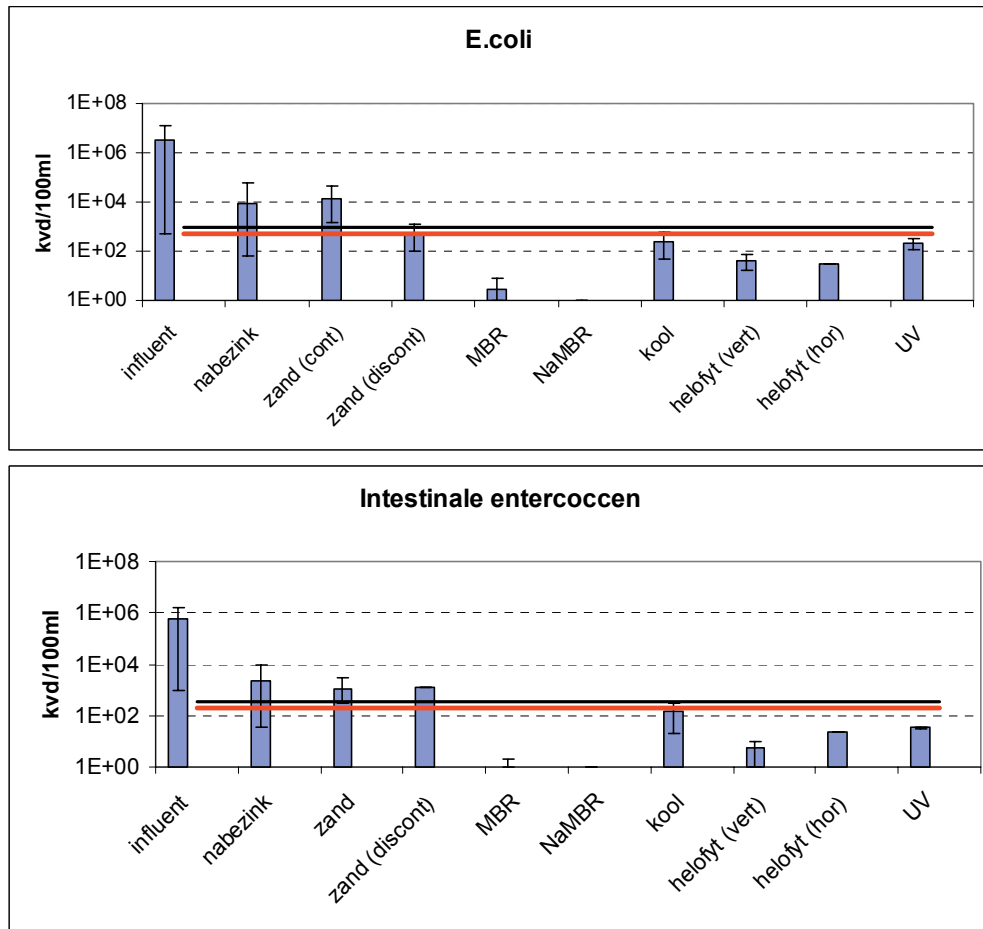
|   | A                                     | B                     | C                | D                             | E                                  | F                                  |
|---|---------------------------------------|-----------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|   | Parameter                             | Uitstekende kwaliteit | Goede kwaliteit  | Aanvaardbare kwaliteit (Raad) | Aanvaardbare kwaliteit (Parlement) | Referentiemethoden voor de analyse |
| 1 | Intestinale enterokokken (kve/100 ml) | 100 <sup>a</sup>      | 200 <sup>a</sup> | 200 <sup>b</sup>              | 250 <sup>a</sup>                   | ISO 7899-1 of ISO 7899-2           |
| 2 | Escherichia coli (kve/100 ml)         | 250 <sup>a</sup>      | 500 <sup>a</sup> | 500 <sup>b</sup>              | 550 <sup>a</sup>                   | ISO 9308-3 of ISO 9308-1           |

<sup>a</sup> gebaseerd op een beoordeling van het 95-percentiel; <sup>b</sup> gebaseerd op een beoordeling van het 90-percentiel.

De in deze studie gevonden data zijn vergeleken met een aantal categorieën van de voorgestelde herziene Europese Zwemwaterrichtlijn. Dit is weergegeven in figuur 6.2.

FIGUUR 6.2

GEMIDDELTE GEHALTEN E. COLI (BOVEN) EN INTESTINALE ENTEROCOCCEN (ONDER) VERGELEKEN MET DE HERZIENE ZWEMWATERNORM VOOR DE CATEGORIE 'UITSTEKEND (RODE LIJN) EN DE CATEGORIE 'AANVAARDBAAR' VOORGESTELD DOOR DE EUROPESE RAAD (ZWARTE LIJN)' VOOR BINNENWATER. DE MARGES GEVEN DE MINIMUM EN MAXIMUMCONCENTRATIE AAN. VOOR HET BEREKENEN VAN DE GEMIDDELDEN IS VOORGEHALTEN ONDER DE DETECTIELIMIET DE DETECTIELIMIET GENOMEN



Uit deze vergelijking blijkt dat (nageschakelde) MBR in staat is om de effluentkwaliteit te laten voldoen aan de nieuwe Europese Zwemwaterrichtlijn. Zandfiltratie is niet voldoende en het effluent uit actief-koolfilter, UV en een helofytenfilter voldoen waarschijnlijk net. Bij een verbeterd ontwerp van de UV-installatie (dosis, contacttijd) zal deze norm wel gemakkelijk gehaald worden.

De metingen van deze indicatoren aan het helofytenfilter zijn slechts enkele keren uitgevoerd en er zijn ook metingen gedaan aan een pathogeen, namelijk *Campylobacter* (zie 6.2.2).

### 6.2.2 CAMPYLOBACTER EN F-SPECIFIEKE BACTERIOFAGEN

De resultaten van F-specifieke bacteriofagen zijn over het algemeen vergelijkbaar met de resultaten van de bacteriële indicatoren. Het blijkt wel dat deze indicator beter is voor de geavanceerdere zuiveringen, zoals MBR, actiefkool filter, helofytenfilter en UV. Een MBR blijkt sporadisch nog een virusdeeltje door te laten.

*Campylobacter* is in deze studie meegenomen om te kijken of een pathogeen ook goed verwijderd wordt én om te kijken of er vervuiling van een helofytenfilter door vogels kan plaatsvinden. In het helofytenfilter van RWZI I (horizontaal doorstroomd) is in de zomer een aanzienlijk toename gevonden. De aanwezigheid van vogels in de filters wordt bevestigd door

de medewerkers van de RWZI. Ook het verloop van de gehalten in de tijd (relatief hoog in de zomer en relatief laag in de winter, zie figuur 5.6) sterkt het vermoeden dat deze verontreiniging samenhangt met de aanwezigheid van vogels opgemerkt dient te worden dat er slechts drie maal bemonsterd is en om betrouwbare uitspraken te doen is meer onderzoek naar de aanwezigheid van pathogenen in helofytenfilters noodzakelijk.

Het verticaal doorstroomd helofytenfilters van RWZI D is alleen in de relatief koudere maanden gemeten en hier is geen toename van verontreiniging aangetroffen. Verwacht wordt dat een verticaal doorstroomd filter wel vervuild kan worden door feces van vogels, maar doordat er een bodempassage plaats vind zal dit effect veel minder impact hebben.

### 6.2.3 VERWIJDERINGSRENDEMENT

Alle RWZI's verwijderen indicatoren voor fecale verontreiniging. Echter, een 90% verwijdering zegt onvoldoende. Een betere maat is de LOG-verwijdering.

In het influent zit ongeveer  $4 \cdot 10^7$  *E. coli* per 100 ml. Om dit adequaat te verwijderen en te voldoen aan de normen (stel 1.000 per 100 ml) is een verwijdering van minimaal 4 LOG-eenheden nodig. Dit is een verwijderingrendement van minimaal 99,99%.

# 7

## CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

### 7.1 CONCLUSIES

Ten aanzien van natuurlijke en synthetische hormonen worden de volgende conclusies getrokken:

- In het influent van de RWZI's is oestron en oestriol in hoge concentraties en 17 $\alpha$ - en 17 $\beta$ -oestradiol en 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol in lagere concentraties aangetroffen;
- Geen van de bemonsterde zuiveringstechnieken verwijdert alle oestrogene activiteit (gemeten met de ER-calux);
- In het effluent van de RWZI's wordt, ook na aanvullende zuivering, incidenteel 17 $\beta$ -oestradiol en regelmatig oestron aangetroffen.

Ten aanzien van bisfenol A worden de volgende conclusies getrokken:

- Bisfenol A wordt in het RWZI-influent in een concentratie van gemiddeld circa 1.000 ng/l aangetroffen, met een enkele uitschieter naar 2.000 – 3.000 ng/l. Bisfenol A wordt door geen van de nageschakelde technieken volledig verwijderd;
- De restconcentraties bisfenol A dragen niet significant bij aan de gemeten oestrogene activiteit in de ER-calux assay. De restconcentraties kunnen echter wel een risico vormen voor slakken;

Ten aanzien van nonylfenol(ethoxylat)en worden de volgende conclusies getrokken:

- In het RWZI-influent worden hoge concentraties gemeten (gemiddeld enkele tientallen tot honderden  $\mu\text{g/l}$ ). Er zijn grote verschillen in influentconcentraties, zowel op een individuele RWZI, als tussen de RWZI's onderling. In alle gevallen is de influentconcentratie van de langere nonylfenoethoxylaatketens (NPEO10) het hoogst is;
- In het influent bedraagt de gemiddelde bijdrage van de waterfase aan de totale concentratie ongeveer 50% voor nonylfenol en 70% voor nonylfenoethoxylaten. In enkele gevallen is een trend te zien waarin de bijdrage van de waterfase aan de totale concentratie toeneemt in de volgorde NPEO1, NPEO2 en NPEO10, wat in overeenstemming is met de hogere oplosbaarheid van de NPEO's met een langere ethoxylaatketen;
- Na de aanvullende zuivering zijn de concentraties nonylfenol en de som van nonylfenoethoxylaten afgenomen tot <2  $\mu\text{g/l}$ , wat overeenkomt met een gemiddeld zuiveringsrendement van >95% voor de individuele stoffen. Na aanvullende zuivering is het aandeel hogere ethoxylaten sterk afgenomen en blijft vooral nonylfenol over;
- Nonylfenol komt in het effluent voornamelijk aan slib gebonden voor;
- In rejectiewater zijn relatief hoge concentraties nonylfenol aangetroffen (gemiddeld 18,7  $\mu\text{g/l}$ , vooral aan slib gebonden). De berekende vrachten vallen in het niet bij de vracht die aanwezig is in het RWZI-influent en kunnen daarom verwaarloosd worden;
- Vooral nonylfenol kan enigszins bijdragen aan de restactiviteit zoals gemeten met de ER-calux assay (max. 0,03 ng EEQ/l), nonylfenoethoxylaten dragen nauwelijks bij aan de restactiviteit.

Ten aanzien van de oestrogene activiteit worden de volgende conclusies getrokken:

- De oestrogene activiteit zoals gemeten met de ER-calux assay laat een vergelijkbaar maar consistent beeld zien als de chemische analyses. Individuele stoffen blijken vaak in concentraties onder de detectielimiet te liggen, maar in alle monsters wordt wel een oestrogene activiteit gemeten;
- Het zuiveringsrendement van de RWZI's varieert tussen de 90 en 98% met restactiviteiten van 0,18 – 5,2 ng EEQ/l;
- Het zuiveringsrendement van de MBR varieert tussen de 96 en 99,9% met restactiviteiten van 0,09 – 1,6 ng EEQ/l;
- De nageschakelde MBR en het actief kool filter laten een verwijdering zien van de oestrogene activiteit tot een zeer lage restactiviteit van respectievelijk <0,10 ng EEQ/l en <0,73 ng EEQ/l;
- Zandfilters geven een wisselend rendement, met zowel toename als afname van de oestrogene activiteit (-65% tot 68%). De restactiviteit ligt varieert van 0,20 tot 3,4 ng EEQ/l;
- In het horizontaal doorstroomd helofytenfilter van RWZI I worden relatief hoge restactiviteiten waargenomen (3 – 23 EEQ ng/l). In alle gevallen betreft het een toename ten opzichte van het inkomende water. In het verticaal doorstroomd helofytenfilter van RWZI D worden echter zeer lage restactiviteiten (0,12 – 0,14 ng EEQ/l) waargenomen. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat de activiteit van het water dat het filter binnen komt wel reeds lager is als bij RWZI I (0,93 – 1,0 ng/l voor RWZI D tegen 2,0 – 5,2 ng/l voor RWZI I);
- In rejectiewater wordt relatief hoge oestrogene activiteit gemeten (8,7 – 11,1 EEQ ng/l). Dit is circa de helft van de activiteit in het influent op de betreffende RWZI, maar vele malen minder dan de vracht die via RWZI-influent wordt behandeld;
- De berekende activiteit is over het algemeen hoger dan de gemeten activiteit. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de stoffen niet volledig concentratie-additief werken maar elkaar verzwakken. Ook kunnen er in het extract antagonisten aanwezig zijn, dat wil zeggen stoffen die in de biologische bepaling de oestrogene werking tegen gaan.

In vergelijking met andere onderzoeken blijkt dat:

- De gevonden concentraties en effecten liggen binnen ranges die in andere onderzoeken gemeten zijn.

Ten aanzien van de (milieu)relevantie wordt geconcludeerd dat:

- De restconcentraties zijn ook na de aanvullende zuiveringsstap milieurelevant. De bijdrage in het RWZI-effluent is vooral afkomstig van de natuurlijke hormonen oestron en 17  $\beta$ -oestradiol en in mindere mate nonylfenol. Ook hormonen die onder de detectielimiet aanwezig zijn (m.n. 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol) kunnen echter bijdragen. De gemeten *in vitro* activiteit is echter moeilijk direct door te vertalen naar *in vivo* effecten bij waterorganismen omdat zowel de effectconcentraties als de oestrogene potentie in organismen verschillen van ER-calux assay;
- Een vergaande reductie van hormoonverstorende stoffen is in dit onderzoek aangetoond voor actief koolfiltratie en voor de nageschakelde MBR. Ook een MBR (in plaats van een conventionele RWZI) laat een vergaande reductie van deze stoffen zien. Zandfiltratie levert voor de verdere reductie van hormoonverstorende stoffen maximaal een bijdrage van 68%;
- Bij een horizontaal helofytenfilter worden door uitwerpselen van vogels oestrogene activiteit en pathogenen geïntroduceerd. Een verticaal helofytenfilter is in staat om lage effluentconcentraties te bereiken.

Ten aanzien van pathogenen blijkt dat:

- Pathogene indicatoren worden in een conventionele RWZI verwijderd met 2 LOG-eenheden;
- De normen voor pathogenen voor de Europese Zwemwaternorm wordt alleen gehaald door (nageschakelde) MBR, actief-koolfilter en UV;
- Om de Europese Zwemwaternormen te halen is een verwijdering van minimaal 4 log-eenheden nodig (minimaal 99,99%).

## 7.2 AANBEVELINGEN

In het kader van het hier gerapporteerde project zijn er enkele indicatieve metingen uitgevoerd op een aantal RWZI's en een beperkt aantal mogelijk aanvullende zuiveringstechnieken. Met conventionele zuiveringen wordt reeds een hoog zuiveringsrendement behaald. Desondanks is de restactiviteit in het RWZI-effluent nog steeds milieurelevant. Meer aandacht voor de effectiviteit van zuiveringstechnieken in het verwijderen van oestrogene activiteit is daarom gewenst. Uit onderhavig onderzoek blijkt dat het meten van de ER-calux meer informatie oplevert dan het meten van individuele stoffen. De individuele stoffen worden namelijk onder de detectielimiet aangetroffen, terwijl wel oestrogene activiteit wordt gemeten. Daarom wordt aanbevolen om in lopende en nog op te stellen monitoringsprogramma's de totale oestrogene activiteit te meten. Indien meer detailinformatie gewenst is, wordt aanbevolen om  $17\beta$ -oestradiol, oestron en mogelijk ook  $17\alpha$ -ethinyloestradiol te meten, aangezien deze de belangrijkste oestrogene activiteit hebben per individuele stof.

In dit onderzoek zijn voor de bepaling van de ER-calux assay de hormoonverstorende stoffen geëxtraheerd via een methode die nonyl-phenol(ethoxylat)en slechts beperkt in de vloeistof-fase laat opnemen. Het gevolg daarvan is dat de hormoonverstoring van deze stoffen slechts beperkt meegenomen is. Ook andere methoden voor extractie zijn beschikbaar en moeten verder gevalideerd worden en waar mogelijk gestandaardiseerd.

Over de rol van zwevende stof in relatie tot de hormoonverstorende stoffen is onvoldoende bekend. Onderzoek geeft zowel een prominente rol als een ondergeschikte rol aan. Omdat de rol van slib van belang is voor de effectiviteit en de keuze van een nageschakelde techniek, verdient dit aspect nader onderzoek.

De effectiviteit van de zandfiltratie verdient vanwege de zeer wisselende resultaten nader onderzoek, temeer omdat er uit ander onderzoek naar voren komt dat de restactiviteit voor een belangrijk deel met het zwevend stof zou zijn verbonden. Zandfiltratie zou een effectieve techniek kunnen zijn om de slibgebonden fractie te verwijderen. Onderzoek zou zich moeten richten op de invloed van het ontwerp en de procescondities van het zandfilter in relatie tot het zuiveringsrendement.

Andere potentieel geschikte aanvullende zuiveringstechnieken die nog onvoldoende onderzocht zijn, zijn technieken die deze stoffen adsorberen (actief kool, korrelkool of poederkool) en technieken die deze stoffen afbreken (UV, ozonisatie, geavanceerde oxidatie) of nanofiltratie. Deze andere zuiveringstechnieken verdienen dan ook aandacht.

De hier genoemde technieken zijn op grote schaal voor de behandeling van RWZI-effluent nog nauwelijks toegepast. In de productie van drink- en proceswater is hiermee wel ervaring opgedaan. Voor de Nederlandse situatie zal ook voor de behandeling van RWZI-effluent ervaring met deze technieken moeten worden opgedaan.

Op de middellange en lange termijn verdient een aanpak aan de bron de voorkeur. Hierbij moet bijvoorbeeld gedacht worden aan urinescheiding, technische aanpassingen aan middelen ('de pil') waarbij de uitscheiding zoveel mogelijk wordt beperkt en het apart houden en behandelen van (geconcentreerde) afval(water)stromen. Een dergelijke aanpak biedt de kans om tegelijkertijd ook de belasting van het oppervlaktewater met stikstof en fosfaat, alsmede met restanten van geneesmiddelen terug te dringen.

Kennis over en met name de praktijkervaring met desinfectie van RWZI-effluent is in Nederland nog schaars. Een goede inventariserende studie om in kaart te brengen welke projecten zijn uitgevoerd en welke bevindingen er met desinfectietechnieken zijn ten aanzien van verbetering van de bacteriologische kwaliteit, onderhoud, kosten etcetera wordt aanbevolen in het licht van de nieuwe Europese Zwemwaterrichtlijn.

In het algemeen is er enige kennis over indicatoren voor fecale verontreiniging. De relatie met ziekteverwekkers en de risico's voor de mens zijn nog onvoldoende onderzocht. Het wordt aanbevolen om bij projecten zoveel mogelijk pathogenen en indicatoren mee te nemen om op deze manier de kennis van het vóórkomen en reductie van ziekteverwekkers en indicatoren te vergroten.



## 8

## LITERATUUR

AquaSense (2005). Verkennend onderzoek naar hormoonverstorende stoffen in het beheersgebied van Waterschap Reest en Wieden. In opdracht van Waterschap Reest en Wieden. AquaSense rapportnummer 2360. Digitaal beschikbaar via: <http://library.wur.nl/ebooks/1787880.pdf>.

Belfroid, A.C., Horst, A. van der, Vethaak, A.D., Schäfer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J. en Cofino, W.P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Science of the Total Environment*, 225, 101-108.

Belfroid, A.D., Murk, A.J., de Voogt, P., Schäfer, A.J., Rijs, G.B.J., Vethaak, A.D. (1999) Endocrine-disrupting compounds in water systems: A pilot study of the occurrence of estrogenic compounds in surface and wastewater in the Netherlands. RIZA/RIKZ rapport 99.007/99.024.

Bronda, R. (2003). Kosteneffectiviteitsanalyse herziening EU Zwemwaterrichtlijn. RIZA rapport 2003.011.

EU (2000). Tekst Europese Kaderrichtlijn Water. Richtlijn 2000/60/EG

Friedrich, H., Ries, T. en Hannich, C.B. (2005). Kommunale Kläranlagen als Eintragspfad für organische Spurenschadstoffe in die aquatische Umwelt. *KA – Abwasser, Abfall* 52(3), 279-292.

Gerritsen, A.A.M., Rijs, G.B.J., Klein Breteler, J.G.P. en Lahr, J. (2003). Oestrogene effecten in vissen in regionale wateren. RIZA-rapport 2003.019, Lelystad, 2003.

Grontmij (2004). Richtgetallen voor emissiebronnen voor zwemwaterprofiel. Handreiking voor waterbeheerders. Rapportnummer xxxx

Houtman, C.J., Oostveen, A.M. van, Brouwer, A., Lamoree, M.H. en Legler, J. (2004). Identification of estrogenic compounds in fish bile with bioassay directed fractionation. *Environmental Science and Technology* 38, 6415-6423.

Jonkers, N., Knepper, T.P. en Voogt P. de (2001) Aerobic biodegradation studies of nonylphenol polyethoxylates in river water using liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 35, 335-340

Legler, J., Jonas, A., Lahr, J., Vethaak, A.D., Brouwer, A. en Murk, A.J. (2002). Biological measurement of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the in vitro ER CALUX reporter gene assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(3), 473-479.

Legler, J. en Hopman-Ubbels, G. (2003). ACE project annual report 2003. Unpublished results.

Lodder, W.J. en De Roda Husman, A.M. (2005). Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3), 1453-1461.

NEN-EN-ISO 9308-1:2000 en. Water – Detectie en enumeratie van *Escherichia coli* en bacteriën van de coligroep – Deel 1: Methode van membraanfiltratie.

NEN-EN-ISO 7899-2:2000 en. Water – Detectie en telling van enterococcon – Deel 2: membraanfiltratiemethode.

NEN-EN-ISO 10705-1:2001 en. Water – Detectie en telling van bacteriofagen – deel 1: telling van F-specifieke RINA-bacteriofagen.

NEN 6269:1996 nl. Bacteriologisch onderzoek van water - Onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele Campylobacter-bacteriën.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Bachmann, J., Oetken, M., Lutz, I., Kloas, W. en Ternes, T.A. (2005). Bisphenol A as a potent xeno-estrogen in prosobranch molluscs – results from low concentration experiments. Abstract SETAC meeting, 22-26 May 2005, Lille, France.

RIVM (1996). Eliminatie van virussen, Cryptosporidium en Giardia door drinkwaterzuiveringsprocessen. (Medema, G.J. en Theunissen, J.). RIVM-rapport 289202016.

RIZA (2005). Handreiking voor het opstellen van een zwemwaterprofiel (versie 21-06-05).

STOWA (2003). Verwijdering van hormoonverstorende stoffen in rioolwaterzuiveringsinstallaties. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, STOWA-rapport 2003-15, Utrecht.

STOWA (2004). Prioritering geneesmiddelen en hormoonverstorende stoffen voor oppervlaktewaterbeheerders. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Utrecht. Rapportnummer 2004-W04.

Ternes, T.A., Janex-Habibi, M.-L., Knacker, T. Kreuzinger, N. en Siegrist, H. (2004). Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse. POSEIDON, detailed report related to the overall duration: January 1<sup>st</sup>, 2001 – June 30<sup>th</sup>, 2004. POSEIDON project, contract no. EVK1-CT-2000-00047.

Vethaak, A.D., Rijs, G.B.J., Schrap, S.M., Ruiters, H., Gerritsen, A., en Lahr, J. (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands. Occurrence, Potency and Biological Effects. RIZA en RIKZ. RIZA/RIKZ-rapport 2002.001, Lelystad/##, 2002.

Voogt, P. de, Kwast, O., Hendriks, R. en Jonkers, C.C.A. (2000). Alkylphenol ethoxylates and their degradation products in abiotic and biological samples from the environment. *Analysis* 28(9), 776-782.

Zhao, M., Wielen, F.W.M. van der en Voogt, P. de (1999). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylphenol ethoxylates in biological tissues. *Journal of Chromatography A*, 837, 129-138.



**BIJLAGE 1**

# VOORSELECTIE HORMOONVERSTORENDE STOFFEN VOOR MONITORING RWZI'S

UITGANGSPUNT: STOFFEN DIE GESELECTEERD ZIJN IN DE STOWA LITERATUURSCAN (STOWA, 2003) OF DOOR RPS ADVIES (STOWA, 2004)

| Stofgroep                                 | Stof  | STOWA literatuurscan | RPS advies      | Deze studie                                     |
|---|---|----------------------|-----------------|---|
| Natuurlijke hormonen                      | 17 $\beta$ -oestradiol (E2)   | x                    | -               | x   |
|   | 17 $\alpha$ -oestradiol   | x                    | -               | x   |
|   | Oestron (E1)  | x                    | x               | x   |
|   | Oestriol (E3)   | x                    | -               | x   |
|   | 16 $\alpha$ -hydroxyoestron e.a.  | x                    | -               | x   |
|   | Progesteron   | n.v.t.               | n.v.t.          | Alleen indien reeds in pakket opgenomen         |
|   | Testosteron   | x                    | -               | x   |
|   | Dihydrotestosteron  | x                    | -               | x   |
|   | 11-ketotestosteron  | x                    | -               | x   |
| Synthetische hormonen                     | 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol  | x                    | x               | x   |
|   | Mestranol   | -                    | x               | x   |
| Alkylfenolen<br>(detergenten)             | 4-tert-octylfenol   | x                    | -               | (x)   |
|   | Nonylfenol  | x                    | -               | x   |
|   | Octylfenoethoxylaten  | x                    | -               | (x)   |
|   | Nonylfenoethoxylaten  | x                    | x               | x   |
| Bisphenol A                               | Bisphenol A   | x                    | x               | Alleen indien relevant voor RWZI                |
| Ftalaten<br>(weekmakers)                  | Bytylbenzylftalaat (BBP)  | x                    | -               | -   |
|   | Di-(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP)   | x                    | x               | -   |
|   | Di-n-butylftalaat (DBP)   | x                    | x               | -   |
|   | Diethylftalaat (DEP)  | x                    | x               | -   |
|   | Dimethylpropylftalaat (DMPP)  | x                    | -               | -   |
|   | Dipropylftalaat (DPP)   | x                    | -               | -   |
|   | Dicyclohexylftalaat (DCHP)  | x                    | -               | -   |
|   | Di-n-octylftalaat (DOP)   | x                    | -               | -   |
|   | Dimethylftalaat (DMP)   | x                    | -               | -   |
| Bestrijdingsmiddelen                      | Amitrol   | x                    | -               | Indien veel voorkomend en/of eenvoudig te meten |
|   | Atrazine  | -                    | x               | Alleen indien aangetoond in RWZI                |
|   | Toxafeen  | -                    | x (zo mogelijk) | Alleen indien aangetoond in RWZI                |
|   | Hexachloorhexanen   | n.v.t.               | x (zo mogelijk) | Alleen indien aangetoond in RWZI                |
|   | Als stofgroep lage prioriteit? Meeste bestrijdingsmiddelen in literatuurscan niet geselecteerd vanwege oud bestrijdingsmiddel, geen toepassing meer toegelaten of niet gebruikt op verharde oppervlakten (dus niet in RWZI)<br>Bovendien aanwijzingen voor ecologisch relevante hormoonverstoring niet altijd even duidelijk en onduidelijk in hoeverre de RWZI een belangrijke verspreidingsroute is |                      |                 |   |
| Brandvertragers                           | Polybroombifenylenethers (PBDE's)   | x                    | -               | -   |
| Alkylparabenen<br>(conserveringsmiddelen) | Methylparabeen  | n.v.t.               | n.v.t.          | Alleen indien                                   |
|   | Ethylparabeen   | n.v.t.               | n.v.t.          | eenvoudig te                                    |
|   | Propylparabeen  | n.v.t.               | n.v.t.          | meten   |

NB RPS advies lijkt uit te gaan van voorkomen in oppervlaktewater. Er zijn echter andere routes naar opp.water dan RWZI

Nadruk in deze studie dient te liggen verspreiding via RWZI (als mogelijkheid om daar de emissie te beperken)

| Motivatie stof of stofgroep  | oorsprong  |
|--|--|
| <p>Potente vrouwelijke hormonale stoffen en aangetoonde 'boosdoeners'; worden uit elkaar gevormd of omgezet dus allen meenemen</p> <p>NB deel wordt geconjugeerd uitgescheiden, kan weer geactiveerd worden</p> <p>Nog nauwelijks onderzocht vrouwelijk hormoon (natuurlijk en in pil?)</p> <p>Mannelijke hormonale stoffen en metabolieten; nog nauwelijks onderzocht</p>         | de mens  |
| <p>Zeer potente hormonale stoffen</p> <p>Over mestranol nog weinig bekend</p>  | de 'pil'   |
| <p>Relatief potente xeno-oestrogenen; Aangetoonde boosdoener'; Nonylfenol hoopt op; Slechte afbraak alkylfenolen en ethoxylaten met korte ketens;</p> <p>Veel in influent aangetoond, weinig in opp.water</p> <p>Octylfenolen en -ethoxylaten nauwelijks aangetoond</p>  | (industriële) schoonmaakmiddelen, textiel, leer en cosmetica                     |
| <p>Vooral industriële oorsprong; Hoge conc. in effluent (slechte afbraak) maar weinig potente hormoonverstoorder; geen aanwijzingen dat milieuconcentraties effect kunnen veroorzaken</p>  | coatings, verpakkings-materiaal, drukinkt, plastic, pesticiden, nagellak en cd's |
| <p>Als stofgroep lage prioriteit want slechts licht oestrogeen, tevens anti-androgeen</p> <p>Zitten vooral aan slib, hoewel ook aangetoond in RWZI; ook aangetoond in vis;</p> <p>Niet meenemen, vnl. omdat moeilijk te meten</p>  | plastics en oplos- of fixatie-middel in parfum, bodylotion en andere cosmetica   |
| <p>Toegepast op verharde oppervlakten dus te verwachten in RWZI</p> <p>Matige verwijdering verwacht</p> <p>Oud bestrijdingsmiddel, nooit in NL gebruikt, wel aangetoond in opp. water, voorkomen in RWZI onduidelijk, zeer toxisch; absorptie belangrijkste verwijderingsmechanisme</p> <p>Oud bestrijdingsmiddel, voorkomen in RWZI onduidelijk, matig tot goede verwijdering</p> | Landbouw, stedelijke omgeving  |
| <p>Als groep lage prioriteit want weinig potente oestrogenen (ca. 300.000 keer minder dan 17<math>\beta</math>-oestradiol); verstoren vooral schildklierhormonen; zitten voornamelijk aan slib gebonden</p>  | elektronica, in kunststofproducten en textiel                                    |
| <p>Interessant nieuwe groep, nog nauwelijks onderzocht;</p> <p>In Belgische studie als belangrijke 'boosdoener' in effluent aangemerkt.</p>  | Persoonlijke verzorgingsproducten  |



## BIJLAGE 2

# MONSTERNAMEPROTOCOL EN SCHEMA RWZI'S + OVERZICHT BEMONSTERING MONSTERNAMEPROTOCOL

## TYPE METINGEN

Het monitoringsprogramma bestaat uit drie groepen van bepalingen te weten, namelijk:

### 1 Routinematige metingen

Bij elke meetronde worden een aantal routinematige metingen meegenomen ter controle van het normaal functioneren van de RWZI. Het betreft onder andere CZV, BZV, zwevend stof,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NKj}$ ,  $\text{PO}_4$  en  $\text{P}_{\text{totaal}}$ . Daarnaast is het ook wenselijk de temperatuur van het actiefslibstelsysteem te vermelden. Deze bepalingen zullen routinematig door beheerders van RWZI's worden uitgevoerd. Er wordt dan ook van uit gegaan dat deze bepalingen door medewerkers van de RWZI uitgevoerd kunnen worden. Indien dit niet het geval is wordt u verzocht contact op te nemen met AquaSense.

### 2 Hormoonverstoorders

De monitoring richt zich uitsluitend op stoffen die een vervrouwelijkende werking hebben. In het onderzoek worden naast natuurlijke vrouwelijke hormonen ook een tweetal synthetische hormonen bepaald die worden toegepast in 'de pil'. Naast deze stoffen worden een aantal alkylfenol(ethoxylat)en gemeten. Deze stoffen worden toegepast als industriële detergents. De meting beperkt zich tot die alkylfenol(ethoxylat)en met de grootste hormoonverstorende potentie. Daarnaast zal een effectmeting, de ER-calux, worden uitgevoerd. Met deze meting wordt het gezamenlijk effect van alle vervrouwelijkende stoffen tezamen bepaald.

### 3 Indicatoren voor fecale verontreiniging en pathogenen

Als indicatie voor de aanwezigheid van pathogenen zullen een aantal indicatoren voor fecale verontreiniging worden bepaald. Deze indicatoren zijn conform de bepalingen die in de toekomstige Europese zwemwaterrichtlijn worden voorgeschreven. Tevens zal bij een RWZI met een helofytenfilter de aanwezigheid van *Campylobacter* bepaald worden.

Een en ander wordt toegelicht in tabel B2.1. In deze tabel is tevens aangegeven welke code wordt gebruikt voor de analyse en door wie de analyse wordt uitgevoerd. N.B. De monsters worden naar hetzij AquaSense hetzij het Waterlaboratorium gestuurd (zie volgende paragraaf).



TABEL B2.1 METINGEN HORMOONVERSTOORDERS EN PATHOGENEN IN RWZI'S

| Code                            | Analyse   | Bepaling van  | Uitvoering analyse              |
|---------------------------------|---|---|---------------------------------|
| <b>Algemeen</b>                 |   |   |                                 |
| routine-matig                   | Routinematige metingen                                | Indicatie functioneren RWZI:<br>in ieder geval CZV, BZV, zwevend stof, NH <sub>4</sub> , NO <sub>3</sub> , NKj, PO <sub>4</sub><br>en P <sub>totaal</sub> en indien mogelijk de temperatuur van het actief<br>slibstelsysteem | Door RWZI of Waterschap<br>zelf |
| <b>Hormoonverstoorders</b>      |   |   |                                 |
| HORM                            | Hormonen  | Natuurlijke vrouwelijke hormonen,<br>17 alfa ethynloestradiol ('pil'), mestranol ('pil')  | IVM                             |
| ALKYL                           | Alkylfenol(ethoxylat)en                               | Industriële detergenten met een vervrouwelijkende werking:<br>Nonylfenol<br>Nonylfenolmonoethoxylaat<br>Nonylfenoldiethoxylaat  | UvA                             |
| CALUX                           | ER-calux  | Effect van alle stoffen met een vervrouwelijkende<br>werking tezamen  | BDS                             |
| <b>Pathogenen (indicatoren)</b> |   |   |                                 |
| COLI                            | Intestinale enterococci<br>en <i>Escherichia coli</i> | Indicatororganismen fecale verontreiniging uit<br>zwemwaterriichtlijn   | Waterlaboratorium               |
| FAAG                            | F-specifieke bacteriofagen                            | Indicator humane virussen   | Waterlaboratorium               |
| CAMP                            | Campylobacter   | Ziekteverwekker o.a. afkomstig van gevogelte  | Waterlaboratorium               |

### MONSTERNAMEPROTOCOL

- Bemonstering door waterschap / zuivering.
- Bemonstering dient plaats te vinden bij droogweeraanvoer (DWA). Omdat de concentraties van de te meten stoffen laag zijn, lopen we bij regenweeraanvoer (RWA) namelijk het risico dat de waarden onder de detectielimiet komen te liggen. Gezien de hoge analysekosten zullen we hier dus zeer alert op moeten zijn. In deze vragen we u om enige flexibiliteit in de planning. We hopen echter dat het weer ons mee gaat zitten tijdens de bemonsteringsperiode. Indien niet dan zullen wij u per e-mail verzoeken de bemonstering uit te stellen. Kijk voor de bemonstering bij minder weer dus eerst even in uw e-mailbox.
- Waterschap / zuivering verzorgt gekoeld transport naar AquaSense en het Waterlaboratorium binnen 24 uur na monstername (zie paragraaf 3 en 4 voor details). N.B. Analyse van indicatoren voor fecale verontreinigingen en pathogenen is niet zinvol als de monsters niet binnen 24 uur na monstername worden ingezet. Indien (gekoeld) transport niet mogelijk is wordt u verzocht contact op te nemen met mevrouw Derksen van AquaSense.
- Er zal tenminste twee maal bemonsterd worden. Op basis van de resultaten van de analyses van de eerste twee bemonsteringen wordt besloten of een derde bemonstering en daarmee analyse wenselijk is. Alkylfenol(ethoxylat)en vormen een uitzondering en zullen slecht twee maal bemonsterd worden.
- Gekoelde debietproportioneel 24-uurs bemonstering. Indien gekoelde bemonstering niet mogelijk is graag contact opnemen met mevrouw Derksen van AquaSense. Indien debietproportionele bemonstering niet mogelijk is kunnen steekmonsters genomen worden. In dat geval graag aangeven hoe de steekmonsters genomen zijn, d.w.z. eenmaal per dag één steekmonster of meerdere steekmonsters per dag die gemengd worden. Het laatste heeft de voorkeur.
- Influent en effluent worden op één dag bemonsterd i.v.m. de logistiek.

- Etiketten met de monstercode worden door AquaSense aangeleverd. Op de stickers dient nog wel de monsternamedatum vermeld te worden.
- Het monstermateriaal bestaat uit standaard 1 liter groene of bruine glazen flessen met teflon dop. Er wordt van uit gegaan dat het waterschap / de zuivering deze flessen heeft. Indien dit niet het geval is wordt u verzocht contact op te nemen met mevrouw Derksen.
- Voor de analyse van Campylobacter (analysecode CAMP) is 3 liter monstermateriaal nodig. Voor de overige door externe laboratoria uit te voeren analyses (analysecode HORM, ALKYL, CALUX, COLI en FAAG) is 1 liter monster nodig.
- Alle monsternames (inclusief de monsters voor analysecode COLI, FAAG en CAMP) worden onder zo hygiënisch mogelijke omstandigheden genomen. De algemene werkwijzen worden daarbij gevolgd (handen wassen, geen vuile flessen of doeken gebruiken, enzovoorts).
- Opvangen van monsters kan gebeuren in 'oude' vaten en met 'oude' slangen, d.w.z. in het materiaal dat daar altijd voor gebruikt wordt. Dus de monstervaten en slangen *niet* schoonmaken of vervangen voor monstername.
- Voor het vullen van de flessen eerst het opvangvat doorroeren.
- De monsterflessen voor de analyse van hormonen, alkylfenol(ethoxylat)en en de ER-calux (analysecode HORM, ALKYL en CALUX) dienen voorgespoeld te worden met het monster om verlies van stoffen door absorptie aan de wand van de fles zo veel mogelijk te voorkomen.
- Flessen stapsgewijs vullen, dus niet fles voor fles geheel vullen, maar eerst alle flessen gedeeltelijk vullen en daarna verder vullen.
- Flessen niet helemaal vullen, zodat de monsters op het laboratorium nog gemengd kunnen worden.
- Monstername van schoon naar vuil, dus eerst effluent bemonsteren en van daaruit naar influent werken.

### MONSTERCODES

De monstercodes zijn opgebouwd uit drie onderdelen: code lokatie – code analyse – code monsterpunt

De code voor de lokatie bestaat uit de vier beginletters van de plaats waar de RWZI zich bevind.

De codes voor de door externe laboratoria uit te voeren analyses worden verklaard in tabel B2.1 en betreffen HORM, ALKYL, CALUX, COLI, FAAG, CAMP. Daarnaast dienen op elk monsterpunt de routinematige analyses uitgevoerd te worden.

De code voor het monsterpunt is als volgt (zie ook de schema's RWZI's hierna):

| Code  | Omschrijving                              |
|-------|---|
| infl  | influent                                  |
| nabez | effluent na nabezinktank                  |
| rej   | rejectiewater                             |
| zand  | effluent na zandfiltratie                 |
| helo  | effluent na helofytenfilter               |
| kool  | effluent na actief kool behandeling       |
| MBR   | effluent membraanbioreactor               |
| NaMBR | effluent nageschakelde membraanbioreactor |
| UV    | effluent na UV-detectie                   |

**WERKVERDELING**

In tabel B2.2 wordt de werkverdeling samengevat.

**TABEL B2.2** WERKVERDELING

| Type monster           | Monstername | Transport naar AquaSense | Transport naar Waterlab | Distributie monsters     |           |           |
|------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
|                        |             |                          |                         | naar overige laboratoria | Extractie | Analyse   |
| Routinematige analyses | RWZI        | n.v.t.                   | n.v.t.                  | RWZI?                    | n.v.t.    | RWZI?     |
| HORM                   | RWZI        | RWZI                     | n.v.t.                  | AquaSense                | IVM       | IVM       |
| ALKYL                  | RWZI        | RWZI                     | n.v.t.                  | AquaSense                | UvA       | UvA       |
| CALUX                  | RWZI        | RWZI                     | n.v.t.                  | AquaSense                | IVM       | BDS       |
| COLI                   | RWZI        | n.v.t.                   | RWZI                    | n.v.t.                   | n.v.t.    | Waterlab. |
| FAAG                   | RWZI        | n.v.t.                   | RWZI                    | n.v.t.                   | n.v.t.    | Waterlab. |
| CAMP                   | RWZI        | n.v.t.                   | RWZI                    | n.v.t.                   | n.v.t.    | Waterlab. |

- AquaSense zorgt voor stickers met projectomschrijving, monstercode en monsterdatum. De monsterdatum dient met de hand op de sticker geschreven te worden.
- NB De monsternamekosten en transportkosten naar AquaSense en het Waterlaboratorium komen voor rekening van de RWZI.
- In verband met de bacteriologische bepalingen dient monstername bij voorkeur op maandag, dinsdag of woensdag plaats te vinden.
- S.v.p. de monsternamedata minimaal een week van tevoren doorgeven aan de coördinator.
- Indien conserveren om welke reden dan ook nodig blijkt zullen de monsters worden ingevroren.

**SCHEMATISCHE VOORSTELLING BEMONSTERDE RWZI'S**

0 = routinematige metingen

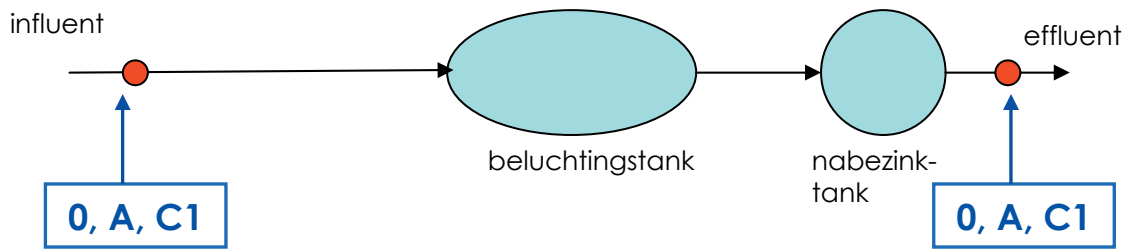
A = hormoonverstoorders (HORM, ALKYL en CALUX)

C1 = indicatoren (COLI en FAAG)

C2 = Campylobacter

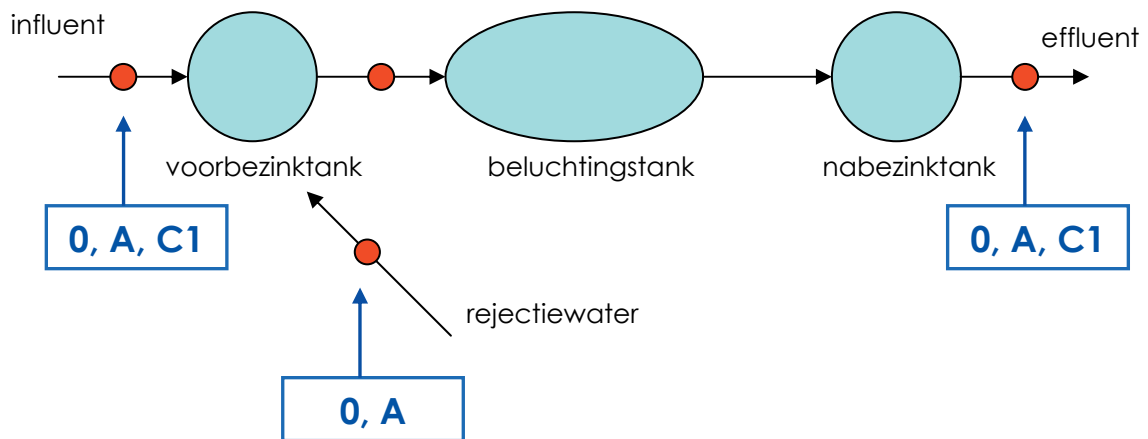
Conventioneel systeem

Twee locaties: RWZI A en RWZI D



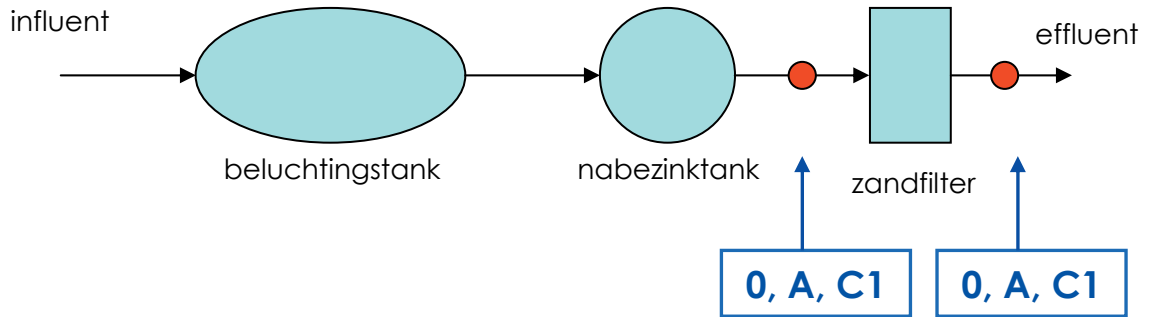
RWZI met rejectiewater:

Eén locatie: RWZI B



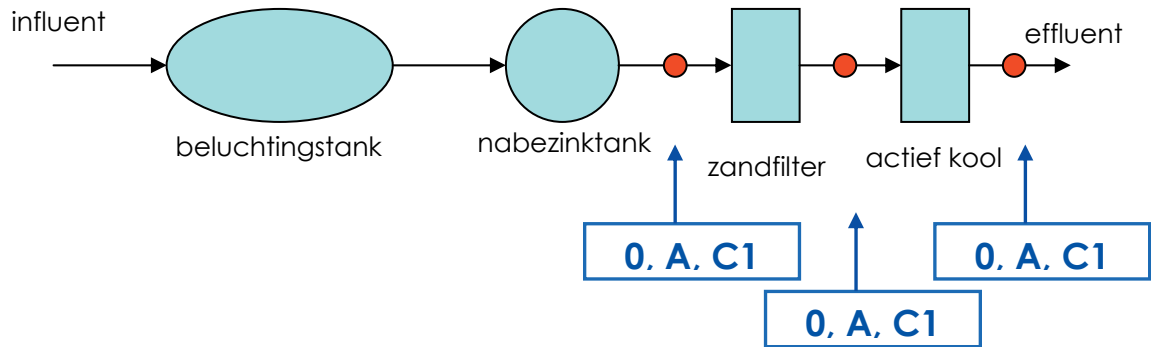
Nageschakeld zandfilter

Twee locaties: RWZI C en RWZI D



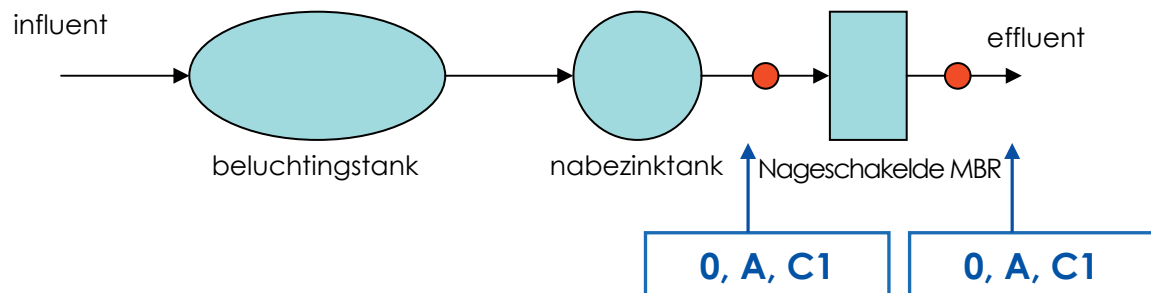
Nageschakeld zandfilter én actief kool

Eén locatie: RWZI E (pilot)



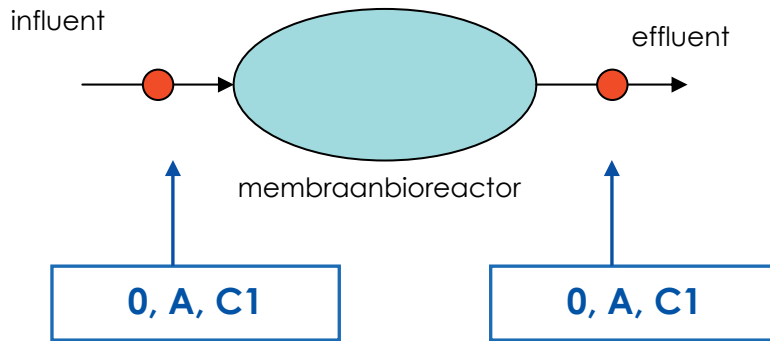
Nageschakelde MBR

Eén locatie: RWZI F (pilot)



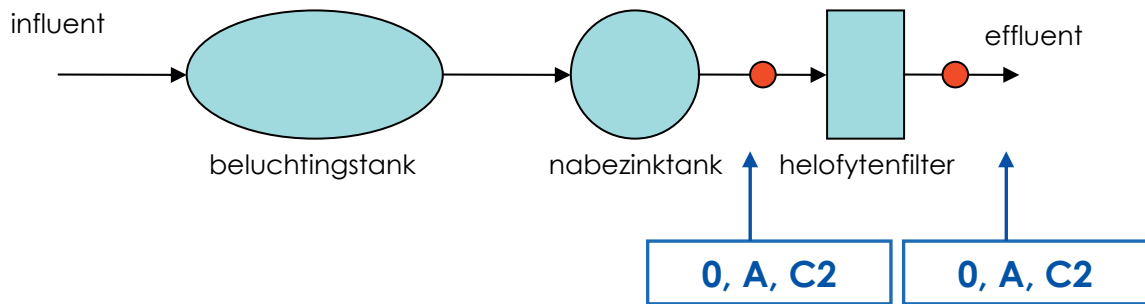
Membraanbioreactor (MBR)

Drie locaties: RWZI G (pilot) RWZI H (pilot)



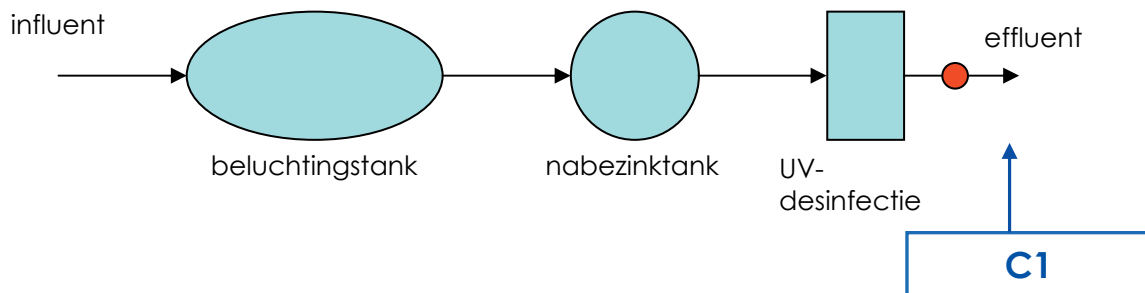
Nageschakeld helofytenfilter

Eén locatie: RWZI D en I



Nageschakelde UV-desinfectie

Eén locatie: RWZI A



## OVERZICHT BEMONSTERING

Overzicht bemonsterde RWZI's, monsterdata en type monsters. (x) = reeds bemonsterd in het kader van een ander type zuivering (d.w.z. influent RWZI C en RWZI G zijn gelijk)

### Natuurlijke en synthetische hormonen, bisfenol A, alkylfenol(ethoxy)laten en ER-calux

| RWZI (code)         | type zuivering                                  | monsterdatum | influent  | rejectie | nabezink  | zand      | kool     | UV       | MBR      | naMBR    | heloft   | totaal    |
|---------------------|---|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| eerste meetronde    |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          | 20        |
| RWZI A              | traditioneel plus UV                            | 13-07-04     | x         |          | x         |           |          |          |          |          |          | 2         |
| RWZI B              | traditioneel met slijbvergisting                | 07-07-04     | x         | x        | 1)        |           |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI C              | traditioneel plus zandfilter (N & P)            | 20-07-04     | x         |          | x         | x (P)     |          |          |          |          |          | 2         |
| RWZI D              | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 20-07-04     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI E              | traditioneel plus zandfilter en actief kool     | 17-06-04     |           |          | x         | x         | x        |          |          |          |          | 3         |
| RWZI F              | traditioneel plus MBR/ plus zandfilter          | 14-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          | x        |          | 2         |
| RWZI G              | MBR   | 20-07-04     | (x)       |          |           |           |          |          | x        |          |          | 1         |
| RWZI H              | MBR   | 27-07-04     | x         |          |           |           |          |          | x        |          |          | 2         |
| RWZI I              | traditioneel plus helofytenfilter               | 07-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          |          | x        | 2         |
| tweede meetronde    |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          | 20        |
| RWZI A              | traditioneel plus UV                            | 26-07-04     | x         |          | x         |           |          |          |          |          |          | 2         |
| RWZI B              | traditioneel met slijbvergisting                | 14-07-04     | x         | x        | x         |           |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI C              | traditioneel plus zandfilter (N & P)            | 28-07-04     | x         |          | x         | x (P)     |          |          |          |          |          | 2         |
| RWZI D              | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 27-07-04     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI E              | traditioneel plus zandfilter en actief kool     | 21-06-04     |           |          | x         | x         | x        |          |          |          |          | 3         |
| RWZI F              | traditioneel plus MBR/ plus zandfilter          | 28-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          | x        |          | 2         |
| RWZI G              | MBR   | 28-07-04     | (x)       |          |           |           |          |          | x        |          |          | 1         |
| RWZI H              | MBR   | 02-08-04     | x         |          |           |           |          |          | x        |          |          | 2         |
| RWZI I              | traditioneel plus helofytenfilter               | 14-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          |          | x        | 2         |
| derde meetronde 2)  |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          | 12        |
| RWZI C              | traditioneel plus zandfilter (N & P)            | 15-03-05     |           |          | x         | 2x (N+P)  |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI D              | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 22-03-05     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          | x        | 4         |
| RWZI E              | traditioneel plus zandfilter en actief kool     | 28-06-04     |           |          | x         | x         | x        |          |          |          |          | 3         |
| RWZI F              | traditioneel plus MBR/ plus zandfilter          | 13-04-05     |           |          | x         | x         |          |          |          | x        |          | 3         |
| RWZI I              | traditioneel plus helofytenfilter               | 28-02-05     |           |          | x         |           |          |          |          |          | x        | 2         |
| vierde meetronde 2) |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          |           |
| RWZI D              | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 06-04-05     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          | x        | 4         |
| <b>Totaal</b>       |   |              | <b>12</b> | <b>2</b> | <b>20</b> | <b>12</b> | <b>3</b> | <b>0</b> | <b>4</b> | <b>3</b> | <b>5</b> | <b>56</b> |

1) geen analyse hormonen en bisfenol A: verloren gegaan tijdens opwerking

2) in deze meetrondes zijn de nonylfenol(ethoxy)laten niet gemeten

### Indicatoren voor fecale verontreiniging of Campylobacter

| RWZI (code)      | type zuivering                                  | monsterdatum | influent  | rejectie | nabezink  | zand      | kool     | UV       | MBR      | naMBR    | heloft   | totaal    |
|------------------|---|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| eerste meetronde |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          | 22        |
| RWZI A           | traditioneel plus UV                            | 13-07-04     | x         |          | x         |           |          | x        |          |          |          | 3         |
| RWZI B           | traditioneel met slijbvergisting                | 07-07-04     | x         |          | x         |           |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI C           | traditioneel plus zandfilter (N & P)            | 20-07-04     | x         |          | x         | x (P)     |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI D           | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 20-07-04     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI E           | traditioneel plus zandfilter en actief kool     | 17-06-04     |           |          | x         | x         | x        |          |          |          |          | 3         |
| RWZI F           | traditioneel plus MBR/ plus zandfilter          | 14-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          | x        |          | 2         |
| RWZI G           | MBR   | 20-07-04     | (x)       |          |           |           |          |          | x        |          |          | 1         |
| RWZI H           | MBR   | 28-07-04     | x         |          |           |           |          |          | x        |          |          | 2         |
| RWZI I           | traditioneel plus helofytenfilter               | 06-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          |          | x        | 2         |
| tweede meetronde |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          | 21        |
| RWZI A           | traditioneel plus UV                            | 26-07-04     | x         |          | x         |           |          | x        |          |          |          | 3         |
| RWZI B           | traditioneel met slijbvergisting                | 15-07-04     | x         |          | x         |           |          |          |          |          |          | 2         |
| RWZI C           | traditioneel plus zandfilter (N & P)            | 28-07-04     | x         |          | x         | x (P)     |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI D           | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 27-07-04     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI E           | traditioneel plus zandfilter en actief kool     | 21-06-04     |           |          | x         | x         | x        |          |          |          |          | 3         |
| RWZI F           | traditioneel plus MBR/ plus zandfilter          | 28-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          | x        |          | 2         |
| RWZI G           | MBR   | 28-07-04     | (x)       |          |           |           |          |          | x        |          |          | 1         |
| RWZI H           | MBR   | 03-08-04     | x         |          |           |           |          |          | x        |          |          | 2         |
| RWZI I           | traditioneel plus helofytenfilter               | 15-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          |          | x        | 2         |
| derde meetronde  |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          | 11        |
| RWZI C           | traditioneel plus zandfilter (N & P)            | 15-03-05     |           |          | x         | 2x (N+P)  |          |          |          |          |          | 3         |
| RWZI D           | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 22-03-05     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          | x        | 4         |
| RWZI E           | traditioneel plus zandfilter en actief kool     | 28-06-04     |           |          | x         | x         | x        |          |          |          |          | 3         |
| RWZI F           | traditioneel plus MBR/ plus zandfilter          | 28-07-04     |           |          | x         |           |          |          |          | x        |          | 2         |
| RWZI I           | traditioneel plus helofytenfilter               | 28-02-05     |           |          | x         |           |          |          |          |          | x        | 2         |
| vierde meetronde |   |              |           |          |           |           |          |          |          |          |          |           |
| RWZI D           | traditioneel plus zandfilter en helofytenfilter | 06-04-05     | x         |          | x         | x         |          |          |          |          | x        | 4         |
| <b>Totaal</b>    |   |              | <b>12</b> | <b>0</b> | <b>20</b> | <b>10</b> | <b>3</b> | <b>2</b> | <b>4</b> | <b>3</b> | <b>5</b> | <b>58</b> |

alleen Campylobacter bepaald

Campylobacter + indicatoren bepaald

## BIJLAGE 3

# ANALYSEMETHODE HORMONEN EN BISFENOL A

## ALGEMEEN

Om tot een reële vergelijking te komen van de chemische en biologische data is het noodzakelijk dat de beide bepalingen worden uitgevoerd met (vrijwel) identieke extracten. Omzetting van de chemisch bepaalde concentraties van de verschillende natuurlijke en synthetische estrogenen in EEQs m.b.v. hun EEFs maakt het mogelijk om een inschatting te maken of er – naast de geanalyseerde, bekende estrogenen – nog andere stoffen aanwezig zijn in de monsters die invloed hebben op de totale estrogene activiteit zoals die bepaald is met de ER-CALUX.

De chemische analyse heeft betrekking op de volgende stoffen: 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\beta$ -estradiol (E2), estron (E1), estriol (E3), 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2), bisphenol A (BPA), mestranol (MES, alleen in de 1e en 2e meetronde).

De monstervoorbewerking voor de chemische analyse en de biologische assays doorloopt een grotendeels identiek traject. Echter, voor de chemische analyse van hormonen in complexe matrices op het niveau van enkele nanogrammen per liter is het noodzakelijk om een extra opzuiveringsstap d.m.v. een fractionering over een HPLC kolom uit te voeren.

## MONSTERVOORBEWERKING MET SOLID PHASE EXTRACTIE VOOR DE BIOASSAYS

Omdat geen conserveringsmiddel is gebruikt zijn alle monsters zo snel mogelijk opgewerkt om afbraak van de hormonen te voorkomen. De influenten en rejectiewatermonsters zijn voorafgaand aan de SPE procedure gefilterd over een glasvezelfilter, de effluenten niet. Solid Phase Extractie is uitgevoerd met een SDB Speeddisk, waarbij 1 liter monster is gebruikt. Na drogen van de disk vond elutie plaats met acetonitril, waarna het eluaat werd ingedampd en het residu opgenomen in 5 mL 0,2 M natriumacetaatbuffer pH 5,5 en gezuiverd over gecombineerde C<sub>18</sub> en NH<sub>2</sub> SPE cartridges. De cartridges zijn voor de eerste twee meetrondes geëluëerd met ethylacetaat en voor de derde meetronde met methanol. De extracten zijn verstuurd naar BDS voor de ER-CALUX<sup>®</sup> assay.

## MONSTERVOORBEWERKING MET SOLID PHASE EXTRACTIE VOOR DE CHEMISCHE ANALYSE

Voor de chemische analyse is de SPE procedure identiek aan die voor de bioassays, met als enige verschil dat er voor de chemische analyses gebruik is gemaakt van gedeutereerde standaarden die voorafgaand aan de SPE procedure worden toegevoegd aan het monster. Hiermee kan gecorrigeerd worden voor de recovery. Bij de kwantificering is ook gebruik gemaakt van een externe ijkcuve. Omdat niet voor alle componenten gedeutereerde varianten op de markt zijn is er gebruik gemaakt van gedeutereerd BPA (BPA-d6 voor de eerste twee meetrondes, BPA-d15 voor de derde meetronde) voor de kwantificering van BPA en gedeutereerd E2 (E2-d4) voor de kwantificering van de overige componenten.

## AANVULLENDE MONSTERVOORBEWERKING VOOR CHEMISCHE ANALYSE

Om het extract na de boven beschreven SPE procedure nog verder op te zuiveren werd het ingedampd en na opname in mobiele fase isocratisch gefractioneerd over een C<sub>18</sub> ODS2 HPLC kolom van Waters (150x4,6 mm) uitgerust met een guard kolom. De mobiele fase was 65% methanol, de flowsnelheid 1 mL/min. BPA en E3, MES en de overige hormonen elueerden



gescheiden fracties, maar werden na de fractionering weer bij elkaar gevoegd. Deze fractie werd weer ingedampt en vervolgens gederiviseerd met een silyleringsreagens (Sigma Sil A). De overmaat silyleringsreagens werd na voltooiing van de derivatisering weggedampt. Het residu werd opgenomen in hexaan, dat de injectiestandaard PCB103 bevatte. Om de laatste restanten silyleringsreagens te verwijderen werd het hexaan nog eenmaal gewassen met water. De hexaanfase werd via een  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  kolommetje in een GC-vial overgebracht en ingedampt tot een volume van 100  $\mu\text{l}$ , gereed voor injectie op de GC-ITD. Deze opwerkingsmethode is – op kleine aanpassingen na – ook gebruikt voor de metingen in het LOES project (Belfroid *et al.*, 1999; Vethaak *et al.*, 2002; Vethaak *et al.*, 2005).

### CHEMISCHE ANALYSE

De extracten zijn geanalyseerd op een Varian 3.800 GC in combinatie met een Saturn 2.000 ITD. Van het extract werd 3  $\mu\text{l}$  cold-splitless geïnjecteerd met een Gerstel CIS3 injector voorzien van een Siltek liner. De GC-kolom was een 30 m CP-SIL-8-CB low bleed MS kolom van Varian, met een i.d. van 0,25 mm en een filmdikte  $d_f$  van 0,25  $\mu\text{m}$ . Er is een Siltek retention gap gebruikt van 1 m en een i.d. van 0,53 mm.

### ESTRIOL

Omdat bij een tussentijdse controle tijdens de analyse van de monsters uit de eerste en tweede meetronde bleek dat de recovery van E3 in de monsters erg laag was, is na aanvullend onderzoek en in overleg met de opdrachtgever besloten de procedure voor E3 te modificeren. Bij de eerste analyse bleek dat het met name de influenten en rejectiewatermonsters waren die E3 bevatten. Daarom is E3 in deze monsters (een aantal van 12) met de aangepaste methode opnieuw bepaald. Daarnaast zijn er ter controle nog 3 effluentmonsters in de meetserie meegenomen.

De bewaarde cartridges (die al eerder geëluëerd waren met ethylacetaat) zijn nogmaals geëluëerd met methanol. Dit eluaat werd gefractioneerd m.b.v. HPLC zoals beschreven bij paragraaf 2.4, maar dan met een mobiele fase van 50% methanol. Kwantificering van E3 is uiteindelijk zonder interne standaard uitgevoerd, want het betrof bij  $-18^\circ\text{C}$  bewaarde cartridges die waren gebruikt voor het maken van extracten voor de ER-CALUX<sup>®</sup> assay. Bij kwantificering zoals die nu is uitgevoerd op basis van de responsfactor van E3 is dus geen correctie toegepast voor de recovery.

Optelling van de aangetroffen concentraties E3, d.w.z. na de eerste elutie met ethylacetaat en de tweede elutie met methanol, geeft echter wel een goede indicatie van de orde van grootte van de concentratie E3 in de monsters.

Bij de analyse van de monsters uit de 3<sup>e</sup> meetronde zijn de cartridges meteen geëluëerd met methanol i.p.v. met ethylacetaat om er voor te zorgen dat estriol ook in alle monsters bepaald kon worden.

### KWALITEITSCONTROLE CHEMISCHE METHODE

Als kwaliteitsborging voor de opwerking van de monsters en de daaropvolgende chemische analyse zijn in de periode juli 2005 t/m april 2005 diverse controlemonsters meegenomen in de meetseries. Het betrof HPLC water dat verrijkt was met 20-50 ng/L van de hormonen en ongeveer 200 ng/L BPA. Daarnaast zijn er in de meetseries blanco's meegenomen.

### BEREKENING EEQS UIT DE CHEMISCHE DATA

De EEf van een bepaalde stof A is als volgt gedefinieerd:

$$EEF_A = EC_{50\ E2} / EC_{50\ A}$$

Voor conversie naar EEQs geldt de volgende relatie:

$$EEQ_A = [A] * EEF_A$$

M.b.v. de EEFs uit tabel 1 (zie Legler *et al.*, 2002, 2004 en Houtman *et al.*, 2004) en de chemisch bepaalde stofconcentratie kunnen dus de EEQs berekend worden. Deze theoretisch bepaalde EEQs kunnen dan vergeleken worden met EEQs die met de ER-CALUX<sup>®</sup>, dus biologisch, zijn bepaald.

TABEL B3.1

EEFS DIE GEBRUIKT ZIJN VOOR DE CONVERSIE VAN CONCENTRATIES IN NG/L VAN DE VERSCHILLENDE HORMONEN NAAR EEQS IN NM

| Component                     | Afkorting | Estrogenic Equivalency Factor (EEF) |
|-------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| 17 $\alpha$ -estradiol        |           | 0,01                                |
| 17 $\beta$ -estradiol         | E2        | 1                                   |
| Estron                        | E1        | 0,12                                |
| Estriol                       | E3        | 0,13                                |
| 17 $\alpha$ -ethynylestradiol | EE2       | 1,12                                |
| bisphenol A                   | BPA       | 1,13 · 10 <sup>-5</sup>             |
| Mestranol                     | MES       | 0,025                               |

De conversie van concentraties van de verschillende hormonen naar hun EEQs is gedaan op basis van molariteit. Voor de berekening van de EEQs zijn eerst de gevonden concentraties in ng/L omgezet in concentraties in nM.

De chemische data zijn op twee manieren gebruikt voor de berekening van de EEQs. In het eerste geval zijn alle bijdragen van de aangetroffen hormonen gesommeerd. Daarnaast is bij de tweede wijze van berekenen ook de bijdrage van hormonen die niet zijn aangetroffen in beschouwing genomen door te veronderstellen dat deze op het niveau van de vastgestelde detectielimiet aanwezig waren. Omdat met de ER-CALUX<sup>®</sup> lagere niveau's aan humane estrogenen kunnen worden gemeten dan met de chemische methode kunnen bijdragen die vanuit de chemische methode gezien onder de detectielimiet liggen toch relevant zijn voor de biologisch bepaalde EEQs.

Voor de directe vergelijking van de op chemische basis berekende EEQs met de biologisch bepaalde EEQs (m.b.v. de ER-CALUX<sup>®</sup>) moet wel enige voorzichtigheid in acht worden genomen. De chemisch bepaalde concentraties van de verschillende estrogenen zijn gecorrigeerd voor hun recoveries.

Echter, de respons in de ER-CALUX<sup>®</sup> is uiteraard gebaseerd op de hoeveelheid van de verschillende hormonen die daadwerkelijk in het extract aanwezig is. Daarnaast zullen er in de extracten wellicht stoffen aanwezig zijn die een positieve respons veroorzaken in de ER-CALUX<sup>®</sup>, maar die niet gemeten zijn m.b.v. chemische analyse. Ook aanwezigheid van bijvoorbeeld antagonist kan niet worden uitgesloten.



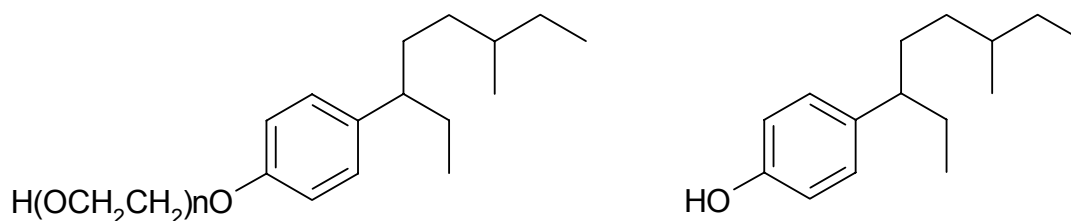
## BIJLAGE 4

# ANALYSEMETHODE NONYLFENOL(ETHOXYLAT)EN

## INLEIDING

Alkylfenol ethoxylaten (met aparte waarden voor  $A_9PEO_1$ ,  $A_9PEO_2$  en de som van  $A_9PEO_3$  tot en met  $A_9PEO_{16}$ ) en nonylfenol (NP) zijn gekwantificeerd in watermonsters van bestaande en experimentele RWZI's (zie figuur 1 voor de structuren van de stoffen). In dit rapport worden  $A_9PEO_1$ ,  $A_9PEO_2$  en  $A_9PEO_{3-16}$  verder aangeduid met APEO1, APEO2 en APEO10. De gebruikte methoden en technieken zijn allemaal eerder toegepast in het ESPM laboratorium en beschreven in o.a. Zhao *et al.* (1999), De Voogt *et al.* (2000) en Jonkers *et al.* (2001).

FIGUUR B4.1 STRUCTUREN VAN DE GEANALYSEERDE STOFFEN. LINKS APEO ( $N = 1 - 16$ ). RECHTS NP. DE VERTAKKING VAN DE NONYL GROEP IS VARIABEL. DE STOFFEN KOMEN DUS VOOR ALS EEN MENGSEL VAN ISOMEREN



## METHODEN

### Monstervoorbewerking

De ingevroren monsters werden ontdooid in de koelkast en aangezuurd tot pH=2-2,5 met HCl. Aan 100 - 200 ml monster werden twee interne standaarden toegevoegd;  $^{13}C-A_9PEO_2$  voor de APEO en  $^{13}C-NP$  voor NP (meer hierover bij 'Analyse en kwantificering'). Solid Phase Extractie (SPE) werd uitgevoerd met Sep-Pak  $C_{18}$ -SPE cartridges (500 mg, Waters). Cartridges werden geconditioneerd met methanol en nano-pure water, daarna beladen met het monster, en na het droogblazen van de cartridge werd geëluëerd met methanol. Het extract werd ingedampt tot ongeveer 1 ml op een waterbad onder een stikstofstroom. Een clean-up werd uitgevoerd met behulp van een glazen pipet gevuld met aluminium oxide ( $Al_2O_3$ , gedeactiveerd met 5 gewicht % water) en droog natriumsulfaat ( $Na_2SO_4$ ). De gevulde pipet werd eerst voorgespoeld met methanol, en vervolgens werd het monster (ongeveer 1 ml) opgebracht en geëluëerd met 5 ml methanol. Het eluaat werd ingedampt op een waterbad onder een stikstofstroom, en heropgelost in methanol/ $H_2O$  (1/1, volume/volume). Tot slot werd het extract gefiltreerd over een 0,2  $\mu m$  Acrodisk filter.

Om verstopping van de SPE cartridges te voorkomen werden de influent en rejectiewater monsters eerst gefiltreerd. Het filtraat ('het water') werd verder opgewerkt zoals hierboven beschreven. Het residu ('het zwevend stof') werd in een Soxhlet-huls gebracht, waaraan de interne standaarden werden toegevoegd. Het monster werd overnacht gesoxhletteerd met methanol. Daarna werd het extract ingedampt tot 5 - 15 ml en werd ongeveer 100 ml water toegevoegd. De oplossing verder opgewerkt zoals hierboven beschreven voor de watermonsters. De interne standaarden, echter, waren natuurlijk al eerder toegevoegd. De totale waterconcentratie werd berekend door de gehalten in het filtraat en residu op te tellen.

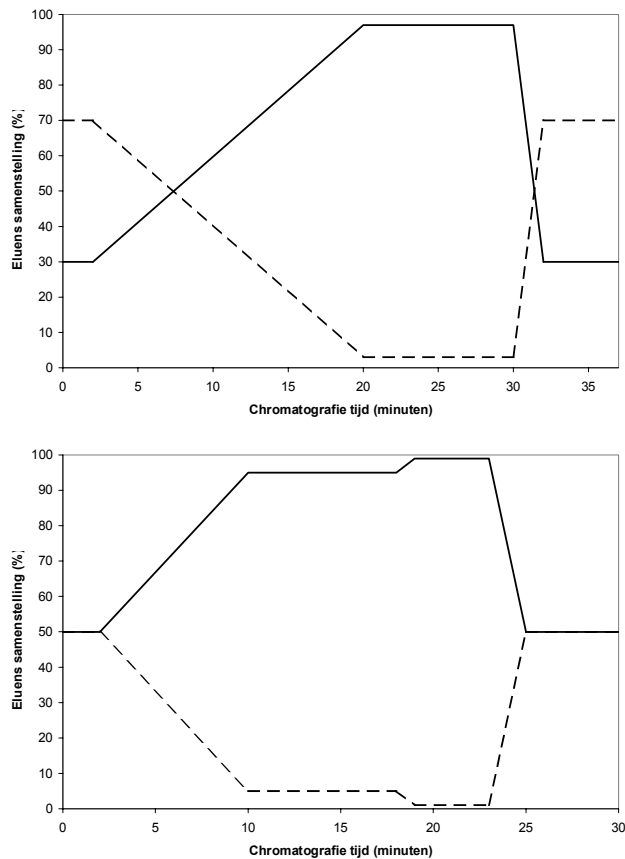
Omdat het gebruikelijk is om de concentratie in het zwevend stof uit te drukken per gram zwevend stof, werd van de influent en rejectiewater monsters het percentage zwevend stof bepaald. Hiervoor werd een volume (meestal 100 ml) water gefiltreerd, en het filter bij 100 °C gedroogd tot geen gewichtsverlies meer optrad (ca. 48 u). Uit het gewichtsverlies werd het percentage zwevend stof berekend.

#### ANALYSE EN KWANTIFICERING

Alle extracten zijn geanalyseerd met een vloeistof chromatograaf (liquid chromatography, LC) gekoppeld (met een electrospray interface) aan een massaspectrometer (MS). De APEO's werden in de zogenaamde positieve ionisatie MS mode gemeten, en NP in de negatieve ionisatie MS mode. Ieder monster moest daarom twee keer worden geanalyseerd. Omdat de metingen meestal in duplo of vaker werden herhaald, is ieder monster in totaal vier keer of vaker gemeten.

FIGUUR B4.2

BOVEN: LC-GRADIËNT BIJ POSITIEVE IONISATIE (VOOR DE APEO METINGEN). ELUENS: METHANOL/WATER 1/3 (VOLUME/VOLUME) MET 0.1 MM NATRIUM ACETAAT EN METHANOL. BENEDEN: LC-GRADIËNT BIJ NEGATIEVE IONISATIE (VOOR DE NP METINGEN). ELUENS: METHANOL/WATER 1/3 (VOLUME/VOLUME) MET 2 MM AMMONIUM ACETAAT EN METHANOL. ONDERBROKEN STREEP = METHANOL/WATER MET ZOUTEN. DOORGETROKKEN STREEP = METHANOL



De gebruikte LC kolom is van het merk en type Lichrospher RP-C18 (dimensies 125 x 2 mm). De kolom is een zogenaamde omgekeerde fase kolom (reverse phase, RP). Dat betekent dat de mobiele (vloeistof) fase meer polair is dan de stationaire fase (in dit geval C18). Als mobiele fase werd een mengsel van water (met opgeloste zouten) en methanol gebruikt. De stroomsnelheid van het eluens was 0,25 ml / min en de verhouding van het water en methanol in het mengsel werd in de tijd veranderd. Zie figuur 2 voor de toegepaste gradiënten voor de positieve en negatieve ionisatie mode. Met de gebruikte kolom en gradient worden de APEO's

gescheiden van allerlei stoffen in het extract, maar niet van elkaar. De APEO's vormen dus één piek in het chromatogram. Dat is in dit geval geen probleem omdat er in het chromatogram naar specifieke massa's kan worden gekeken.

Het gebruikte LC-MS systeem is de Thermoquest Navigator aQa LC-MS met electrospray interface en quadropool massaselector. De APEO's zijn gemeten in de positieve ionisatie mode. In deze mode vormen de APEO's adducten met (positief geladen) natrium ionen ( $\text{Na}^+$ ) uit het eluens. De gevoeligheid van de MS wordt groter naarmate er minder massa's gemeten hoeven te worden. De MS werd daarom voorgeprogrammeerd om alleen het signaal behorende bij de massa - ladingsverhouding van deze (APEO -  $\text{Na}^+$ )<sup>+</sup> adducten te meten (selected ion monitoring, SIM). Er worden ook andere adducten gevormd, zoals het (APEO - metanol -  $\text{Na}^+$ )<sup>+</sup> adduct, maar het signaal van deze adducten is relatief laag. De uitzondering is APEO1 en daarom is voor deze stof het som-signaal van beide adducten gemeten. NP werd gemeten in de negatieve ionisatie mode. NP wordt gedeprotoneerd en daarbij negatief geladen. De MS werd ingesteld op de massa van NP - 1 a.m.u. (1 = a.m.u. proton).

Voor kwantificering van APEO werden pure<sup>8</sup> NP, APEO1 en APEO2 standaarden gebruikt, alsmede een industrieel mengsel van APEO3 tot APEO16 (verder APEO10 genoemd) voor de hogere ethoxylaten. Van de standaarden werden concentratie reeksen gemaakt. Aan deze oplossingen werd een hoeveelheid van de interne standaard toegevoegd, en vervolgens werden ze gemeten. De responsfactoren werden als volgt berekend:

$$A_S / A_{IS} = rf \cdot C_S / C_{IS}$$

Waarin  $A_S$  = gemeten piek oppervlak van de stof,  $A_{IS}$  = gemeten piek oppervlak van de interne standaard,  $C_S$  = concentratie van de stof in de standaardoplossing,  $C_{IS}$  = concentratie van de interne standaard in de standaardoplossing, en  $rf$  is de responsfactor. In het lineaire gebied van de MS heeft de  $rf$  constante waarde. Merk op dat  $rf$  de richtingscoëfficiënt van de 'ijklijn' is, waarbij  $A_S / A_{IS}$  op de y-as staat en  $C_S / C_{IS}$  op de x-as.

Na het analyseren van de monsters werd de concentratie als volgt berekend:

$$C_S = (A_S C_{IS}) / (A_{IS} rf)$$

Waarin  $C_S$  en  $C_{IS}$  nu de concentraties zijn direct na toevoeging van de interne standaard. Het voordeel van de interne standaard methode vergeleken met de 'klassieke' externe standaard methode is dat er voor elk individueel monster gecorrigeerd wordt voor verliezen tijdens de monsteropwerking, variaties in het monster volume dat in de LC-MS wordt geïnjecteerd, en variaties in gevoeligheid van het LC-MS instrument. Dit kan omdat de verhouding tussen interne standaard en analyte vanaf de toevoeging van de interne standaard vastligt. De variaties in gevoeligheid van de LC-MS worden met name veroorzaakt doordat de ingang van de MS (de entrance cone) gedurende een meetserie langzaam vuil wordt.

### KWALITEITSCONTROLE

Er zijn recovery experimenten uitgevoerd om inzicht te krijgen in de mogelijke verliezen van APEO en NP tijdens de opwerking. Hiervoor werd aan nanopure water en in een soxhlet huls een bekende hoeveelheid APEO1, APEO2, APEO10 en NP toegevoegd. Deze recovery monsters werden vervolgens op dezelfde manier opgewerkt zoals de andere monsters. Alleen het moment waarop de interne standaard werd toegevoegd is anders. Deze werd bij de recove-

<sup>8</sup> Deze 'pure' standaarden bestaan in werkelijkheid uit verschillende isomeren door vertakking van de alkylstaart in het molecuul

ry experimenten toegevoegd vlak voor de analyse met de LC-MS. Op deze manier werd wel gecorrigeerd voor variaties in injectievolume en de gevoeligheid van de MS, maar niet voor verliezen tijdens de opwerkingen (want deze wilden we juist weten). De gemeten recovery's zijn niet gebruikt om de resultaten van de monsters te corrigeren. Daarvoor gebruikten we de interne standaard.

Er zijn blanco experimenten uitgevoerd om inzicht te krijgen in het achtergrondsignaal en de aanwezigheid van eventuele storende componenten die tijdens de opwerking in het extract terecht komen. Om de aanwezigheid van storende componenten te voorkomen, wordt het laboratorium waarin de opwerkingen zijn uitgevoerd vrij van zeep gehouden. Het schoonmaken van glaswerk gebeurt uitsluitend met water, niet zepige organische oplosmiddelen, mechanisch en thermisch. Voor de blanco experimenten werd een hoeveelheid nano-pure water, of filterpapier in een soxhlet huls, op dezelfde manier opgewerkt als de monsters, dus er werd ook interne standaard toegevoegd.

Er zijn verschillende manieren om de detectie limiet van een methode te bepalen. In deze studie zijn de detectie limieten bepaald door de concentratie te berekenen behorende bij een piekoppervlak van een piek met een hoogte van twee keer de ruis.

## RESULTATEN

### *Kwantificering*

Het meten van de monsters nam meerdere dagen in beslag, soms met enkele tussenperiodes zonder metingen. De monsters zijn daarom ook zo veel mogelijk verspreid over de verschillende dagen gemeten. De meet-resultaten van de verschillende dagen voor de standaarden werden samengevoegd voor het berekenen van de responsfactoren. Voor de APEO1, APEO2 en APEO10 werden op deze manier hoge correlatie coëfficiënten ( $R^2 > 0,9$ ) gevonden voor de relatie tussen  $C_S/C_{IS}$  en  $A_S/C_{IS}$ . Voor APEO1, APEO2 en APEO10 konden daarom dezelfde responsfactoren (resp. 0,38, 0,67 en 0,59) worden gebruikt voor alle monsters, ook al werden deze op verschillende dagen gemeten. Voor NP bleek dat de responsfactor per dag varieerde, en ook concentratie afhankelijk was binnen de toegepaste concentratie range. Blijkbaar is de LC-MS minder stabiel en de respons minder lineair in de negatieve mode. Voor het berekenen van de NP concentraties in de monsters werd daarom steeds de responsfactor gebruikt die berekend werd uit het meet-resultaat van een standaard met een vergelijkbare concentratie (lees:  $A_S/A_{IS}$  ratio) en die was gemeten op dezelfde dag.

### KWALITEITSCONTROLE

De berekende detectie limieten zijn voor de verschillende stoffen ongeveer gelijk en ongeveer  $0,01 \mu\text{g} / \text{L}$ . Hierbij is uitgegaan van een start(monster)volumen van 100 ml. Het dient te worden opgemerkt dat de methode voor het bepalen van de detectie limiet (waarin we uitgaan van twee keer de ruis) nogal optimistisch is. Bij het presenteren van de resultaten zijn we uitgegaan van een detectie limiet van  $0,05 \mu\text{g} / \text{L}$ . Dit is een waarde die in overeenstemming is met eerdere studies uitgevoerd in ons laboratorium.

De resultaten van zes blanco experimenten zijn samengevat in tabel 2. De concentraties APEO gemeten in de soxhlet blanco zijn hoger dan in de water blanco's. De APEO concentraties gemeten in de watermonsters zijn gecorrigeerd voor het blanco-sigitaal door er een concentratie van  $0,05 \mu\text{g} / \text{L}$  af te trekken. In geval van de gemeten soxhlet (zwevend stof) concentraties zijn de grotere correcties uit tabel 2 gebruikt.

De blanco concentraties voor NP zijn erg hoog. Het is onduidelijk wat de bron van deze achtergrondconcentraties is. De oorzaak kan zijn dat er tijdens de opwerking NP in de extracten terecht komt, maar ook dat het een andere stof betreft met toevallig dezelfde retentietijd en massa. Het toepassen van de blanco correctie op de monsters resulteert in veel gevallen in negatieve concentraties. Dat zou er op kunnen duiden dat de bron van de 'NP-vervuiling' specifiek voor de blanco's is. Een mogelijkheid is dat het signaal veroorzaakt wordt door stoffen in het nano-pure water dat gebruikt is als start-oplossing voor de blanco bepalingen. Het voorgaande heeft ons doen besluiten om de NP meetresultaten te presenteren zonder correctie voor het blanco signaal.

TABEL B4.2 CONCENTRATIES APEO EN NP GEMETEN IN DE BLANCO'S ( $\mu\text{G/L}$ )

|           | APEO 1 | APEO 2 | APEO 10 | NP   |
|-----------|--------|--------|---------|------|
| Water A   | 0,03   | 0,04   | 0,03    | 2    |
| Water B   | 0,12   | 0,09   | 0,09    | 1,6  |
| Water C   | 0,03   | 0,04   | 0,04    | 1,4  |
| Water D   | 0,06   | 0,05   | 0,05    | 0,48 |
| Water E   | 0,05   | 0,04   | 0,02    | 1,1  |
| A soxhlet | 1,6    | 0,17   | 0,86    | 0,61 |

De resultaten van zeven recovery experimenten (vijf voor water en twee voor de vaste fase) zijn samengevat in tabel B4.3. De resultaten laten zien dat de recovery geen constante is, maar voor ieder monster anders kan zijn. Omdat de interne standaard corrigeert voor de recovery voor ieder individueel monster, zijn deze variaties niet van belang. De recovery's zijn in bepaalde gevallen vrij laag (30%), maar dat is door het gebruik van de interne standaarden geen probleem. De toegepaste interne standaarden zijn  $^{13}\text{C-A}_9\text{PEO}_2$  en  $^{13}\text{C-NP}$ . Omdat de fysisch-chemische eigenschappen voor  $^{13}\text{C}$  praktisch gelijk zijn aan die voor  $^{12}\text{C}$ , zijn de interne standaarden zeer geschikt voor APEO2 en NP. De resultaten in tabel 3 laten zien dat het toepassen van de  $^{13}\text{C-A}_9\text{PEO}_2$  interne standaard in de APEO1 en APEO10 analyses mogelijk in een onderschatting van de concentraties van deze stoffen zal resulteren.

TABEL B4.3 RECOVERY'S VOOR APEO EN NP (% TERUGGEVONDEN)

|           | APEO 1 | APEO 2 | APEO 10 | NP  |
|-----------|--------|--------|---------|-----|
| Water A   | 55     | 73     | 33      | 48  |
| Water B   | 62     | 90     | 41      | 37  |
| Water C   | 56     | 69     | 31      | 45  |
| Water D   | 62     | 77     | 36      | 26  |
| Water E   | 56     | 69     | 33      | 71  |
| Soxhlet A | 41     | 65     | 31      | 74  |
| Soxhlet B | 95     | 96     | 67      | 105 |





## BIJLAGE 5

## ANALYSEMETHODE ER-CALUX ASSAY

## VERWERKING VAN DE MONSTERS

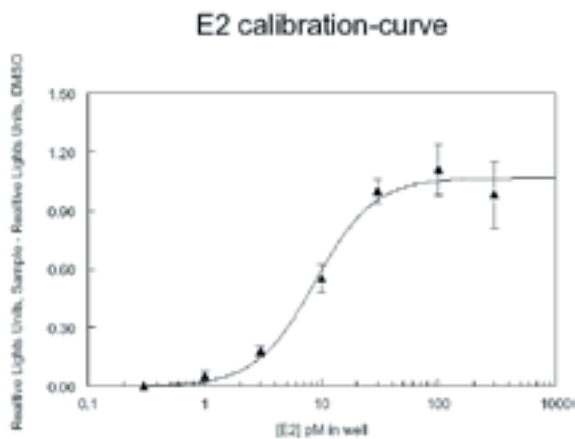
De aangeleverde extracten (extract van ca. 500 ml water, opgenomen in 100 µl ethylacetaat) zijn drooggedampt in de originele vials (N<sub>2</sub>, 37°C), waarna 50 µl DMSO is toegevoegd. Van de extracten in DMSO zijn verdunningen in DMSO gemaakt, welke zijn getest in de ER CALUX®. De ER CALUX® bioassay is uitgevoerd door cellen uit te platen (5000 cellen per well) in Nunc 96 wells platen in assaymedium (DMEM/F12 medium dat is gesupplementeerd met van hormonen- gestript serum en aminozuren). Na een incubatietijd van 24 uur (37°C, 7,5% CO<sub>2</sub>) is het assaymedium ververs, waarna de cellen opnieuw 24 uur zijn geïncubeerd. Na deze tweede periode van 24 uur is het medium vervangen door assaymedium waaraan de extracten (in DMSO) zijn toegevoegd (DMSO concentratie 0,1%). De cellen zijn 24 uur aan dit medium blootgesteld waarna het medium is verwijderd en de cellen zijn gelyseerd om de hoeveelheid geproduceerde luciferase te kunnen bepalen.

Op elke plaat is een ijklijn van de standaard 17β-estradiol meegenomen. De waarden van de monsters zijn in deze ijklijn geïnterpoleerd om zo de estradiolequivalenten te bepalen. Een voorbeeld van een dergelijke ijklijn is weergegeven in figuur B5.1. Alle extracten zijn getest in triplo.

## PRESENTATIE VAN RESULTATEN

De gemeten oestrogene activiteit van de influenten en effluenten staat vermeld in Bijlage 6. Een voorbeeld van een 17β-estradiol calibratiecurve is gegeven in figuur B5.1.

FIGUUR B5.1 VOORBEELD VAN EEN 17B-ESTRADIOL CALIBRATIECURVE





**BIJLAGE 6**

# RESULTATEN HORMOONVERSTORENDE STOFFEN

## Bisfenol A

| RWZI      | datum    | infi  | nabez | rej   | zand | monster (ng/l) | UV | MBR | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand | zand - kool | nabez - UV | rendement (%) | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |
|-----------|----------|-------|-------|-------|------|----------------|----|-----|-------|------|--------------|--------------|-------------|------------|---------------|------------|---------------|--------------|-------------|
| RWZIA     | 13-07-04 | 550   | 1.580 | -     | -    | -              | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIA     | 26-07-04 | 1.010 | 2.640 | -     | -    | -              | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 07-07-04 | 770   | *     | 1.300 | -    | -              | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 14-07-04 | 980   | 16    | 900   | -    | -              | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 20-07-04 | 880   | 15    | -     | 25   | -              | -  | -   | -     | -    | -66,7        | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 28-07-04 | 930   | 41    | -     | 41   | -              | -  | -   | -     | -    | 0,0          | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 15-03-05 | -     | 23    | -     | 20   | -              | -  | -   | -     | -    | 13,0         | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 20-07-04 | 1.030 | 23    | -     | 17   | -              | -  | -   | -     | -    | 26,1         | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 27-07-04 | 1.210 | 41    | -     | 26   | -              | -  | -   | -     | -    | 96,6         | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 22-03-05 | 3.100 | 40    | -     | <18  | -              | -  | -   | -     | <17  | >55,0        | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZID     | 06-04-05 | 1.000 | 250   | -     | <17  | -              | -  | -   | -     | <17  | >93,2        | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZIE     | 17-06-04 | -     | 140   | -     | 110  | 13             | -  | -   | -     | -    | 21,4         | 88,2         | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 21-06-04 | -     | 210   | -     | 770  | 26             | -  | -   | -     | -    | -26,7        | 96,6         | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 28-06-04 | -     | 130   | -     | 140  | 21             | -  | -   | -     | -    | -7,7         | 85,0         | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 14-07-04 | -     | 18    | -     | -    | -              | -  | -   | 12    | -    | -            | -            | -           | -          | -             | 33,3       | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 28-07-04 | -     | 22    | -     | -    | -              | -  | -   | <8,3  | -    | -            | -            | -           | -          | -             | >62,3      | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 13-04-05 | -     | 49    | -     | 150  | -              | -  | -   | 94    | -    | -20,6        | -            | -           | -          | -             | -91,8      | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 20-07-04 | 880   | -     | -     | -    | -              | -  | 23  | -     | -    | -            | -            | -           | -          | 97,4          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 28-07-04 | 930   | -     | -     | -    | -              | -  | 17  | -     | -    | -            | -            | -           | 98,2       | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIH     | 27-07-04 | 1.940 | -     | -     | -    | -              | -  | 82  | -     | -    | -            | -            | -           | 95,8       | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZIH     | 02-08-04 | 1.300 | -     | -     | -    | -              | -  | 10  | -     | -    | -            | -            | -           | 99,2       | -             | -          | -             | -            | -           |
| RWZII     | 07-07-04 | -     | 100   | -     | -    | -              | -  | -   | -     | 150  | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -50,0       |
| RWZII     | 14-07-04 | -     | 110   | -     | -    | -              | -  | -   | -     | 170  | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -54,5       |
| RWZII     | 28-02-05 | -     | 92    | -     | -    | -              | -  | -   | -     | 180  | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -95,7       |
| gemiddeld |          | 1.225 | 292   | 1.100 | 121  | 20             | -  | 33  | 38    | 107  | 94,3         | -50,0        | 89,9        | -          | 97,6          | -29,3      | -66,7         | n.b.         |             |
| sdev      |          | 681   | 668   | 283   | 221  | 7              | -  | 33  | 48    | 83   | 8,6          | 110,8        | 6,0         | -          | 1,5           | 88,5       | 25,1          | -            |             |
| min       |          | 550   | 15    | 900   | <17  | 13             | -  | 10  | <8,3  | <17  | 750          | -266,7       | 850         | -          | 95,8          | -91,8      | -95,7         | -            |             |
| max       |          | 3.100 | 2.640 | 1.300 | 770  | 26             | -  | 82  | 94    | 180  | 98,7         | 36,6         | 96,6        | -          | 99,2          | 33,3       | -50,0         | -            |             |
| n         |          | 12    | 19    | 2     | 11   | 3              | 0  | 4   | 3     | 5    | 7            | 11           | 3           | 0          | 4             | 3          | 3             | 3            | 2           |
| n>dl      |          | 12    | 19    | 2     | 9    | 3              | 0  | 4   | 2     | 3    | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |
| n<dl      |          | 0     | 0     | 0     | 2    | 0              | 0  | 0   | 1     | 2    | -            | -            | -           | -          | -             | -          | -             | -            | -           |

NB:infi rwzi C= infi rwzi G

Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen

curstief = <LOQ

\* = verloren gegaan

\*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde

n.b. = niet te bepalen

**17 $\alpha$ -oestradiol (in ng/l)**

| RWZI      | datum    | monster |       |     |      |      |    |      |       |      |              | rendement (%) |             |            |            |               |              |             |
|-----------|----------|---------|-------|-----|------|------|----|------|-------|------|--------------|---------------|-------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|
|           |          | infi    | nabez | rej | zand | kool | UV | MBR  | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand  | zand - kool | nabez - UV | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |
| RWZIA     | 13-07-04 | 3,8     | <0,5  | -   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIA     | 26-07-04 | <0,7    | <0,5  | -   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 07-07-04 | 9,9     | *     | <1  | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 14-07-04 | 6,0     | <0,5  | 1,9 | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 20-07-04 | <0,6    | <1,1  | -   | <0,5 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 28-07-04 | 4,6     | <1    | -   | <1   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 15-03-05 | -       | <3    | -   | <3   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 20-07-04 | 3       | <0,5  | -   | <0,5 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 27-07-04 | 6       | <1    | -   | <1   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 22-03-05 | <5      | <1    | -   | <1   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZID     | 06-04-05 | <3      | <5    | -   | <3   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZIE     | 17-06-04 | -       | <0,5  | -   | <0,5 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 21-06-04 | -       | <0,6  | -   | <0,5 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 28-06-04 | -       | <2    | -   | <3   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 14-07-04 | -       | <0,6  | -   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZIF     | 28-07-04 | -       | <1    | -   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZIF     | 13-04-05 | -       | <1    | -   | <5   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZIG     | 20-07-04 | <0,6    | -     | -   | -    | -    | -  | -    | -     | <1   | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZIG     | 28-07-04 | 4,6     | -     | -   | -    | -    | -  | -    | -     | <1   | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | >78,3       |
| RWZIH     | 27-07-04 | 5,3     | -     | -   | -    | -    | -  | -    | -     | <1,1 | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | >79,2       |
| RWZIH     | 02-08-04 | 6,8     | -     | -   | -    | -    | -  | -    | -     | <1   | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | >85,3       |
| RWZII     | 07-07-04 | -       | <0,6  | -   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZII     | 14-07-04 | -       | <0,5  | -   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| RWZII     | 28-02-05 | -       | <3    | -   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | n.b.        |
| gemiddeld |          | 4,6     | 1,3   | 1,5 | 1,7  | 1,0  | -  | 1,0  | 1,2   | 1,0  | 1,0          | 1,0           | 1,0         | 1,0        | 1,0        | 1,0           | 1,0          | 1,0         |
| stdev     |          | 2,6     | 1,2   | 0,6 | 1,5  | 0,9  | -  | 0,1  | 0,7   | 0,6  | 0,6          | 0,6           | 0,6         | 0,6        | 0,6        | 0,6           | 0,6          | 0,6         |
| imin      |          | <0,6    | <0,5  | <1  | <0,5 | <0,5 | -  | <1   | <0,6  | <0,6 | <0,6         | <0,6          | <0,6        | <0,6       | <0,6       | <0,6          | <0,6         | <0,6        |
| max       |          | 9,9     | <5    | 1,9 | <5   | <2   | -  | <1,1 | <2    | <2   | <2           | <2            | <2          | <2         | <2         | <2            | <2           | <2          |
| n         |          | 12      | 19    | 2   | 11   | 3    | 0  | 4    | 3     | 5    | 5            | 5             | 5           | 5          | 5          | 5             | 5            | 5           |
| n>dl      |          | 7       | 0     | 1   | 0    | 0    | 0  | 0    | 0     | 0    | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0             | 0            | 0           |
| n<dl      |          | 5       | 19    | 1   | 11   | 3    | 0  | 4    | 3     | 5    | 5            | 5             | 5           | 5          | 5          | 5             | 5            | 5           |

NB: infi rwzi C= infi rwzi G  
 Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen  
 cursief = <LOQ  
 \* = verloren gegaan  
 \*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde  
 n.b. = niet te bepalen

## Oestron (in ng/l)

| RWZI      | datum    | infi | nabez | rej | zand | monster |    |      | rendement (%) |    |    | helo | infi - nabez | nabez - zand | zand - kool | nabez - UV | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |        |
|-----------|----------|------|-------|-----|------|---------|----|------|---------------|----|----|------|--------------|--------------|-------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|--------|
|           |          |      |       |     |      | kool    | UV | MBR  | naMBR         |    |    |      |              |              |             |            |            |               |              |             |        |
| RWZI A    | 13-07-04 | 83   | <0,5  | -   | -    | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | >99,4        | -            | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI A    | 26-07-04 | 55   | <1,1  | -   | -    | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | >98,0        | -            | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI B    | 07-07-04 | 55   | *     | 22  | -    | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI B    | 14-07-04 | 74   | 1,6   | 27  | -    | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | 97,8         | -            | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI C    | 20-07-04 | 41   | 4,3   | -   | 10   | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | 89,5         | -132,6       | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI C    | 28-07-04 | 150  | 5,2   | -   | 3,8  | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | 96,5         | 26,9         | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI C    | 15-03-05 | -    | <3    | -   | <3   | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | n.b.         | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI D    | 20-07-04 | 48   | 1,5   | -   | <0,5 | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | 96,9         | >66,7        | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI D    | 27-07-04 | 53   | <0,9  | -   | <1   | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | >98,3        | n.b.         | -           | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI D    | 22-03-05 | 64   | 3,1   | -   | 1,4  | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | 95,2         | >64,8        | -           | -          | -          | -             | -            | >28,6       |        |
| RWZI D    | 06-04-05 | 98   | <5    | -   | <3   | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | >94,9        | n.b.         | -           | -          | -          | -             | -            | >-133,3     |        |
| RWZI E    | 17-06-04 | -    | <0,5  | -   | <0,5 | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | n.b.         | n.b.        | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI E    | 21-06-04 | -    | <0,6  | -   | <0,5 | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | n.b.         | n.b.        | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI E    | 28-06-04 | -    | <2    | -   | <3   | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | n.b.         | n.b.        | -          | -          | -             | -            | -           |        |
| RWZI F    | 14-07-04 | -    | 2,9   | -   | -    | -       | -  | -    | <0,6          | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | -          | >79,3         | -            | -           |        |
| RWZI F    | 28-07-04 | -    | 1,3   | -   | -    | -       | -  | -    | <1            | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | >23,1      | -             | -            | -           |        |
| RWZI F    | 13-04-05 | -    | <1    | -   | <5   | -       | -  | -    | <2            | -  | -  | -    | -            | n.b.         | -           | -          | n.b.       | -             | -            | -           |        |
| RWZI G    | 20-07-04 | 41   | -     | -   | -    | -       | -  | 0,6  | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | 98,5       | -             | -            | -           |        |
| RWZI G    | 28-07-04 | 150  | -     | -   | -    | -       | -  | 6    | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | 96,0       | -             | -            | -           |        |
| RWZI H    | 27-07-04 | 120  | -     | -   | -    | -       | -  | <1,1 | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | >99,1      | -             | -            | -           |        |
| RWZI H    | 02-08-04 | 130  | -     | -   | -    | -       | -  | <1   | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | >99,2      | -             | -            | -           |        |
| RWZI I    | 07-07-04 | -    | 18    | -   | -    | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | -          | -             | -            | -88,9       |        |
| RWZI I    | 14-07-04 | -    | 12    | -   | -    | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | -          | -             | -            | -175,0      |        |
| RWZI I    | 28-02-05 | -    | 28    | -   | -    | -       | -  | -    | -             | -  | -  | -    | -            | -            | -           | -          | -          | -             | -            | >96,4       |        |
| gemiddeld |          | 81   | 4,9   | 25  | 2,9  | 1,0     | -  | 2,2  | 1,2           | 15 | 15 | 15   | 95,2         | -52,8        | n.b.        | n.b.       | 97,3       | n.b.          | -            | -131,9      |        |
| stdev     |          | 36   | 7,1   | 4   | 2,8  | 0,9     | -  | 2,6  | 0,7           | 17 | 17 | 17   | 3,3          | 112,8        | n.b.        | n.b.       | 1,8        | n.b.          | -            | -           | 60,9   |
| min       |          | 41   | <0,5  | 22  | <0,5 | <0,5    | -  | 0,6  | <0,6          | <1 | <1 | <1   | 89,5         | -132,6       | n.b.        | n.b.       | 96,0       | >23,1         | -            | -           | -175,0 |
| max       |          | 150  | 28    | 27  | 10   | <2      | -  | 6    | <2            | 34 | 34 | 34   | >99,4        | >66,7        | n.b.        | n.b.       | >99,2      | >79,1         | -            | -           | >96,4  |
| n         |          | 12   | 19    | 2   | 11   | 3       | 0  | 4    | 3             | 5  | 5  | 5    | 5            | 2            | 0           | 0          | 2          | 0             | 0            | 2           | 2      |
| n>dl      |          | 12   | 10    | 2   | 3    | 3       | 0  | 2    | 0             | 3  | 3  | 3    | 5            | 2            | 0           | 0          | 2          | 0             | 0            | 2           | 0      |
| n<dl      |          | 0    | 9     | 0   | 8    | 0       | 0  | 2    | 3             | 2  | 2  | 2    | 0            | 0            | 0           | 0          | 0          | 0             | 0            | 0           | 0      |

NB:infi rwzi C= infi rwzi G

Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen  
 cursorief = <LOQ

\* = verloren gegaan

\*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde

n.b. = niet te bepalen





## Oestriol (in ng/l)

| RWZI      | datum    | infi | nabez | rej  | zand | monster<br>kool | UV | MBR | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand | zand - kool | nabez - UV | rendement (%)<br>infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |
|-----------|----------|------|-------|------|------|-----------------|----|-----|-------|------|--------------|--------------|-------------|------------|-----------------------------|---------------|--------------|-------------|
| RWZI A    | 13-07-04 | 57   | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZI A    | 26-07-04 | 163  | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 07-07-04 | 99   | *     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 14-07-04 | 43   | -     | 2,7  | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 20-07-04 | 208  | -     | -    | 1,3  | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 28-07-04 | 37   | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 15-03-05 | -    | <-3   | -    | <-3  | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZID     | 20-07-04 | 199  | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZID     | 27-07-04 | 334  | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZID     | 22-03-05 | 160  | <1    | -    | <1   | -               | -  | -   | -     | <1   | >99,4        | n.b.         | -           | -          | -                           | -             | n.b.         | n.b.        |
| RWZID     | 06-04-05 | 140  | <5    | -    | <3   | -               | -  | -   | -     | <2   | >96,4        | n.b.         | -           | -          | -                           | -             | n.b.         | n.b.        |
| RWZIE     | 17-06-04 | -    | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 21-06-04 | -    | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 28-06-04 | -    | <-2   | -    | <-3  | <-2             | -  | -   | -     | -    | n.b.         | n.b.         | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 14-07-04 | -    | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 28-07-04 | -    | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 13-04-05 | -    | <-1   | -    | <-5  | -               | -  | -   | <-2   | -    | n.b.         | n.b.         | -           | -          | n.b.                        | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 20-07-04 | 208  | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 28-07-04 | 37   | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIH     | 27-07-04 | 44   | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZIH     | 02-08-04 | 34   | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZII     | 07-07-04 | -    | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZII     | 14-07-04 | -    | -     | -    | -    | -               | -  | -   | -     | <-1  | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | -            | -           |
| RWZII     | 28-02-05 | -    | <-3   | -    | -    | -               | -  | -   | -     | -    | -            | -            | -           | -          | -                           | -             | n.b.         | -           |
| gemiddeld |          | 127  | 2,5   | 2,7  | 2,7  | 2,0             | -  | -   | 2,0   | 1,3  | n.b.         | n.b.         | n.b.        | -          | -                           | n.b.          | n.b.         | n.b.        |
| stdev     |          | 92   | 1,5   | n.b. | 1,5  | n.b.            | -  | -   | n.b.  | 0,6  | n.b.         | n.b.         | n.b.        | -          | -                           | n.b.          | n.b.         | n.b.        |
| min       |          | 34   | <1    | 2,7  | <1   | <2              | -  | -   | <2    | <1   | >96,4        | n.b.         | n.b.        | -          | n.b.                        | n.b.          | n.b.         | n.b.        |
| max       |          | 334  | <-5   | 2,7  | <-5  | <-2             | -  | -   | <-2   | <-2  | >99,4        | n.b.         | n.b.        | -          | n.b.                        | n.b.          | n.b.         | n.b.        |
| n         |          | 12   | 6     | 1    | 6    | 1               | 0  | 0   | 1     | 3    | 0            | 0            | 0           | 0          | 0                           | 0             | 0            | 0           |
| n>dl      |          | 12   | 0     | 1    | 1    | 0               | 0  | 4   | 0     | 0    | 0            | 0            | 0           | 0          | 0                           | 0             | 0            | 0           |
| n<dl      |          | 0    | 6     | 0    | 5    | 1               | 0  | 0   | 1     | 3    | 0            | 0            | 0           | 0          | 0                           | 0             | 0            | 0           |

NB:infi rwzi C= infi rwzi G

Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn > waarden niet meegenomen

coursef = <LOQ

\* = verloren gegaan

\*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde

n.b. = niet te bepalen

## Mestranol (in ng/l)

| RWZI      | datum    | monster |       |      |      |      |    |      |       |      |              | rendement (%) |             |            |            |               |              |             |   |
|-----------|----------|---------|-------|------|------|------|----|------|-------|------|--------------|---------------|-------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|---|
|           |          | infi    | nabez | rej  | zand | kool | UV | MBR  | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand  | zand - kool | nabez - UV | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |   |
| RWZIA     | 13-07-04 | <1      | <1,1  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIA     | 26-07-04 | <1,4    | <1,1  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIB     | 07-07-04 | <1,3    | *     | <2,7 | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIB     | 14-07-04 | <1,2    | <1,1  | <1,2 | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIC     | 20-07-04 | <2,2    | <1,7  | -    | <1   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIC     | 28-07-04 | <2,3    | <2    | -    | <2   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIC     | 15-03-05 | -       | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZID     | 20-07-04 | <3,5    | <1,5  | -    | <1,6 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZID     | 27-07-04 | <2,2    | <2,1  | -    | <2   | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZID     | 22-03-05 | -       | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZID     | 06-04-05 | -       | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIE     | 17-06-04 | -       | <1    | -    | <1   | <1   | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIE     | 21-06-04 | -       | <1,1  | -    | <1,1 | <1,1 | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIE     | 28-06-04 | -       | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIF     | 14-07-04 | -       | <1,1  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIF     | 28-07-04 | -       | <2    | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIF     | 13-04-05 | -       | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIG     | 20-07-04 | <2,2    | -     | -    | -    | <2,1 | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIG     | 28-07-04 | <2,3    | -     | -    | -    | <2   | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIH     | 27-07-04 | <2,5    | -     | -    | -    | <2,3 | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZIH     | 02-08-04 | <2,6    | -     | -    | -    | <2   | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZII     | 07-07-04 | -       | <1,2  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZII     | 14-07-04 | -       | <1,1  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| RWZII     | 28-02-05 | -       | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| gemiddeld |          | 2,0     | 1,4   | 2,0  | 1,5  | 1,1  | -  | 2,1  | 1,7   | 1,2  | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| stdev     |          | 0,8     | 0,4   | 1,1  | 0,5  | 0,1  | -  | 0,1  | 0,6   | 0,1  | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| min       |          | <1      | <1    | <1,2 | <1   | <1   | -  | <2   | <1,2  | <1,1 | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| max       |          | <3,5    | <2,1  | <2,7 | <2   | <1,1 | -  | <2,3 | <2,1  | 1,2  | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| n         |          | 13      | 13    | 2    | 6    | 2    | 0  | 4    | 2     | 2    | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0             | 0            | 0           | 0 |
| n>dl      |          | 0       | 0     | 0    | 0    | 0    | 0  | 0    | 0     | 1    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |
| n<dl      |          | 13      | 13    | 1    | 6    | 2    | 0  | 4    | 2     | 1    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           | - |

NB: infi rwzi C = infi rwzi G

Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen

cursef = <LOQ

\* = verloren gegaan

\*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde

n.b. = niet te bepalen

## 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol (in ng/l)

| RWZI      | datum    | infi | nabez | rej  | zand | monster<br>kool | UV | MIBR | naMIBR | helo | infi - nabez | nabez - zand | zand - kool | nabez - UV | rendement (%)<br>infi - MIBR | nabez - naMIBR | nabez - helo | zand - helo |
|-----------|----------|------|-------|------|------|-----------------|----|------|--------|------|--------------|--------------|-------------|------------|------------------------------|----------------|--------------|-------------|
| RWZI A    | 13-07-04 | 3,0  | <1,1  | -    | -    | -               | -  | -    | -      | -    | >63,3        | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI A    | 26-07-04 | <3,6 | <2,6  | -    | -    | -               | -  | -    | -      | -    | n.b.         | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI B    | 07-07-04 | 2,8  | *     | <2   | -    | -               | -  | -    | -      | -    | -            | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI B    | 14-07-04 | 2,8  | <1,5  | <2,4 | -    | -               | -  | -    | -      | -    | >46,4        | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI C    | 20-07-04 | 2,2  | <4    | -    | <2,1 | -               | -  | -    | -      | -    | >81,8        | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI C    | 28-07-04 | <3,4 | <3,1  | -    | <3,1 | -               | -  | -    | -      | -    | n.b.         | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI C    | 15-03-05 | -    | <3    | -    | <3   | -               | -  | -    | -      | -    | n.b.         | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI D    | 20-07-04 | 3,0  | <1,6  | -    | <1,7 | -               | -  | -    | -      | -    | >46,7        | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI D    | 27-07-04 | 9,2  | <3,2  | -    | <3   | -               | -  | -    | -      | -    | >65,2        | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | n.b.        |
| RWZI D    | 22-03-05 | <5   | <1    | -    | <1   | -               | -  | -    | -      | <1   | n.b.         | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | n.b.        |
| RWZI D    | 06-04-05 | <5   | <5    | -    | <3   | -               | -  | -    | -      | <2   | n.b.         | -            | -           | -          | -                            | -              | -            | n.b.        |
| RWZI E    | 17-06-04 | -    | <1    | -    | <1   | <1              | -  | -    | -      | -    | n.b.         | n.b.         | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI E    | 21-06-04 | -    | <1,1  | -    | <1,1 | <1,1            | -  | -    | -      | -    | n.b.         | n.b.         | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI E    | 28-06-04 | -    | <2    | -    | <3   | <2              | -  | -    | -      | -    | n.b.         | n.b.         | -           | -          | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI F    | 14-07-04 | -    | <1,1  | -    | -    | -               | -  | -    | <1,2   | -    | -            | -            | -           | -          | n.b.                         | -              | -            | -           |
| RWZI F    | 28-07-04 | -    | <3,1  | -    | -    | -               | -  | -    | <3,1   | -    | -            | -            | -           | -          | n.b.                         | -              | -            | -           |
| RWZI F    | 13-04-05 | -    | <1    | -    | <5   | -               | -  | -    | <2     | -    | -            | -            | -           | -          | n.b.                         | -              | -            | -           |
| RWZI G    | 20-07-04 | 2,2  | -     | -    | -    | -               | -  | <3,1 | -      | -    | -            | -            | -           | >40,9      | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI G    | 28-07-04 | <3,4 | -     | -    | -    | -               | -  | <2,9 | -      | -    | -            | -            | -           | n.b.       | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI H    | 27-07-04 | <3,7 | -     | -    | -    | -               | -  | <3,4 | -      | -    | -            | -            | -           | n.b.       | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI H    | 02-08-04 | 4,2  | -     | -    | -    | -               | -  | <3,1 | -      | -    | -            | -            | -           | >26,2      | -                            | -              | -            | -           |
| RWZI I    | 07-07-04 | -    | <1,2  | -    | -    | -               | -  | -    | -      | <1,1 | -            | -            | -           | -          | -                            | n.b.           | -            | -           |
| RWZI I    | 14-07-04 | -    | <1,5  | -    | -    | -               | -  | -    | -      | <1,6 | -            | -            | -           | -          | -                            | n.b.           | -            | -           |
| RWZI I    | 28-02-05 | -    | <3    | -    | -    | -               | -  | -    | -      | <1   | -            | -            | -           | -          | -                            | n.b.           | -            | -           |
| gemiddeld |          | 3,8  | n.b.  | n.b. | n.b. | n.b.            | -  | n.b. | n.b.   | n.b. | n.b.         | n.b.         | n.b.        | n.b.       | n.b.                         | n.b.           | n.b.         | n.b.        |
| stdev     |          | 1,8  | n.b.  | n.b. | n.b. | n.b.            | -  | n.b. | n.b.   | n.b. | n.b.         | n.b.         | n.b.        | n.b.       | n.b.                         | n.b.           | n.b.         | n.b.        |
| min       |          | 2,2  | <1    | <2   | <1   | <1              | -  | <2,9 | <1,2   | <1   | >81,8        | n.b.         | n.b.        | >40,9      | n.b.                         | n.b.           | n.b.         |             |
| max       |          | 9,2  | <5    | <2,4 | <5   | <2              | -  | <3,4 | <3,1   | <2   | >65,2        | n.b.         | n.b.        | 26,2       | n.b.                         | n.b.           | n.b.         |             |
| n         |          | 12   | 19    | 2    | 11   | 3               | 0  | 4    | 3      | 5    | 0            | 0            | 0           | 0          | 0                            | 0              | 0            |             |
| n>dl      |          | 7    | 0     | 0    | 0    | 0               | 0  | 0    | 0      | 0    | 0            | 0            | 0           | 0          | 0                            | 0              | 0            |             |
| n<dl      |          | 5    | 19    | 2    | 11   | 3               | 0  | 4    | 3      | 5    | 0            | 0            | 0           | 0          | 0                            | 0              | 0            |             |

NB: infI rwzi C = infI rwzi G

Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen

curstef = <LOQ

\* = verloren gegaan

\*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde

n.b. = niet te bepalen

## Nonyfenol (in µg/l)

| RWZI      | datum    | nabez |       |      | monster |      |    | MBR  |       |      | nabez - naMBR |              |             | rendement (%) |            |              |             |
|-----------|----------|-------|-------|------|---------|------|----|------|-------|------|---------------|--------------|-------------|---------------|------------|--------------|-------------|
|           |          | infi  | nabez | rej  | zand    | kool | UV | MBR  | naMBR | helo | infi - nabez  | nabez - zand | zand - kool | nabez - UV    | infi - MBR | nabez - helo | zand - helo |
| RWZI A    | 13-07-04 | 10    | 0,28  | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI A    | 26-07-04 | 33    | 1,1   | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI B    | 07-07-04 | 16    | 2,4   | 25   | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI B    | 14-07-04 | 10    | 0,48  | 12   | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI C    | 20-07-04 | 15    | 0,15  | -    | 0,47    | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI C    | 28-07-04 | 23    | 0,42  | -    | 0,62    | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI C    | 15-03-05 | -     | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI D    | 20-07-04 | 14    | 0,34  | -    | 0,75    | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI D    | 27-07-04 | 21    | 0,39  | -    | 0,55    | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI D    | 22-03-05 | -     | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI D    | 06-04-05 | -     | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI E    | 17-06-04 | -     | 0,94  | -    | 0,94    | 0,67 | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI E    | 21-06-04 | -     | 0,50  | -    | 0,47    | 0,37 | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI E    | 28-06-04 | -     | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI F    | 14-07-04 | -     | 0,25  | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI F    | 28-07-04 | -     | 0,33  | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI F    | 13-04-05 | -     | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI G    | 20-07-04 | 15    | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI G    | 28-07-04 | 23    | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI H    | 27-07-04 | 60    | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI H    | 02-08-04 | 51    | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI I    | 07-07-04 | -     | 0,74  | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI I    | 14-07-04 | -     | 0,63  | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| RWZI I    | 28-02-05 | -     | -     | -    | -       | -    | -  | -    | -     | -    | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| gemiddeld |          | 25    | 0,64  | 18,5 | 0,63    | 0,52 | -  | 0,79 | 0,76  | 0,62 | -             | -            | -           | -             | -          | -            | -           |
| stdev     |          | 17    | 0,57  | 9,2  | 0,18    | 0,21 | -  | 0,64 | 0,62  | 0,54 | 25,0          | -            | -           | 95,5          | -146       | 4,4          | -           |
| min       |          | 10    | 0,15  | 12   | 0,47    | 0,37 | -  | 0,63 | 0,32  | 0,24 | 5,3           | -            | -           | 5,4           | 167        | 89,3         | -           |
| max       |          | 60    | 2,4   | 25   | 0,94    | 0,67 | -  | 1,6  | 1,20  | 1,0  | 21,3          | -            | -           | 89,3          | -264       | -58,7        | -           |
| n         |          | 10    | 14    | 2    | 6       | 2    | 0  | 4    | 2     | 2    | 28,7          | -            | -           | >99,8         | -28,0      | 67,6         | -           |
| n>dl      |          | 10    | 14    | 2    | 6       | 2    | 0  | 3    | 2     | 2    | 2             | -            | -           | 3             | 2          | 2            | 0           |
| n<dl      |          | 0     | 0     | 0    | 0       | 0    | 0  | 1    | 0     | 0    | 0             | -            | -           | 0             | 2          | 2            | 0           |

NB: infi rwzi C = infi rwzi G  
 Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen  
 cursief = <LOQ  
 \* = verloren gegaan  
 \*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde  
 n.b. = niet te bepalen

## Nonylfenolmonoethoxylaat (NPEO1; in µg/l)

| RWZI      | datum    | monster |       |       |       |      |    |       |        |       |              | rendement (%) |             |            |             |                |              |             |
|-----------|----------|---------|-------|-------|-------|------|----|-------|--------|-------|--------------|---------------|-------------|------------|-------------|----------------|--------------|-------------|
|           |          | infi    | nabez | rej   | zand  | kool | UV | MIBR  | naMIBR | helo  | infi - nabez | nabez - zand  | zand - kool | nabez - UV | infi - MIBR | nabez - naMIBR | nabez - helo | zand - helo |
| RWZI A    | 13-07-04 | 0,07    | 0,18  | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI A    | 26-07-04 | 29      | 0,21  | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI B    | 07-07-04 | 0,29    | 0,39  | <0,05 | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI B    | 14-07-04 | <0,05   | 0,22  | <0,05 | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI C    | 20-07-04 | 20      | 0,08  | -     | 0,06  | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI C    | 28-07-04 | 10      | 0,17  | -     | 0,11  | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI C    | 15-03-05 | -       | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI D    | 20-07-04 | 52      | 0,09  | -     | 0,09  | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI D    | 27-07-04 | 37      | <0,05 | -     | <0,05 | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI D    | 22-03-05 | -       | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI D    | 06-04-05 | -       | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI E    | 17-06-04 | -       | 0,61  | -     | 0,39  | 0,37 | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI E    | 21-06-04 | -       | 0,62  | -     | 0,27  | 0,35 | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI E    | 28-06-04 | -       | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI F    | 14-07-04 | -       | 0,12  | -     | -     | -    | -  | -     | -      | <0,05 | -            | -             | -           | -          | -           | >58,3          | -            | -           |
| RWZI F    | 28-07-04 | -       | 0,06  | -     | -     | -    | -  | -     | -      | 0,39  | -            | -             | -           | -          | -           | -550           | -            | -           |
| RWZI F    | 13-04-05 | -       | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| RWZI G    | 20-07-04 | 20      | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | <0,05 | -            | -             | -           | -          | -           | >99,8          | -            | -           |
| RWZI G    | 28-07-04 | 10      | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | 0,14  | -            | -             | -           | -          | -           | 98,6           | -            | -           |
| RWZI H    | 27-07-04 | 39      | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | 0,10  | -            | -             | -           | -          | -           | 99,7           | -            | -           |
| RWZI H    | 02-08-04 | 0,64    | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | 0,16  | -            | -             | -           | -          | -           | 75,0           | -            | -           |
| RWZI I    | 07-07-04 | -       | 1,1   | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | 72,7        |
| RWZI I    | 14-07-04 | -       | 0,33  | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -24,2       |
| RWZI I    | 28-02-05 | -       | -     | -     | -     | -    | -  | -     | -      | -     | -            | -             | -           | -          | -           | -              | -            | -           |
| gemiddeld |          | 19      | 0,30  | <0,05 | 0,16  | 0,36 | -  | 0,11  | 0,22   | 0,36  | 0,36         | 0,36          | 0,36        | 0,36       | 0,36        | 0,36           | 0,36         | 0,36        |
| stdev     |          | 19      | 0,30  | n.b.  | 0,14  | 0,01 | -  | 0,05  | 0,24   | 0,08  | 0,08         | 0,08          | 0,08        | 0,08       | 0,08        | 0,08           | 0,08         | 0,08        |
| min       |          | <0,05   | <0,05 | <0,05 | <0,05 | 0,35 | -  | <0,05 | <0,05  | 0,30  | 0,30         | 0,30          | 0,30        | 0,30       | 0,30        | 0,30           | 0,30         | 0,30        |
| max       |          | 52      | 1,1   | <0,05 | 0,4   | 0,37 | -  | 0,16  | 0,39   | 0,41  | 0,41         | 0,41          | 0,41        | 0,41       | 0,41        | 0,41           | 0,41         | 0,41        |
| n         |          | 10      | 14    | 2     | 6     | 2    | 0  | 4     | 2      | 2     | 2            | 2             | 2           | 2          | 2           | 2              | 2            | 2           |
| n>dl      |          | 9       | 13    | 0     | 5     | 2    | 0  | 3     | 1      | 1     | 1            | 1             | 1           | 1          | 1           | 1              | 1            | 1           |
| n<dl      |          | 1       | 1     | 2     | 1     | 0    | 0  | 1     | 1      | 1     | 1            | 1             | 1           | 1          | 1           | 1              | 1            | 1           |

NB: infi rwzi C= infi rwzi G

Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen

curstet = <LOQ

\* = verloren gegaan

\*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde

n.b. = niet te bepalen

## Nonyfenoldiethoxylaar (NPEO2; in µg/l)

| RWZI      | datum    | monster |       |       |       |       |    |       |       |      |              | rendement (%) |             |            |            |               |              |             |
|-----------|----------|---------|-------|-------|-------|-------|----|-------|-------|------|--------------|---------------|-------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|
|           |          | infi    | nabez | rej   | zand  | kool  | UV | MBR   | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand  | zand - kool | nabez - UV | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |
| RWZIA     | 13-07-04 | 0,84    | <0,05 | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIA     | 26-07-04 | 7,2     | 0,05  | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 07-07-04 | 1,7     | 0,10  | <0,05 | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 14-07-04 | 0,91    | <0,05 | 0,43  | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 20-07-04 | 13      | <0,05 | -     | 0,05  | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | n.b.       | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 28-07-04 | 7,0     | 0,18  | -     | <0,05 | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | >72,2      | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 15-03-05 | -       | -     | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 20-07-04 | 8,7     | 0,11  | -     | 0,08  | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | 27,3       | -             | -            | -           |
| RWZID     | 27-07-04 | 7,8     | <0,05 | -     | <0,05 | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | n.b.       | -             | -            | -           |
| RWZID     | 22-03-05 | -       | -     | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 06-04-05 | -       | -     | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 17-06-04 | -       | 0,10  | -     | 0,07  | 0,08  | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | 30,0       | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 21-06-04 | -       | 0,15  | -     | 0,07  | <0,05 | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | 53,3       | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 28-06-04 | -       | -     | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 14-07-04 | -       | <0,05 | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | n.b.          | -            | -           |
| RWZIF     | 28-07-04 | -       | <0,05 | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | n.b.          | -            | -           |
| RWZIF     | 13-04-05 | -       | -     | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 20-07-04 | 13      | -     | -     | -     | -     | -  | -     | <0,05 | -    | -            | -             | -           | -          | -          | >99,6         | -            | -           |
| RWZIG     | 28-07-04 | 7,0     | -     | -     | -     | -     | -  | -     | 0,11  | -    | -            | -             | -           | -          | -          | 98,4          | -            | -           |
| RWZIH     | 27-07-04 | 9,5     | -     | -     | -     | -     | -  | -     | 0,09  | -    | -            | -             | -           | -          | -          | 99,1          | -            | -           |
| RWZIH     | 02-08-04 | 1,8     | -     | -     | -     | -     | -  | -     | <0,05 | -    | -            | -             | -           | -          | -          | >97,2         | -            | -           |
| RWZII     | 07-07-04 | -       | 0,21  | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | 33,3        |
| RWZII     | 14-07-04 | -       | 0,11  | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -45,5       |
| RWZII     | 28-02-05 | -       | -     | -     | -     | -     | -  | -     | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| gemiddeld |          | 5,8     | 0,13  | 0,24  | 0,06  | 0,07  | -  | 0,08  | 0,07  | 0,15 | -            | -             | -           | -          | 36,9       | -             | -            | -           |
| stdev     |          | 4,3     | 0,05  | 0,3   | 0,01  | 0,02  | -  | 0,03  | 0,02  | 0,01 | -            | -             | -           | -          | 14,3       | n.b.          | -            | -           |
| min       |          | 0,8     | 0,05  | <0,05 | <0,05 | <0,05 | -  | <0,05 | <0,05 | 0,14 | -            | -             | -           | -          | 27,3       | -             | -            | -           |
| max       |          | 13,0    | 0,2   | 0,43  | 0,08  | 0,08  | -  | 0,11  | 0,08  | 0,16 | -            | -             | -           | -          | >72,2      | -             | -            | -           |
| n         |          | 10      | 14    | 2     | 6     | 2     | 0  | 4     | 2     | 2    | 0            | 1             | 0           | 3          | 1          | 0             | 2            | 0           |
| n>dl      |          | 10      | 8     | 1     | 4     | 1     | 0  | 2     | 1     | 2    | 0            | 1             | 0           | 2          | 1          | 2             | 2            | 2           |
| n<dl      |          | 0       | 6     | 1     | 2     | 1     | 0  | 2     | 1     | 0    | 0            | 2             | 1           | 0          | 1          | 0             | 0            | 0           |

NB: infi rwzi C= infi rwzi G  
 Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen  
 curset = <LOQ  
 \* = verloren gegaan  
 \*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde  
 n.b. = niet te bepalen

**Nonyfenoethoxylaten met 3 tot 16 ketens (NPEO10; in µg/l)**

| RWZI      | datum    | monster |       |       |      |      |    |      |       |      |              | rendement (%) |             |            |            |               |              |             |
|-----------|----------|---------|-------|-------|------|------|----|------|-------|------|--------------|---------------|-------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|
|           |          | infi    | nabez | rej   | zand | kool | UV | MBR  | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand  | zand - kool | nabez - UV | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |
| RWZI A    | 13-07-04 | 12      | 0,05  | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZI A    | 26-07-04 | 213     | 0,18  | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 07-07-04 | 33      | 0,31  | <0,05 | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB     | 14-07-04 | 23      | <0,05 | 1,2   | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 20-07-04 | 137     | 0,10  | -     | 0,17 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 28-07-04 | 120     | 0,42  | -     | 0,04 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC     | 15-03-05 | -       | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 20-07-04 | 178     | 0,39  | -     | 0,19 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 27-07-04 | 149     | 0,15  | -     | 0,40 | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 22-03-05 | -       | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID     | 06-04-05 | -       | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 17-06-04 | -       | 0,23  | -     | 0,08 | 0,11 | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 21-06-04 | -       | 0,38  | -     | 0,10 | 0,21 | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE     | 28-06-04 | -       | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 14-07-04 | -       | <0,05 | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 28-07-04 | -       | 0,06  | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIF     | 13-04-05 | -       | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 20-07-04 | 137     | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 28-07-04 | 120     | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIG     | 27-07-04 | 290     | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIH     | 02-08-04 | 92      | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIH     | 27-07-04 | -       | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZII     | 07-07-04 | -       | 0,44  | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZII     | 14-07-04 | -       | 0,19  | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZII     | 28-02-05 | -       | -     | -     | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| gemiddeld |          | 125     | 0,21  | 0,63  | 0,2  | 0,16 | -  | 0,12 | 0,45  | 0,39 | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| stoev     |          | 89      | 0,15  | 0,81  | 0,1  | 0,07 | -  | 0,04 | 0,56  | 0,04 | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| min       |          | 12      | <0,05 | <0,05 | 0,04 | 0,11 | -  | 0,06 | <0,05 | 0,36 | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| max       |          | 290     | 0,44  | 1,2   | 0,40 | 0,21 | -  | 0,16 | 0,84  | 0,42 | -            | -             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| n         |          | 10      | 14    | 2     | 6    | 2    | 0  | 4    | 2     | 2    | 2            | 2             | 2           | 2          | 2          | 2             | 2            | 2           |
| n>dl      |          | 10      | 12    | 1     | 6    | 2    | 0  | 4    | 1     | 2    | 2            | 2             | 2           | 2          | 2          | 2             | 2            | 2           |
| n<dl      |          | 0       | 2     | 1     | 0    | 0    | 0  | 0    | 1     | 0    | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0             | 0            | 0           |

NB: infi rwzi C= infi rwzi G  
 Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet; bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen  
 cursief = <LOQ  
 \* = verloren gegaan  
 \*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde  
 n.b. = niet te bepalen

## ER-calux assay (in ng EEQ/l)

| RWZI      | datum    | monster |       |      |      |      |    |      |       |      |            | rendement (%) |           |          |          |             |            |           |
|-----------|----------|---------|-------|------|------|------|----|------|-------|------|------------|---------------|-----------|----------|----------|-------------|------------|-----------|
|           |          | infi    | nabez | rej  | zand | kool | UV | MBR  | naMBR | helo | infi-nabez | nabez-zand    | zand-kool | nabez-UV | infi-MBR | nabez-naMBR | nabez-helo | zand-helo |
| RWZI A    | 13-07-04 | 9,1     | 0,18  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI A    | 26-07-04 | 35,7    | 0,7   | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI B    | 07-07-04 | 18      | 0,83  | 11,1 | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI B    | 14-07-04 | 16,4    | 0,58  | 8,7  | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI C    | 20-07-04 | 49,5    | 5,1   | -    | 2,9  | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI C    | 28-07-04 | 42,0    | 2,3   | -    | 3,4  | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI C    | 15-03-05 | -       | 0,66  | -    | 0,84 | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI D    | 20-07-04 | 43,5    | 1,3   | -    | 0,71 | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI D    | 27-07-04 | 62,5    | 1,8   | -    | 0,57 | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI D    | 22-03-05 | 30,0    | 1,4   | -    | 1,0  | -    | -  | -    | -     | 0,12 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | 88,0      |
| RWZI D    | 06-04-05 | 40,0    | 2,0   | -    | 0,93 | -    | -  | -    | -     | 0,14 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | 84,9      |
| RWZI E    | 17-06-04 | -       | 0,96  | -    | 0,80 | 0,21 | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI E    | 21-06-04 | -       | 1,7   | -    | 1,9  | 0,73 | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI E    | 28-06-04 | -       | 0,85  | -    | 1,4  | 0,37 | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI F    | 14-07-04 | -       | 0,73  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | 0,10 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI F    | 28-07-04 | -       | 0,93  | -    | -    | -    | -  | -    | -     | 0,06 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI F    | 13-04-05 | -       | 0,43  | -    | 0,20 | -    | -  | -    | -     | 0,09 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI G    | 20-07-04 | 49,5    | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | 0,61 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI G    | 28-07-04 | 42,0    | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | 1,6  | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI H    | 27-07-04 | 52,5    | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | 0,16 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI H    | 02-08-04 | 71,0    | -     | -    | -    | -    | -  | -    | -     | 0,09 | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI I    | 07-07-04 | -       | 5,2   | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI I    | 14-07-04 | -       | 3,2   | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| RWZI I    | 28-02-05 | -       | 2,0   | -    | -    | -    | -  | -    | -     | -    | -          | -             | -         | -        | -        | -           | -          | -         |
| gemiddeld |          | 39,2    | 1,6   | 9,9  | 1,3  | 0,44 | -  | 0,61 | 0,08  | 6,9  | 95,7       | 14,4          | 69,5      | -        | 98,6     | 86,3        | -187,0     | 86,5      |
| stdev     |          | 18,7    | 1,4   | 1,7  | 1,0  | 0,27 | -  | 0,69 | 0,02  | 9,5  | 2,4        | 45,3          | 7,1       | -        | 1,7      | 7,2         | 143,6      | 2,2       |
| min       |          | 9,1     | 0,18  | 8,7  | 0,20 | 0,21 | -  | 0,09 | 0,06  | 0,12 | 88,7       | -64,7         | 61,3      | -        | 96,2     | 79,1        | -336,5     | 84,9      |
| max       |          | 71,0    | 5,2   | 11,1 | 3,4  | 0,73 | -  | 1,6  | 0,10  | 22,7 | 98,0       | 68,3          | 73,7      | -        | 99,9     | 93,5        | -50,0      | 88,0      |
| n         |          | 12      | 20    | 2    | 11   | 3    | 0  | 4    | 3     | 5    | 10         | 11            | 3         | 0        | 4        | 3           | 3          | 2         |
| n>dl      |          | 12      | 20    | 2    | 11   | 3    | 0  | 4    | 3     | 5    |            |               |           |          |          |             |            |           |
| n<dl      |          | 0       | 0     | 0    | 0    | 0    | 0  | 0    | 0     | 0    |            |               |           |          |          |             |            |           |

NB: infi rwzi C= infi rwzi G

Gemiddelde gehalten zijn berekend met de detectielimiet, bij de berekeningen van de zuiveringsrendementen zijn '>' waarden niet meegenomen

cursef = <LOQ

\* = verloren gegaan

\*\* = niet meegenomen in berekening gemiddelde

n.b. = niet te bepalen





**BIJLAGE 7**

# RESULTATEN PATHOGENEN

## E coli

| RWZI  | datum     | monster (log) |       |     |            |      |      |     |       |      |              | Log-verwijdering |             |            |            |               |              |             |
|-------|-----------|---------------|-------|-----|------------|------|------|-----|-------|------|--------------|------------------|-------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|
|       |           | infi          | nabez | rej | zand (N/F) | kool | UV   | MBR | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand     | zand - kool | nabez - UV | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |
| RWZIA | 12-7-2004 | >5,30         | 3,38  | -   | -          | -    | 2,08 | -   | -     | -    | 1,3          | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIA | 27-7-2004 | >7            | 2,79  | -   | -          | -    | 2,51 | -   | -     | -    | 0,3          | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB | 07-07-04  | >2,70         | >2,70 | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIB | 14-07-04  | >6            | 3,70  | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC | 20-07-04  | 4,70          | 3,00  | -   | >4         | -    | -    | -   | -     | -    | n.b.         | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC | 28-07-04  | 6,08          | 4,15  | -   | 3,89       | -    | -    | -   | -     | -    | 0,25         | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIC | 15-03-05  | -             | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID | 20-07-04  | >4,18         | >4,18 | -   | 4,36       | -    | -    | -   | -     | -    | n.b.         | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID | 27-07-04  | >6,90         | 2,48  | -   | 4,62       | -    | -    | -   | -     | -    | n.b.         | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZID | 22-03-05  | 5,38          | 3,99  | -   | 3,15       | -    | -    | -   | -     | 1,23 | 0,84         | -                | -           | -          | -          | 2,8           | 1,92         | -           |
| RWZID | 06-04-05  | 6,65          | 4,79  | -   | 3,92       | -    | -    | -   | -     | 1,85 | 0,87         | -                | -           | -          | -          | 2,9           | 2,07         | -           |
| RWZIE | 17-06-04  | -             | >3,18 | -   | >3,11      | -    | 2,76 | -   | -     | -    | n.b.         | >0,35            | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE | 21-06-04  | -             | >2    | -   | >2         | -    | >2   | -   | -     | -    | n.b.         | n.b.             | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIE | 28-06-04  | -             | >2    | -   | >2         | -    | 1,70 | -   | -     | -    | n.b.         | >0,30            | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIF | 14-07-04  | -             | 3,72  | -   | -          | -    | -    | -   | 0,00  | -    | -            | -                | -           | -          | 3,7        | -             | -            | -           |
| RWZIF | 28-07-04  | -             | 3,85  | -   | -          | -    | -    | -   | 2,00  | -    | -            | -                | -           | -          | 1,8        | -             | -            | -           |
| RWZIF | 13-04-05  | -             | 4,04  | -   | -          | -    | -    | -   | 1,00  | -    | -            | -                | -           | -          | 3,0        | -             | -            | -           |
| RWZIG | 20-07-04  | 4,70          | -     | -   | -          | -    | -    | -   | 0,90  | -    | -            | -                | -           | -          | 3,8        | -             | -            | -           |
| RWZIG | 28-07-04  | 6,08          | -     | -   | -          | -    | -    | -   | 0,00  | -    | -            | -                | -           | -          | 6,1        | -             | -            | -           |
| RWZIG | 15-03-05  | -             | 4,00  | -   | 3,64/4,20  | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZIH | 27-07-04  | >6,38         | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | n.b.       | -             | -            | -           |
| RWZIH | 02-08-04  | >7,08         | -     | -   | -          | -    | -    | -   | 1,00  | -    | -            | -                | -           | -          | >6,08      | -             | -            | -           |
| RWZII | 07-07-04  | -             | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZII | 14-07-04  | -             | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           |
| RWZII | 1-3-2005  | -             | 1,81  | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | 0,3          | -           |

nb. = niet te bepalen



## F-specifieke RNA-fagen

| RWZI   | datum     | monster (log) |       |     |            |      |      |     |       |      |              | Log-verwijdering |             |            |            |               |              |             |       |
|--------|-----------|---------------|-------|-----|------------|------|------|-----|-------|------|--------------|------------------|-------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|-------|
|        |           | infi          | nabez | rej | zand (N/P) | kool | UV   | MBR | naMBR | helo | infi - nabez | nabez - zand     | zand - kool | nabez - UV | infi - MBR | nabez - naMBR | nabez - helo | zand - helo |       |
| RWZI A | 12-7-2004 | 5,18          | 2,48  | -   | -          | -    | 1,78 | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 2,7        | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI A | 27-7-2004 | 6,49          | 1,00  | -   | -          | -    | 2,36 | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 5,5        | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI B | 07-07-04  | 6,20          | 3,60  | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 2,6        | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI B | 14-07-04  | 6,49          | 2,62  | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 3,9        | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI C | 20-07-04  | 6,46          | 3,80  | -   | 3,59       | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 2,7        | 0,2        | -             | -            | -           | -     |
| RWZI C | 28-07-04  | 6,30          | 3,20  | -   | 2,80       | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 3,1        | 0,4        | -             | -            | -           | -     |
| RWZI C | 15-03-05  | -             | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI D | 20-07-04  | 6,45          | 3,23  | -   | 2,67       | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 3,2        | 0,6        | -             | -            | -           | -     |
| RWZI D | 27-07-04  | 6,42          | 3,58  | -   | 2,43       | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | 2,8        | 1,1        | -             | -            | -           | -     |
| RWZI D | 22-03-05  | 2,18          | 3,97  | -   | 3,97       | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -1,8       | 0,0        | -             | -            | -           | 0,03  |
| RWZI D | 06-04-05  | 2,53          | 3,67  | -   | 2,84       | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -1,1       | 0,8        | -             | -            | -           | >1,84 |
| RWZI E | 17-06-04  | -             | 4,38  | -   | 2,80       | 2,81 | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | 1,6        | 0,00          | -            | -           | -     |
| RWZI E | 21-06-04  | -             | 4,63  | -   | 2,86       | 2,85 | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | 1,8        | 0,01          | -            | -           | -     |
| RWZI E | 28-06-04  | -             | 4,20  | -   | 2,88       | 2,88 | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | 1,3        | 0,19          | -            | -           | -     |
| RWZI F | 14-07-04  | -             | 2,91  | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI F | 28-07-04  | -             | 2,58  | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI F | 13-04-05  | -             | 1,00  | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI G | 20-07-04  | 6,46          | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | 1,78 | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI G | 15-3-2005 | 6,30          | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | 1,30 | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI G | 28-07-04  | -             | 2,84  | -   | 2,48/1,78  | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | 0,36/1,06  | -             | -            | -           | -     |
| RWZI H | 27-07-04  | 6,44          | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | 1,70 | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI H | 02-08-04  | 6,29          | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | 1,00 | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI I | 07-07-04  | -             | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI I | 14-07-04  | -             | -     | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | -     |
| RWZI I | 1-3-2005  | -             | <1    | -   | -          | -    | -    | -   | -     | -    | -            | -                | -           | -          | -          | -             | -            | -           | n.b.  |

n.b. = niet te bepalen





## BIJLAGE 8

# RESULTATEN REGULIERE BEMONSTERING OP RWZI'S

**RWZI A**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum         |                   | 12-7-2004            | 22-7-2004 | 26-7-2004 |
|---------------|-------------------|----------------------|-----------|-----------|
|               |                   | <b>RWZI-influent</b> |           |           |
| debiet        | m <sup>3</sup> /d | 14.935               | 12.024    | 13.012    |
| slibbelasting | g/kg              | 0,014                | 0,015     | 0,02      |
| CZV           | mg/l              | 409                  | 469       | 548       |
| BZV5          | mg/l              | 120                  | 150       | 200       |
| Nkj-N         | mg/l              | 49                   | 57        | 57        |
| NOx-N         | mg/l              |                      |           |           |
| NH4-N         | mg/l              |                      |           |           |
| Ntot-N        | mg/l              |                      |           |           |
| Ptot-P        | mg/l              | 15                   | 18        | 11        |
| PO4-P         | mg/l              |                      |           |           |
| DS            | mg/l              | 137                  | 305       | 228       |
|               |                   | <b>RWZI-effluent</b> |           |           |
| CZV           | mg/l              | 24                   | 17        | 26        |
| BZV5          | mg/l              | 1,5                  | 1,7       | 0,8       |
| Nkj-N         | mg/l              | 1,3                  | 1,2       | 2,1       |
| NOx-N         | mg/l              | 3,6                  | 2,6       | 4,5       |
| NH4-N         | mg/l              |                      |           |           |
| Ntot-N        | mg/l              | 4,9                  | 3,8       | 6,6       |
| Ptot-P        | mg/l              | 6,1                  | 6,6       | 6,6       |
| PO4-P         | mg/l              | 5,8                  | 6,3       | 6,2       |
| DS            | mg/l              | 2                    | 2         | 6         |

**RWZI B**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum         |                   | 7-7-2004             | 14-7-2004 |
|---------------|-------------------|----------------------|-----------|
|               |                   | <b>RWZI-influent</b> |           |
| debiet        | m <sup>3</sup> /d |                      |           |
| slibbelasting | g/kg              |                      |           |
| CZV           | mg/l              | 495                  | 410       |
| BZV5          | mg/l              | 170                  | 150       |
| Nkj-N         | mg/l              | 160                  | 36        |
| NOx-N         | mg/l              | 29                   | 0,2       |
| NH4-N         | mg/l              | 44                   | 24        |
| Ntot-N        | mg/l              |                      |           |
| Ptot-P        | mg/l              | 8,6                  | 6,7       |
| PO4-P         | mg/l              | 0                    | 4,6       |
| DS            | mg/l              | 140                  | 220       |
|               |                   | <b>RWZI-effluent</b> |           |
| CZV           | mg/l              | 19                   | 28        |
| BZV5          | mg/l              | 1,4                  | 1,6       |
| Nkj-N         | mg/l              | 1,3                  | 1,2       |
| NOx-N         | mg/l              | 4,3                  | 5,4       |
| NH4-N         | mg/l              | 0,1                  | 0,1       |
| Ntot-N        | mg/l              | 5,6                  | 6,6       |
| Ptot-P        | mg/l              | 1,8                  | 0,94      |
| PO4-P         | mg/l              | 1,7                  | 0,93      |
| DS            | mg/l              | 4,2                  | 4,5       |

**RWZI C**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum         |                   | 20-7-2004            | 28-7-2004 |
|---------------|-------------------|----------------------|-----------|
|               |                   | <b>RWZI-influent</b> |           |
| debiet        | m <sup>3</sup> /d |                      |           |
| slibbelasting | g/kg              |                      |           |
| CZV           | mg/l              | 600                  | 810       |
| BZV5          | mg/l              | 190                  | 295       |
| Nkj-N         | mg/l              | 52                   | 88        |
| NOx-N         | mg/l              |                      |           |
| NH4-N         | mg/l              |                      |           |
| Ntot-N        | mg/l              |                      |           |
| Ptot-P        | mg/l              | 7,8                  | 11        |
| PO4-P         | mg/l              |                      |           |
| DS            | mg/l              | 260                  | 320       |
|               |                   | <b>RWZI-effluent</b> |           |
| CZV           | mg/l              | 12                   | 13        |
| BZV5          | mg/l              | 1,2                  | 1,2       |
| Nkj-N         | mg/l              | 2,9                  | 1         |
| NOx-N         | mg/l              | 1,23                 | 0,66      |
| NH4-N         | mg/l              | 0,05                 | 0,031     |
| Ntot-N        | mg/l              | 4,13                 | 1,66      |
| Ptot-P        | mg/l              | 0,34                 | 0,24      |
| PO4-P         | mg/l              |                      |           |
| DS            | mg/l              | 3                    | 3         |

**RWZI D**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum         |                   | 20-7-2004            | 28-7-2004 | 22-3-2005 | 6-4-2005 |
|---------------|-------------------|----------------------|-----------|-----------|----------|
|               |                   | <b>RWZI-influent</b> |           |           |          |
| debiet        | m <sup>3</sup> /d | 8.391                | 7.640     | 6.823     | 7.489    |
| slibbelasting | g/kg              |                      |           |           |          |
| CZV           | mg/l              | 550                  | 480       | 675       | 560      |
| BZV5          | mg/l              |                      |           |           |          |
| Nkj-N         | mg/l              | 55                   | 49        | 64        | 51       |
| NOx-N         | mg/l              |                      |           |           |          |
| NH4-N         | mg/l              |                      |           |           |          |
| Ntot-N        | mg/l              |                      |           |           |          |
| Ptot-P        | mg/l              | 7,2                  | 7         | 11        | 7,4      |
| PO4-P         | mg/l              |                      |           |           |          |
| DS            | mg/l              |                      |           |           |          |
|               |                   | <b>RWZI-effluent</b> |           |           |          |
| CZV           | mg/l              | 43                   | 24        | 34        | 34       |
| BZV5          | mg/l              | 2                    | 1         | 2         | 4        |
| Nkj-N         | mg/l              | 0,6                  | 1,4       | 2         | 2,2      |
| NOx-N         | mg/l              | 0,7                  | 1,1       | 1,8       | 1,6      |
| NH4-N         | mg/l              | 0,1                  | 0,3       | 0,2       | 0,2      |
| Ntot-N        | mg/l              | 1,3                  | 2,5       | 3,8       | 3,8      |
| Ptot-P        | mg/l              | 0,06                 | 0,05      | 1,2       | 0,96     |
| PO4-P         | mg/l              |                      |           |           |          |
| DS            | mg/l              | 4                    | 5         | 5         | 5        |



**RWZI E**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum                    | 17-6-2004 | 28-6-2004 |
|--------------------------|-----------|-----------|
| <b>RWZI-influent</b>     |           |           |
| debiet m <sup>3</sup> /d |           |           |
| slibbelasting g/kg       |           |           |
| CZV mg/l                 |           |           |
| BZV5 mg/l                |           |           |
| Nkj-N mg/l               |           |           |
| NOx-N mg/l               |           |           |
| NH4-N mg/l               |           |           |
| Ntot-N mg/l              |           |           |
| Ptot-P mg/l              |           |           |
| PO4-P mg/l               |           |           |
| DS mg/l                  |           |           |
| <b>RWZI-effluent</b>     |           |           |
| CZV mg/l                 | 34        | 28        |
| BZV5 mg/l                | 2,8       | 3,4       |
| Nkj-N mg/l               | 2,2       | 2,7       |
| NOx-N mg/l               | 17,5      | 2,87      |
| NH4-N mg/l               | 0,13      | 0,8       |
| Ntot-N mg/l              |           |           |
| Ptot-P mg/l              | 1,3       | 0,54      |
| PO4-P mg/l               |           |           |
| DS mg/l                  |           |           |

**RWZI F**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum                    | 14-7-2004 | 28-7-2004 | 13-4-2005 |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>RWZI-influent</b>     |           |           |           |
| debiet m <sup>3</sup> /d |           |           | 27.290    |
| slibbelasting g/kg       |           |           |           |
| CZV mg/l                 |           |           | 562       |
| BZV5 mg/l                |           |           | 260       |
| Nkj-N mg/l               |           |           | 56        |
| NOx-N mg/l               |           |           |           |
| NH4-N mg/l               |           |           | 34        |
| Ntot-N mg/l              |           |           |           |
| Ptot-P mg/l              |           |           | 10        |
| PO4-P mg/l               |           |           |           |
| DS mg/l                  |           |           |           |
| <b>RWZI-effluent</b>     |           |           |           |
| CZV mg/l                 | 32        | 28        | 36        |
| BZV5 mg/l                | < 3       | < 3       |           |
| Nkj-N mg/l               | 1,2       | 0,91      | 3         |
| NOx-N mg/l               | 1         | 0,8       | 2,1       |
| NH4-N mg/l               | < 0,2     | 0,11      | 0,11      |
| Ntot-N mg/l              | 1,8       | 1,3       | 3         |
| Ptot-P mg/l              | 0,19      | 0,92      | 0,64      |
| PO4-P mg/l               |           |           |           |
| DS mg/l                  |           |           | < 5       |

**RWZI H**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum                    | 26-7-2004 | 29-7-2004 | 1-8-2004 | 4-8-2004 |
|--------------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| <b>RWZI-influent</b>     |           |           |          |          |
| debiet m <sup>3</sup> /d |           |           |          |          |
| slibbelasting g/kg       |           |           |          |          |
| CZV mg/l                 |           |           |          |          |
| BZV5 mg/l                |           | 269       |          | 256      |
| Nkj-N mg/l               |           | 58,7      |          | 61       |
| NOx-N mg/l               |           |           |          |          |
| NH4-N mg/l               |           |           |          |          |
| Ntot-N mg/l              |           |           |          |          |
| Ptot-P mg/l              |           |           |          |          |
| PO4-P mg/l               |           | 8,77      |          | 9,47     |
| DS mg/l                  |           | 88,5      |          | 101      |
| <b>RWZI-effluent</b>     |           |           |          |          |
| CZV mg/l                 |           |           |          |          |
| BZV5 mg/l                |           |           |          |          |
| Nkj-N mg/l               |           | 1,13      | 0,9      | 1,17     |
| NOx-N mg/l               | 3,61      | 1,77      | 2,01     | 3,51     |
| NH4-N mg/l               | 0,17      | 0,05      | 0,08     | 0,06     |
| Ntot-N mg/l              |           | 2,9       | 2,9      | 4,7      |
| Ptot-P mg/l              |           |           |          |          |
| PO4-P mg/l               | 0,21      | 0,2       | 0,15     | 0,35     |
| DS mg/l                  |           |           |          |          |

**RWZI I**

zuiveringseigenschappen tijdens bemonsteringsdata

| datum                    | 7-7-2004 | 15-7-2004 |
|--------------------------|----------|-----------|
| <b>RWZI-influent</b>     |          |           |
| debiet m <sup>3</sup> /d | 24.600   | 30.530    |
| slibbelasting g/kg       |          |           |
| CZV mg/l                 |          |           |
| BZV5 mg/l                |          |           |
| Nkj-N mg/l               |          |           |
| NOx-N mg/l               |          |           |
| NH4-N mg/l               |          |           |
| Ntot-N mg/l              |          |           |
| Ptot-P mg/l              |          |           |
| PO4-P mg/l               |          |           |
| DS mg/l                  |          |           |
| <b>RWZI-effluent</b>     |          |           |
| CZV mg/l                 | 44,2     | 44,6      |
| BZV5 mg/l                | 8,5      | 6,8       |
| Nkj-N mg/l               | 3,7      | 4,4       |
| NOx-N mg/l               | 0,43     | 2         |
| NH4-N mg/l               | 2,4      | 2,3       |
| Ntot-N mg/l              | 4,1      | 6,4       |
| Ptot-P mg/l              | 0,84     | 1,2       |
| PO4-P mg/l               | 0,67     | 1,2       |
| DS mg/l                  | < 4      | < 4       |

## BIJLAGE 9

# SAMENVATTING ONDERZOEK WATERSCHAP REEST EN WIEDEN

## OVERGENOMEN UIT H2O



## Verkenkend onderzoek naar verwijdering hormoonverstorende stoffen in rwzi's bij waterschap Reest en Wieden

ANJA DERKSEN, GRONTMIJ AQUAFENIX  
ARJEN VAN DER MARK, WATERSCHAP REEST EN WIEDEN

Hormoonverstorende stoffen kunnen goed verwijderd worden in rioolwaterzuiveringsinstallaties. Dit blijkt uit recent door Waterschap Reest en Wieden en Grontmij Aquafenix uitgevoerd verkennend onderzoek. Het onderzoek betrof drie rwzi's, zowel moderne geocompartimenterende systemen als zuiveringen van het type canvasel. De eerste leverde het beste resultaat op. In het effluent is echter vrijwel altijd nog hormoonverstorende activiteit meetbaar, voornamelijk geassocieerd met het zwevend stof. De restactiviteit is zodanig dat effecten bij waterorganismen niet uit te sluiten zijn. Met name natuurlijke vrouwelijke hormonen en hormonen uit de anticonceptiepil blijken verantwoordelijk.

Hormoonverstorende stoffen staan inmiddels ook vanuit de Europese Kaderrichtlijn Water in de belangstelling. Maar vormen ze nu echt een probleem en zou je er wat aan moeten doen?

Stoffen die verantwoordelijk zijn voor vrouwelijke kenmerken bij mannelijke vissen zijn met name de natuurlijke vrouwelijke hormonen en de synthetische hormonen uit de anticonceptiepil. Ook andere chemische stoffen met een onbedoelde vrouwelijke werking, zoals industriële reinigingsmiddelen en weckmakers uit plastics, kunnen bijdragen. Al deze stoffen komen voornamelijk via de riolering en de rioolwaterzuiveringsinstallaties in het oppervlaktewater terecht.

Om na te gaan of hormoonverstorende stoffen een probleem vormen binnen het beheergebied van Reest en Wieden is een verkennend onderzoek uitgevoerd op drie rwzi's. Gekeken is voor twee rwzi's die lopen op water met een natuurfunctie (Soerwijk en Vollenhove) en de rwzi in Echten, de grootste zuivering in het beheergebied. Op deze rwzi wordt tevens al het zuiveringsstof uit het gebied ontwaterd.

Niet elke stof is even hormoonverstorend. In eerste instantie zijn het influent en effluent

uitsluitend onderzocht op 'vervrouweliijkende activiteit' met behulp van een screeningsassay: de ER-calix assay. Dit wil zeggen dat niet op specifieke stoffen is geanalyseerd, maar dat de vrouwelijke activiteit van alle aanwezige

En scheidingstoilet. Uitve blijkt de belangrijkste bron voor hormoonverstorende activiteit.



### KRW

Enkele hormoonverstorende stoffen (octylfenolen, nonylfenolen, gebromeerde difenylethers en diethylhexylfataat) zijn aangemerkt als prioritaire stoffen. Dit betekent dat in ieder geval een stapsgewijze vermindering moet worden bereikt en dat mogelijk een nullozing moet worden gerealiseerd. Ook zijn Europese geldende normen afgeleid. Andere hormoonstregelaars, waaronder natuurlijke en synthetische hormonen, worden in de KRW (bijlage VIII) als belangrijke verontreinigende stof aangemerkt. Ook voor deze stoffen dient de emissie te worden vermindert. Hiervoor zijn echter geen normen afgeleid.

ge stoffen tezamen is bepaald. De resultaten worden uitgedrukt ten opzichte van de activiteit van het natuurlijke vrouwelijke hormoon 17-beta oestradiol ofwel in oestradiol equivalenten (EEQ).

De resultaten tonen aan dat de vrouwelijke activiteit in het influent van de zuiveringen varieerde van 60 tot 110 ng EEQ/l. De concentraties na zuivering varieerden van 0,01 tot 5,7 ng EEQ/l. Het verwijderingsrendement is dus hoog: van meer dan 95 procent tot zelfs meer dan 99,9 procent.

### Adsorptie of afbraak?

In het actief slib zijn activiteitsniveaus van 1.000 tot 8.000 ng EEQ/kg droge stof aangetroffen. Met een eenvoudige massabalans is bepaald dat de vrouwelijke activiteit voor onge-

voer 99 procent wordt verwijderd door afbraak. Een zeer kleine hoeveelheid (kwantitatief gezien) wordt met het effluent afgevoerd. Uit metingen in gefilterend en ongefilterend effluent blijkt dat het grootste gedeelte van de hormoonverstorende activiteit in het effluent is gebonden aan het zwevend stof. Deze bevinding is relevant voor het gedrag en de risico-inschatting van de stoffen in het oppervlaktewater. De prominente rol van zwevend stof wordt echter door andere onderzoeken zowel onderbouwd als tegengesproken. Meer onderzoek naar het belang van de binding van hormoonverstorende stoffen aan zwevend stof is dan ook gewenst.

### Verschillen tussen rwzi's

De rwzi's in Steenwijk en Vollenhove (beiden BCFS-installaties) blijken beter te presteren in de verwijdering van hormoonverstorende activiteit dan de rwzi in Echten. De carousel in Echten kenmerkt zich door geleidelijke zuurstofgradiënten en een vrij korte sliboef tijd. Een BCFS-installatie is een geomembrane systeem waarin procescondities van zuurstofloos tot zuurstofrijk optreden. De langere verblijftijd van het slib en de sterk verschillende procescondities in een BCFS-installatie lijken de afbraak van hormoonverstorende stoffen ten goede te komen. De interne belasting in Echten door het terugvoeren van het filtraat van de slibontwateringsinstallatie naar de zuivering blijkt verwaarloosbaar.

### Welke stoffen zijn verantwoordelijk?

Chemische analyses in de effluentmonsters van rwzi Echten bevestigen dat de gevonden activiteiten met name veroorzaakt worden door natuurlijk vrouwelijke hormonen. De

gemeten activiteit kan vrijwel geheel verklaard worden op basis van de concentratie 17-beta oestradiol. In mindere mate draagt ook oesteron bij. Ook het synthetische hormoon uit de anti-conceptiepill kan, zelfs bij concentraties onder de detectielimiet, een bijdrage leveren. Andere bronnen zoals industriële lozingen, schoonmaakmiddelen of weekmakers lijken een ondergeschikte rol te spelen.

### Probleem of niet?

In de effluënten is in bijna alle gevallen nog een restactiviteit meetbaar (minder dan 0,05 tot 5,7 ng EEQ<sub>1</sub>). Voor hormoonverstorende stoffen zijn (nog) geen normen beschikbaar om de relevantie van deze restconcentraties te kunnen bepalen. Wel is voor 17-beta oestradiol een 'predicted no effect concentration' afgeleid van 1 ng/l voor *in vivo* biologische effecten bij waterorganismen<sup>4</sup>. De gemeten *in vivo* activiteit in de screeningsassay is moeilijk één op één door te vertalen naar *in vivo* effecten bij waterorganismen. Bij de gemeten restconcentraties kan een vrouwelijkend effect van het effluent echter niet uitgesloten worden. Dit geldt met name voor rwzi's die lozen op kleine wateren.

### Maatregelen op lange en korte termijn

Binnen deze verkenning lijken industriële bronnen geen bijzondere rol te spelen. De effecten worden hoofdzakelijk veroorzaakt door vrouwelijke hormonen in huishoudelijk afvalwater. In eerste instantie lijkt dit niet de meest beïnvloedbare bron. Toch zijn bronmaatregelen mogelijk. Reest en Wieden is in Meppel met een aantal partners een demonstratielocatie met urinescheidings toiletten

gestart. Met een afzonderlijke verwerking van de gescheiden ingezamelde urine kunnen hormoonverstorende stoffen uit in de urine beter worden verwijderd. Urinescheiding biedt tegelijkertijd kansen om de emissie van nutriënten en geneesmiddelen te reduceren. Mementeel wordt bestudeerd hoe urinescheiding op termijn geïmplementeerd zou kunnen worden.

Omdat normen ontbreken is het moeilijk in te schatten of op korte termijn gerichte maatregelen moeten worden genomen. Steeds vaker wordt echter, mede gevraagd door eisen uit de KRW, overwogen zuivering uit te breiden met een extra zuiveringstap.

Voor rwzi Steenwijk, dat loost op het kwetsbare natuurgebied de Weerribben, heeft Reest en Wieden hier niet op gewacht. Binnen geplande investeringen om de emissie van stikstof en fosfaat naar de Weerribben te halveren, is zo veel mogelijk rekening gehouden met extra verwijdering van hormoonverstorende stoffen. De rwzi Steenwijk wordt hiervoor uitgebreid met een tweetraps zandfiltratie. Deze zal naast stikstof en fosfaat ook vergaand zwevend stof verwijderen. Naar verwachting worden hiermee ook hormoonverstorende stoffen verwijderd. Gezien de onzekerheden ten aanzien van toekomstige eisen is de installatie zo flexibel mogelijk gehouden. Tussen de eerste en tweede zandfiltratiestap wordt het effluent belucht, zodat biologische afbraak in de tweede stap mogelijk wordt. De tweede stap is bovendien zodanig uitgevoerd dat ook andere filtermaterialen en doseringen toegepast kunnen worden. ◀

Het onderzoeksrapport<sup>4</sup> is in zijn geheel te lezen op internet ([www.reestnwieden.nl](http://www.reestnwieden.nl)). Reest is een studie naar de effectiviteit van diverse extra zuiveringstappen in de verwijdering van vrouwelijke stoffen afgevoerd<sup>5</sup>. De resultaten verschijnen binnenkort in dit vaktijdschrift, ook in de rubriek Platform.

Zandfilter in aanbouw bij rwzi Steenwijk.



### LITERATUUR

- 1) Lohr J., F. Leffers, J. Derksen en P. Rindveld (2002). Verwijdering van hormoonverstorende stoffen in riolwaterzuiveringsinstallaties. STOWA-rapport 2002-03.
- 2) Derksen J. (2002). *Influent- en effluentonderzoek rwzi's. Deel 8: Hormoonverstorende stoffen. Groenwij Aquatica. Rapport 2366.*
- 3) Derksen J., E. Lensen en J. Rooda (2002). Verkennde monitoring van hormoonverstorende stoffen en pathogenen op rwzi's met aanvullende zuiveringstechnieken. STOWA-rapport 2002-26.