

VERKENNING GENEESMIDDELEN EN TOXICITEIT EFFLUENT RWZI'S



RAPPORT

2008
06

GECOMBINEERD ONDERZOEK, BIOASSAYS EN CHEMIE

stowa

GECOMBINEERD ONDERZOEK, BIOASSAYS EN CHEMIE

VERKENNING GENEESMIDDELEN EN TOXICITEIT EFLUENT RWZI'S

STOWA RAPPORT

2008

06

ISBN 978.90.5773.402.1



stowa@stowa.nl www.stowa.nl
TEL 030 232 11 99 FAX 030 231 79 80
Arthur van Schendelstraat 816
POSTBUS 8090 3503 RB UTRECHT

Publicaties van de STOWA kunt u bestellen bij:
Hageman Fulfilment POSTBUS 1110, 3330 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, 2008

UITGAVE STOWA, Utrecht

AUTEURS

Dr. S.A.E. (Stefan) Kools (eindredactie, Grontmij|AquaSense)

Ing. E.J. (Evert-Jan) van den Brandhof (RIVM)

Drs. M.N. (Margreet) Mons (Kiwa Water Research)

Dr. A.H. (Ariadne) Hogenboom (Kiwa Water Research)

Ir. J.G.M. (Anja) Derksen (Grontmij|AquaSense)

BEGELEIDINGSCOMMISSIE

Bert van Eck (Hoogheemraadschap van Delfland)

Herman van Rooijen (Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden)

Dick de Vente (Waterschap Regge en Dinkel)

Eric Marsman (Waterschap Rivierenland)

Frans de Bles (Waterschap Vallei en Eem)

DRUK Kruyt Grafisch Advies Bureau

STOWA rapportnummer 2008-06
ISBN13 978.90.5773.402.1

TEN GELEIDE

In het voorjaar van 2006 is het netwerk 'monitoring nieuwe stoffen' opgericht voor en door waterschappen in samenwerking met STOWA. Dit netwerk is bedoeld om pro-actief kennis uit te wisselen en onderzoeksactiviteiten af te stemmen. De 'nieuwe' of 'vergeten stoffen' zijn hormoonverstorende stoffen, geneesmiddelen, en andere potentieel schadelijke stoffen die in het oppervlaktewater kunnen voorkomen. Veel van die stoffen zijn (nog) niet in het waterkwaliteitsbeleid meegenomen en er bestaan vaak geen normen voor deze groep stoffen.

In dit rapport wordt een onderzoek gepresenteerd dat geïnitieerd is in het kader van het netwerk 'monitoring nieuwe stoffen' en waaraan naast STOWA, KIWA water research en het RIVM hebben meegewerkt. Daarnaast heeft Grontmij / Aquasense een belangrijke rol in de uitvoering gespeeld.

Doel van het onderzoek was ervaring opdoen met het uitvoeren van verschillende methoden van chemische analyse en effectbeoordeling, het ontwikkelen en valideren van nieuwe methoden en het vergelijken van methoden onderling. Door het onderzoek wordt concreet inzicht verkregen in de aanwezigheid van geneesmiddelen in RWZI effluent, toxiciteit, de effecten van antibiotica en de mate van hormoonverstorende activiteit. Voor het onderzoek zijn een vijftal RWZI's bemonsterd.

De waterbeheerders hebben in deze zoektocht naar continue verbetering van de waterkwaliteit verder gekeken dan de grenzen van de wet en het staande beleid vereist. Met dit rapport willen we de resultaten delen met alle betrokkenen bij het waterbeheer. Veel is nog onduidelijk, misschien zal veel wel onduidelijk blijven. De rapportage van deze zoektocht is echter de moeite van het lezen meer dan waard.

Utrecht, juni 2008

De directeur van de STOWA,
Ir. J.M.J. Leenen

SAMENVATTING

In dit rapport wordt een onderzoek beschreven dat geïnitieerd is in het kader van het netwerk 'monitoring nieuwe stoffen' en waaraan verschillende partijen hebben samengewerkt. In het onderzoek zijn verschillende analyses uitgevoerd op monsters van RWZI effluent, zowel chemisch- analytische als biologische bepalingen.

Doel van het onderzoek was ervaring opdoen met het uitvoeren van dergelijk gecombineerd onderzoek, het ontwikkelen en valideren van nieuwe methoden en het vergelijken van methoden onderling. Door het onderzoek wordt concreet inzicht verkregen in de aanwezigheid van geneesmiddelen in RWZI effluent, toxiciteit, de effecten van antibiotica en de mate van hormoonverstorende activiteit. Voor het onderzoek zijn een vijftal RWZI's bemonsterd. De monsters zijn verdeeld over vier onderzoekslaboratoria voor extracties en analyses.

Kiwa Water Research heeft de analyse uitgevoerd van 40 geneesmiddelen en zo hun methode verder gevalideerd. Deze analyse toonde 26 middelen in het effluent en extracties aan, waarvan 14 boven de kwantificeringsgrens. De concentraties lagen in de range van 0,1 tot 2,7 µg/L. De hoogste concentraties betroffen de bètablokkers metoprolol en sotalol. In de extracten die zijn gebruikt voor biologische effectmetingen door de andere laboratoria zijn de middelen aangetroffen in vergelijkbare concentraties.

Grontmij|AquaSense en het RIVM hebben diverse bioassays uitgevoerd die effecten bepalen van effluent op bacteriën, algen en watervlo. De resultaten hiervan lieten zien dat effluent van drie RWZI's voldoet aan de maatlat die momenteel wordt gesteld aan dergelijke metingen met bioassays. Het effluent van twee andere RWZI's verdient aandacht, omdat hier ernstige effecten zijn aangetoond.

Bij BioDetectionSystems (BDS) is de oestrogene activiteit (hormoonverstoring) van het effluent door middel van de ER-calux assay bepaald. Op drie locaties is aanzienlijke activiteit gemeten. Voordat een conclusie kan worden getrokken over de mogelijke effecten op het ecosysteem (bijvoorbeeld vissen), zal echter meer bekend moeten zijn over de verdunningsgraad in het oppervlaktewater en de lokale omstandigheden.

Bij het RIVM is de activiteit van antibiotica in het effluent bepaald door middel van een antibioticascreeeningsassay. Deze analyse liet zien dat bij drie RWZI's de activiteit hoog is. Deze lijkt vooral te worden veroorzaakt door antibiotica uit de groep van sulfonamiden en de groep macrolide/β-lactam. De activiteit van de groepen quinolonen, tetracyclines en aminoglycosiden is lager.

Het onderzoek toonde aan dat effluent van RWZI's verschillende geneesmiddelen bevat. Op alle locaties zijn daarnaast effecten van antibiotica aangetoond. Met de bioassays zijn matige tot ernstige toxische effecten aangetoond. Daarnaast is op twee locaties verhoogde oestrogene activiteit aangetroffen. Het is mogelijk geweest om tegelijkertijd verschillende bepalingen (chemische analyses en effecttesten) in dezelfde watermonsters uit te voeren. Dit rapport laat zien dat onderzoek aan identieke watermonsters succesvol is door goede samenwerking van betrokken partijen, Kiwa Water Research, RIVM, Grontmij|AquaSense, de betrokken waterschappen en STOWA. De nieuwe methoden zijn verder gevalideerd en ontwikkeld.

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.

Website: www.stowa.nl

VERKENNING GENEESMIDDELEN EN TOXICITEIT EFLUENT RWZI'S

INHOUD

	TEN GELEIDE	
	SAMENVATTING	
	STOWA IN HET KORT	
1	INLEIDING	1
	1.1 Netwerk 'monitoring nieuwe stoffen'	1
	1.2 Nieuwe stoffen, nieuwe meetmethoden	1
	1.3 Onderzoeksdoelen	1
	1.4 Leeswijzer	2
2	ONDERZOEKSOPZET	3
	2.1 Selectie van RWZI's	3
	2.2 Monstername	3
	2.3 Logistiek	3
	2.4 Analyses	3
3	METHODE: CHEMISCHE ANALYSES	5
	3.1 Reguliere parameters	5
	3.2 Geneesmiddelen	5
	3.2.1 Analysemethode van geneesmiddelen in RWZI-effluent	5
	3.2.2 Analysemethode van geneesmiddelen in extract	5

4	METHODE: BIOASSAYS	7
4.1	Extractie en concentreren voor bioassays	7
4.2	Microtox	8
4.3	Algen-groeiremming test	8
4.4	PAM-algentest	9
4.5	Daphnia test	9
4.6	Antibiotica screening	9
4.7	Oestrogene activiteit (ER-CALUX)	9
5	RESULTATEN EN DISCUSSIE	11
5.1	Chemische analyse van reguliere parameters	11
5.2	Chemische analyse van geneesmiddelen	11
5.3	Bioassays	13
5.4	Antibiotica screening	15
5.5	Oestrogene activiteit (ER-CALUX)	17
6	CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	19
6.1	Chemische analyse van geneesmiddelen	19
6.2	Effluent –Beoordeling bioassays	19
6.3	Antibiotica screening	20
6.4	Oestrogene activiteit (ER-CALUX)	20
7	REFERENTIES	21
8	BIJLAGEN	23

1

INLEIDING

1.1 NETWERK 'MONITORING NIEUWE STOFFEN'

In het voorjaar van 2006 is het netwerk 'monitoring nieuwe stoffen' opgericht voor en door waterschappen in samenwerking met STOWA. Dit netwerk is bedoeld om proactief kennis uit te wisselen en onderzoeksactiviteiten af te stemmen. De 'nieuwe' of 'vergeten stoffen' zijn hormoonverstorende stoffen, geneesmiddelen, en andere potentieel schadelijke stoffen die in het oppervlaktewater kunnen voorkomen. Veel van die stoffen zijn (nog) niet in het waterkwaliteitsbeleid meegenomen en bestaan vaak geen normen voor deze groep stoffen. Deze groep stoffen zijn dus niet de prioritairere stoffen uit de KRW, want daarvoor zijn wel (wettelijke) normen afgeleid.

1.2 NIEUWE STOFFEN, NIEUWE MEETMETHODEN

Naast de aandacht voor de milieugevaarlijke en prioritairere stoffen is er ook al enige tijd veel aandacht voor stoffen die het hormoonsysteem kunnen verstoren. Zo is bekend dat natuurlijke hormonen, bestanddelen van de anticonceptiepil en bepaalde chemicaliën het hormoonsysteem van mannelijke vissen dusdanig kunnen verstoren, dat deze vrouwelijke kenmerken gaan vertonen (Vethaak et al., 2002; STOWA, 2005). Deze effecten treden reeds bij zeer lage concentraties op.

De laatste jaren is ook meer interesse in het voorkomen van geneesmiddelen in water ontstaan (zie bijvoorbeeld Schrap et al., 2003). De zorg komt vooral voort uit het feit dat geneesmiddelen speciaal zijn gemaakt om biologische effecten te veroorzaken en dus ook op zeer lage concentraties effecten kunnen veroorzaken. Daarnaast groeit het gebruik van geneesmiddelen elk jaar, vooral door de vergrijzing.

Geneesmiddelen en hormonen komen voor een groot deel via huishoudens in het water van de rioolwaterzuiveringinstallaties (RWZI's) en bereiken uiteindelijk het oppervlaktewater. Omdat de kwaliteit van water de constante aandacht van waterbeheerders heeft, is vraag ontstaan naar betrouwbare meetmethoden voor dergelijke stoffen.

1.3 ONDERZOEKSDOELEN

Het water van RWZI's (in- en effluent) is complex en wisselend van samenstelling. Dit maakt dat geavanceerde analysemethoden nodig zijn om hormonen en geneesmiddelen te kunnen aantonen. Bovendien zijn deze groep stoffen al bij zeer lage concentraties werkzaam dus moeten in zeer lage concentraties kunnen worden aangetoond.

Bij Kiwa Water Research is om die reden in 2007 een analysemethode voor geneesmiddelen in RWZI-effluent opgezet. Om deze methode te valideren werd binnen het netwerk "nieuwe stoffen" het verzoek gedaan om een aantal monsters van RWZI effluents aan te leveren. Tegelijkertijd liep er onderzoek bij het RIVM naar de antibioticascreeingsassay, een effecttest voor screening van watermonsters op antibioticaresten. Voor de uitvoering van deze test dienden de antibioticagehalten ook chemisch te worden bepaald. Vandaar dat deze initiatieven aan elkaar gekoppeld zijn. Daarnaast werkt het RIVM in samenwerking met

RWS-RIZA (nu: Waterdienst) aan de 'Totaal Effluent Beoordeling' van RWZI-effluent. Deze methode is gebaseerd op een aantal 'standaard' toxiciteitstesten (bioassays), uitgevoerd door Grontmij|AquaSense. De ER-CALUX assay is hiervan ook een onderdeel, een test die in staat is om hormoonverstorende effecten aan te tonen, uitgevoerd door BioDetectionSystems; BDS.

Samengevat had het onderzoek de volgende doelen:

- recent ontwikkelde methodes testen zodat deze verder uitgewerkt kunnen worden.
- verschillende analysemethoden onderling vergelijken
- inzicht krijgen in de chemische samenstelling van effluenten uit RWZI's

De meerwaarde in dit project lag vooral in de meting van stoffen in het opgewerkte concentraat zodat informatie kon worden verkregen over de recovery van stoffen na opwerking. De meerwaarde voor de waterbeheerders is dat naast gegevens over concentraties van stoffen met behulp van bioassays informatie kan worden verkregen over het gezamenlijke effect van stoffen in een monster.

1.4 LEESWIJZER

Dit rapport beschrijft de resultaten van de diverse onderzoeken. In het volgende hoofdstuk zijn de logistiek, monsternamen en analyses beschreven. Omdat er een aantal nieuwe technieken gebruikt zijn, zijn er twee aparte hoofdstukken met methodebeschrijvingen opgenomen; hoofdstuk drie voor de chemie en hoofdstuk vier de methoden voor de bioassays. Vervolgens zijn de resultaten per onderdeel besproken en wordt duidelijk wat de resultaten betekenen in het licht van eerder onderzoek. Tot slot zijn de belangrijkste conclusies uitgelicht en aangevuld met aanbevelingen.

2

ONDERZOEKSOPZET

2.1 SELECTIE VAN RWZI'S

Voor het onderzoek zijn verschillende RWZI's geselecteerd op basis van vrijwillige aanmelding door Waterschappen, gecoördineerd vanuit STOWA. De kenmerken van de RWZI's staan in detail uitgewerkt in bijlage 1. De RWZI's verschillen op bepaalde kenmerken, zoals de technische aspecten (ontwerp-grootte, de sibleeftijd en de mate van slibbelasting, etc.).

2.2 MONSTERNAME

De monstername op de RWZI's vond plaats door de betrokken waterschappen. De monstername is gestart op 18 juni 2007 en beëindigd op 19 juni, zodat de monsters op de ochtend van 19 juni 2007 zijn aangeleverd. De monsters zijn 24 uur debiet proportionele monsters van gezuiverd afvalwater tijdens droogweerafvoer (DWA) met deels RWA omstandigheden (zie het debiet van de monsterdag in bijlage 1).

2.3 LOGISTIEK

Het afvalwatermonster is verdeeld over de betrokken partijen;

- 2 liter voor Kiwa Water Research in een standaard donkere glazen literfles (geneesmiddelenbepaling)
- 1 liter voor BDS in een standaard donkere glazen literfles (ER-CALUX)
- 25 liter voor RIVM in een roestvrijstalen vat, aangeleverd door RIVM (extracties)
- De extracties van het RIVM zijn vervolgens verzonden naar KIWA Water Research, Grontmij|AquaSense en een deel van de extracties is op het RIVM zelf gebruikt (Tabel 1).

2.4 ANALYSES

Voor het onderzoek zijn de volgende metingen uitgevoerd aan het effluent van de vijf RWZI's (afloop nabezinktank);

Chemie

- Reguliere bepaling

Nieuwe analysemethode geneesmiddelen:

- In effluent
- In het extract voor de bioassays

Bioassays

Standaard effectmetingen (Totaal Effluent Beoordeling)

- Test op remming bacteriegroei (Microtox)
- Algengroei-remming test
- Acute toxiciteit watervlooien (*Daphnia magna*)

- ER-CALUX (hormoonverstoring)¹

Nieuwe methoden:

- Antibiotica screeningsassay
- PAM-algentest (fotosynthese)

¹ De ER-Calux assay kent een andere extractiemethode (bijlage 2); hierin zijn geen geneesmiddelen gemeten.

3

METHODE: CHEMISCHE ANALYSES

3.1 REGULIERE PARAMETERS

Om het normaal functioneren van de installatie te monitoren zijn bij elke monsternamen ook een aantal algemene parameters bepaald, zoals weergegeven in bijlage 1. Dit zijn de standaardmetingen aan opgeloste bestanddelen, stikstof, fosfaat en het chemische en biologische zuurstofgebruik.

3.2 GENEESMIDDELEN

Er is een analyse op 40 geneesmiddelen uitgevoerd in zowel de 'ruwe' monsters van de RWZI-effluenten, als in de door het RIVM bereide extracten ten behoeve van de bioassays (details hieronder). De analyses van het extract dienen ter verklaring van de effecten in vooral de antibiotica screeningsassay. Een vergelijking met de 'ruwe' monsters kan een indicatie geven van de extractie-efficiëntie.

3.2.1 ANALYSEMETHODE VAN GENEESMIDDELEN IN RWZI-EFFLUENT

De monstervoorbewerking voor de geneesmiddelenanalyse is uitgevoerd met behulp van offline vaste-fase extractie (SPE) uit 1 liter watermonster dat voorafgaand aan de bewerking aangezuurd wordt (ca. pH 2,3). De uiteindelijke concentratiefactor is 1000 maal. Ter controle zijn interne standaarden toegevoegd aan het effluent voor de controle van de voorbewerkingprocedure van het monster. Het (watermonster)extract is vervolgens gemeten met behulp van vloeistofchromatografie ultraviolet massaspectrometrie (LC-UV-LTQ Orbitrap MS). De stoffen zijn gemeten met behulp van twee detectiemethoden: LC-UV-LTQ Orbitrap MS met full-scan accurate massametingen van (1) positieve en (2) negatieve ionen. Interne standaarden voor zowel positieve als negatieve ionen meting worden toegevoegd aan het extract ter controle van het juiste verloop van de MS analyse.

De concentraties van de aangetoonde geneesmiddelen in de monsters zijn berekend op basis van standaardadditie methode, dat wil zeggen: additie van een mengsel van geneesmiddelen aan RWZI effluent Nieuwegein (vóór de voorbewerking) in concentraties van 1,0 en 5,0 µg/l. De concentraties zijn teruggerekend naar de oorspronkelijke concentratie in het effluent.

Indien een geneesmiddel een totale recovery van >75% heeft dan geldt dat dit geneesmiddel kwantitatief bepaald kan worden. Voor recoveries <75% geldt dat het geneesmiddel alleen kwalitatief bepaald wordt. De bepalingsgrenzen van de geneesmiddelen hangt sterk af van het geneesmiddel en het type afvalwater. Grofweg is het meetbereik waarbinnen het geneesmiddel goed gekwantificeerd kan worden ca. 0,1-10 µg/l.

3.2.2 ANALYSEMETHODE VAN GENEESMIDDELEN IN EXTRACT

Door het RIVM zijn 10-ml extracten (in water) aangeleverd die elke 333 keer geconcentreerd zijn (zie paragraaf 4.1.1). Deze extracten zijn zonder voorbehandeling rechtstreeks geanalyseerd m.b.v. LC-UV-LTQ Orbitrap MS in zowel positieve als negatieve ionen mode.

Er is rechtstreeks in het extract gemeten. Er zijn geen interne standaarden toegevoegd (ter bepaling van de extractie-efficiëntie) of standaardadditie experimenten (ter kwantificering) uitgevoerd. De concentraties geneesmiddelen kunnen daardoor alleen worden gerelateerd aan de eerder uitgevoerde standaardadditie experimenten van het watermonster (zoals onder 3.3 beschreven). De concentraties zijn teruggerekend naar de oorspronkelijke concentratie in het effluent.

4

METHODE: BIOASSAYS

Hieronder worden de verschillende methoden kort besproken, meer details worden in bijlage 2 beschreven. In de bijlage is ook beschreven welke fysisch-chemische parameters bepaald zijn. Voor deze parameters gelden voor elke test randvoorwaarden waar aan voldaan dient te worden.

4.1 EXTRACTIE EN CONCENTREREN VOOR BIOASSAYS

Effluënten kunnen door hun specifieke samenstelling in sommige gevallen toxiciteit veroorzaken die niet worden veroorzaakt door de stoffen die relevant zijn, zoals prioritair stoffen, geneesmiddelen of andere relevante chemicaliën. Van de watermonsters zijn om die reden, met uitzondering van de ER-CALUX, extracties gemaakt die alleen organische stoffen meenemen, zodat factoren als ammonium, nitriet, specifieke zoutbalans e.d. geen invloed hebben bij de toxiciteitsmeting in de bioassays. Het nadeel is echter dat de gemeten toxiciteit een onderschatting kan zijn, omdat het effluent niet als volledig (totaal) gemeten wordt. Hier wordt bij de beoordeling rekening gehouden (zie 4.3). De procedure heeft wel het voordeel dat ook combinatie effecten (meervoudige blootstelling) van stoffen wordt meegenomen.

De watermonsters zijn direct na de monsternamen en transport in behandeling genomen door het RIVM. Het water werd hier geconcentreerd met de XAD4/8 (methode SOP LER/303/04). Van de watermonsters is 2 x 10 liter afvalwater met het aanwezige zwevende materiaal gedurende minimaal 48 uur gerold op een rollerbank met een hars (XAD 4 en 8) waaraan de aanwezige organische microverontreinigingen binden (SOP LER/303). Na extractie werd de XAD verzameld, 24 uur gedroogd en geëluëerd met aceton. Het eluaat in aceton werd ingevroren tot de KD (Kuderna-Danish) destillatie naar Dutch Standard Water (DSW) en is uitgevoerd aan de hand van SOP LER 310/02.

- De monsters zijn 333x geconcentreerd.
- Omdat van de RWZI Ootmarsum 14L i.p.v. 25L is aangeleverd is deze 233x geconcentreerd.

TABEL 1

VERDELING EXTRACTEN VOOR DE BIOASSAYS EN CHEMISCHE ANALYSE

Aantal ml	Bioassay	Uitvoerende
2.5	Microtox	Grontmij AquaSense
20	<i>Daphnia</i> acuut	Grontmij AquaSense
10	Algen groeiremming	Grontmij AquaSense
5	PAM test	RIVM
3	antibiotica screeningsassay	RIVM
10	analyse geneesmiddelen	Kiwa Water Research
50.5 ml	TOTAAL	

De extracten van het afvalwater in water zijn verdeeld over de verschillende partijen (tabel 1) en binnen 24 uur na bereiding getest met verschillende bioassays. De verschillende bioassays zijn uitgevoerd volgens de gestandaardiseerde methoden (tabel 2). In tabel 3 staat een overzicht van de gebruikte concentratiereeksen. De verschillende bioassay methoden zijn op dezelfde monsters toegepast, zodat de uitkomsten direct vergeleken kunnen worden. Met de resultaten kunnen uitspraken gedaan worden over het effluent van de verschillende typen RWZI's.

Van de RWZI Amersfoort en Nijmegen is 3 x 1 liter (niet gefiltreerd) ingevroren bij -20°C. Dit kan eventueel in een later stadium gebruikt worden voor nader fractioneringonderzoek van antibiotica en effect metingen in de antibioticascreeningsassay.

TABEL 2 SAMENVATTING VAN DE UITGEVOERDE BIOASSAYS

Bioassay	Extractie	Bepaling	Testorganisme	Blootstellingduur	Effect	Methode
Microtox	RIVM	Grontmij AquaSense	Bacterie	30 min	Remming van luminescentie	ISO 11348-3 (1998)
Alg plaatstest	RIVM	Grontmij AquaSense	Alg	72 uur	Remming van de groei	ISO 8692 (1989)
Daphnia magna	RIVM	Grontmij AquaSense	Watervlo	48 uur	Immobiliteit	ISO 6341 (1996)
PAM-algentest	RIVM	RIVM	Alg	4,5 uur	Fotosyntheseproces	Van Beusekom 1999
Antibiotica screening	RIVM	RIVM	Bacterie	20 uur	Remming van de bacteriegroei	Rikilt Waterscan
ER-CALUX	BDS	BDS	Humane cellijn		Hormoonverstoring	

4.2 MICROTOX

De bacterie *Vibrio fischeri* zendt onder normale omstandigheden licht uit. Dit verschijnsel heet bioluminescentie. In de test wordt met een lichtmeter (Microtox®) de afname van de bioluminescentie bij de bacterie beoordeeld na 5, 15 en 30 minuten blootstelling aan een viertal concentraties testmedium. Door blootstelling aan toxische stoffen en/of extracten wordt de uitzending van licht geremd en dat kan gemeten worden. De mate van toxiciteit wordt weergegeven aan de hand van de EC₅₀-waarde (Effect Concentratiefactor). Deze is gedefinieerd als het aantal maal dat het monster geconcentreerd is, waarbij na een gegeven blootstellingduur een afname van 50% van de bioluminescentie ten opzichte van verdunningsmedium (blanco) kan worden waargenomen. Hoe lager de EC₅₀-waarde, hoe toxischer het monster is.

4.3 ALGENGROEIEMMING TEST

Algen (*Pseudokirchneriella subcapitata*) groeien onder normale omstandigheden in een snel tempo. Echter, bij toxiciteit van waterextracten vindt remming van de groeisnelheid plaats. De groeisnelheid van de alg is bepaald na 72 uur blootstelling aan vijf concentraties (tabel 3). Uit de resultaten is een EC₅₀-waarde (Effect Concentratiefactor) geschat. Dit getal geeft aan hoeveel maal het originele monster geconcentreerd moet worden om, na 3 dagen blootstelling, 50% remming op de groeisnelheid van de algen te veroorzaken. Daarnaast is de NOEC (No Observed Effect Concentration) bepaald.

4.4 PAM-ALGENTEST

Bij het RIVM werd de PAM test (van Beusekom, 1999) gebruikt om een effectmeting te verrichten met behulp van de groenalg *Pseudokirchneriella subcapitata*. De oplossingen uit de concentratiereeks worden verdund met de algensuspensie en met DSW (Dutch Standard Water). De alg is 4,5 uur blootgesteld aan verschillende concentratie onder een constante hoeveelheid licht (tabel 3). Hierna is de fotosynthese-efficiëntie (uitgedrukt in yield %) bepaald met behulp van een PAM fluorometer gekoppeld aan een autosampler en een computer. Hiermee zijn een ECf50-waarde en NOEC geschat. De test is uitgevoerd op 10 juli 2007.

4.5 DAPHNIA TEST

Als watervlooien (*Daphnia magna*) worden blootgesteld aan bepaalde stoffen, dan stoppen ze met zwemmen en worden ze *immobiel* genoemd. Naarmate de stoffen en/of het extract giftiger zijn, zullen meer watervlooien immobiel zijn of sterven. Uit de tellingen van de dode en mobiele watervlooien aan vijf concentraties is een ECf50-waarde en NOEC geschat.

4.6 ANTIBIOTICA SCREENING

De antibioticascreefingstest is een test voor de detectie van antibiotica residuen in water. Deze microbiologische test is afgeleid van een test van melk en vleesnat als check op antibiotica-residuen. De test is door RIZA (thans:Waterdienst) en RIVM aangepast zodat ook watermonsters kunnen worden geanalyseerd.

De test bestaat uit 5 agarplaten die elk specifiek zijn voor één/ of twee stofgroepen (tetracyclines, macroliden/penicilline, quinolonen, aminoglycosiden en sulfonamiden). De platen zijn begroeid met een bacterie die gevoelig is voor de betreffende groep van antibiotica. In de plaat zijn negen gaatjes ('wells') aangebracht, waarin de te testen oplossing is gepipetteerd. De antibiotica verspreiden zich in de agar en veroorzaken op die manier een groeiremmingszone rondom de well. Deze remming is zichtbaar als een lichte ring. De testplaat met de grootste remming geeft de stofgroepsidentiteit aan.

De groeiremming wordt bepaald door de diameter van de groeiremmingszone op te meten (na 20 uur incubatie bij 37°C (aminoglycosiden en sulfonamiden plaat) of 30°C (andere platen). De NOEC (No Observed Effect Concentration) wordt vastgesteld als de concentratiefactor van het monster waarbij geen groeiremming optreedt (zie tabel 3 voor concentratiereeks).

Om de gevoeligheid van de testplaten te controleren worden positieve controles meegenomen. Deze verschillen voor de vijf verschillende bacterieplaten:

Tetracycline groepstest	: 100 µg/L Oxytetracycline
Quinolonen groepstest	: 200 µg/L Flumequine
Macroliden/β-lactam groepstest	: 100 µg/L Erythromycine of 15 µg/L Penicilline G
Sulfonamiden groepstest	: 100 µg/L Sulfamethoxazole
Aminoglycosiden groepstest	: 100 µg/L Neomycin

4.7 OESTROGENE ACTIVITEIT (ER-CALUX)

De mate van hormoonverstoring is bepaald met de ER-CALUX assay, uitgevoerd door Bio-DetectionSystems (BDS). Uit eerdere rapportages (STOWA 2003, 2005 en 2006a;) is bekend dat meting van individuele hormonale stoffen slechts beperkte informatie oplevert. De concentraties in effluent zijn doorgaans namelijk zodanig laag dat voornamelijk concentraties onder de detectielimiet worden gerapporteerd. Echter, de reactiviteit van de stoffen kan nog milieurelevant zijn. Bovendien bestaan er diverse hormoonverstorende stoffen die niet

gemeten worden en toch kunnen bijdragen aan het totaaleffect. Daarom is gekozen om de totale hormoonverstorende activiteit te meten door middel van een screeningsassay. De ER-CALUX screeningsassay meet in een cellijn de reactie op stoffen met een vrouwelijk effect (oestrogeniteit). Een belangrijk aspect is dat de ER-CALUX zeer lage activiteit (ng EEQ/L) kan meten. De test is vaker toegepast op water en zo kunnen de uitkomsten vergeleken worden met eerder onderzoek. Deze assay kent een specifieke extractie (bijlage 2).

TABEL 3 GETESTE CONCENTRATIEREEKSEN IN DE BIOASSAYS

Bioassay	Effluent (Monstercodes 37600, 37601, 37602, 37604)	Effluent Monstercode 37603 ^{a)}
Microtox	166,5 ; 83,3 ; 41,6 en 20,8 x	116,5 ; 58,3 ; 29,1 en 14,6 x
Alg	333 ; 166,5 ; 83,3 ; 41,6 en 20,8 x	233 ; 116,5 ; 58,3 ; 29,1 en 14,6 x
Daphnia	166,5 ; 83,3 ; 41,6 ; 20,8 en 10,4 x	116,5 ; 58,3 ; 29,1 ; 14,6 en 7,3 x
PAM	166,5 ; 50 ; 16,7 ; 5,0 ; 1,7 ; 0,5 en 0,17 x	116,5 ; 34,9 ; 11,7 ; 3,5 ; 1,2 ; 0,35 en 0,12x
Antibiotica	166,5 ; 83,3 ; 41,6 ; 10,4 ; 5,2 en 1 x	116,5 ; 58,3 ; 29,1 ; 7,3 ; 3,6 en 0,7 x
ER-CALUX	N.v.t. (andere methode)	

^{a)} Het volume aangeleverd afvalwater uit Ootmarsum is 14 L in plaats van 25L en daarom afwijkend geconcentreerd.

5

RESULTATEN EN DISCUSSIE

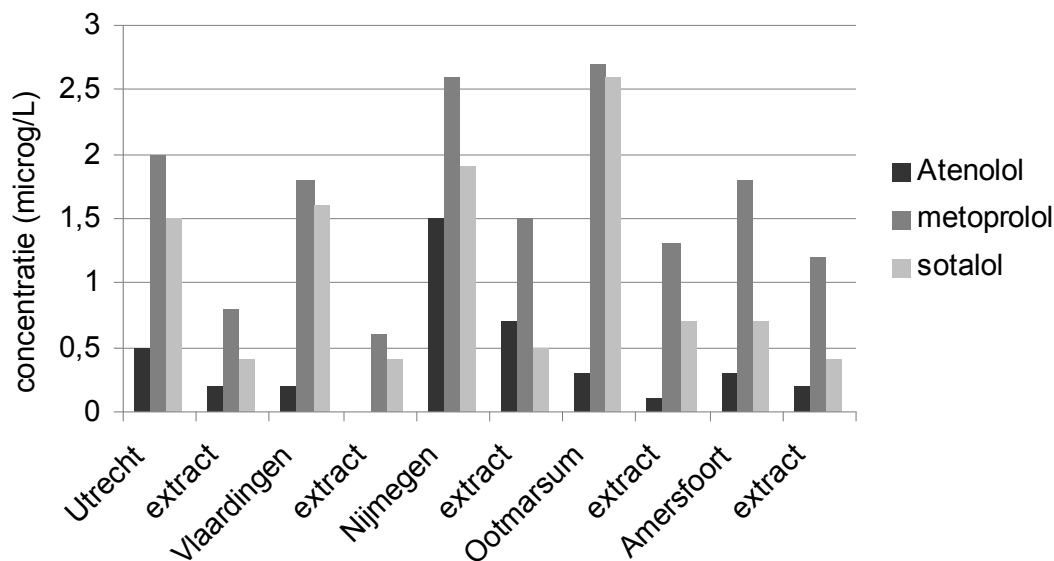
5.1 CHEMISCHE ANALYSE VAN REGULIERE PARAMETERS

De uitkomsten van de reguliere metingen aan stikstof, fosfaat en zuurstofverbruik staan per RWZI samengevat in bijlage 1. Er zijn bij de reguliere metingen geen overschrijdingen gemeld van de streefwaarden. Het debiet van de meetdag was hoger dan gemiddeld bij de RWZI Utrecht, wat duidt op de invloed van regen (RWA). Van de andere zuiveringen is het gemiddelde debiet niet bekend.

5.2 CHEMISCHE ANALYSE VAN GENEESMIDDELEN

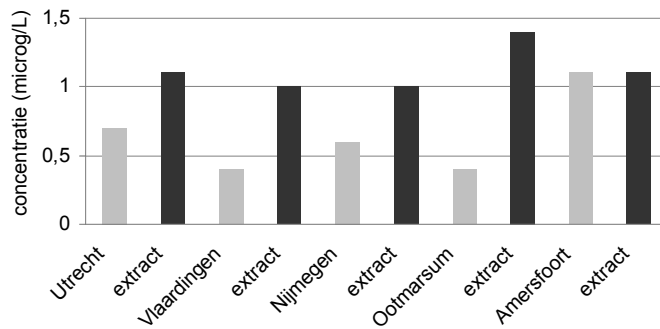
In bijlage 3 zijn in verschillende tabellen de resultaten van de geneesmiddelenanalyses in de RWZI effluënten en extracten van het RIVM weergegeven. Uit de resultaten blijkt dat 15 van de 26 middelen zijn aangetoond in concentraties waarbij kwantificering mogelijk is. De hoogst gemeten concentratie (2,7 µg/l) is het middel metoprolol, een bètablokker (bloeddrukverlagend middel).

FIGUUR 1 CONCENTRATIES VAN BÈTABLOKKERS IN VERSCHILLENDE RWZI-EFFLUENTEN EN EXTRACTEN.



Uit de resultaten blijkt dat de bètablokkers atenolol, metoprolol en sotalol in bijna alle monsters zijn gemeten (zie figuur 1). De volgorde in concentraties is metoprolol>sotalol>atenolol. In de extracten zijn de concentraties van de bètablokkers een fractie lager dan in de watermonsters, maar in de zelfde orde van grootte. Bij de pijnstillers (diclofenac, lidocaïne, naproxen en tramadol) is dat ook te zien (tabel 5 in bijlage 3). Echter, het middel sulfamethoxazol wordt juist in hogere concentraties gemeten in de extracten (figuur 2).

FIGUUR 2 CONCENTRATIE (MICROGRAM/L) VAN SULFAMETHOXAZOL IN WATERMONSTERS (GRIJS) EN EXTRACTEN (ZWART) VAN VERSCHILLENDE RWZI-EFFLUENTEN



VERGELIJKING MET ANDER ONDERZOEK

De methode van Kiwa Water Research is in staat om andere middelen te meten dan in eerder onderzoek in Nederland. Eerder onderzoek is vaak uitgevoerd door Omegam bv uit Amsterdam en TZW uit Karlsruhe (Duitsland). Bij Kiwa Water Research kunnen andere stoffen uit geneesmiddelen gemeten worden. 'Nieuwe' stoffen zijn atenolol, tramadol, furosemide, clindamycine, sulfadiazine, cyclofosfamide en ifosfamide.

Van een aantal andere middelen is bekend dat deze wel eerder zijn aangetroffen in gezuiverd afvalwater, ook in vergelijkbare concentraties. In bijlage 6 staat een overzicht van andere studies waarin geneesmiddelen gemeten zijn. De concentratie naproxen in het effluent van de RWZI Nijmegen is opvallend, omdat het niet voorkomt bij de andere RWZI's. Het meest opvallend zijn de (hoge) concentratie metoprolol in het effluent van Nijmegen en de oude RWZI Ootmarsum (zonder hybride MBR), omdat het hoger is dan eerdere studies. Ook de concentratie sulfamethoxazol in alle RWZI-effluenten van deze studie is opvallend, omdat deze hoger is dan de andere studies. Het is van belang om inzicht te krijgen in de verschillen in metingen en extractiemethoden om deze verschillen verder te verklaren.

MILIEURISICO'S

Uit onderzoek naar de effecten van geneesmiddelen op (water)organismen blijkt dat de concentraties waarop acute effecten optreden vaak veel hoger liggen dan de concentraties die in deze studie in het effluent zijn aangetoond. Echter, er bestaat nog de nodige onduidelijkheid over andere, meer subtiele effecten zoals gedragsveranderingen. Omdat de aanvoer vanuit RWZI's vrij constant is, zijn ook effecten die kunnen optreden door langdurige blootstelling van belang (de chronische toxiciteit). Juist deze effecten zijn nog niet goed beschreven. Er is veel informatie bekend over de effecten van geneesmiddelen in de mens. Kostisch & Lazorchak (2007) tonen aan dat in sommige gevallen een vertaling van deze effecten naar andere organismen kan plaatsvinden. Van een aantal geneesmiddelen is bekend dat ook effecten zijn waargenomen bij algen, watervlooiën en vissen (Fent et al, 2006). Voorbeeld hiervan zijn de antibiotica, pijnstillers en bepaalde typen bètablokkers (Fent et al, 2006).

De milieurisico's van de aangetroffen middelen zijn verder niet in detail uitgewerkt in dit rapport, maar de chronische of specifieke effecten van geneesmiddelen kunnen vooralsnog niet uitgesloten worden en rechtvaardigen de aandacht voor de stofgroep in monitoringsprogramma's.

5.3 BIOASSAYS

Bij elke rioolwaterzuivering zijn effecten aangetoond in verschillende bioassays (tabel 5; figuur 3). Het meest opvallend zijn de sterke effecten in het effluent van de (oude) RWZI Ootmarsum en Nijmegen. In Ootmarsum zijn effecten gevonden op algen bij minder dan ca. 15x, bij de RWZI in Nijmegen effecten op de watervlo bij 11x concentreren.

Opvallend was dat het extract van rioolwaterzuivering Nijmegen zeer giftig was voor de watervlo, waarbij de effecten al na 24 uur optraden. Bij de andere extracten traden effecten bij de watervlo pas na 48 uur op. Het extract van Ootmarsum was vooral zeer giftig voor algen. Zowel de algengroeimetingen als de PAM-test lieten dat zien. Beide testen maakten gebruik van dezelfde algensoort.

Het uitzoeken van de precieze oorzaak van de effecten in de bioassays valt buiten het doel van dit onderzoek. Een mogelijke oorzaak kan zijn dat hier stoffen met een specifieke werking aanwezig waren. Zo kunnen de effecten op de watervlo (Nijmegen) mogelijk veroorzaakt zijn door de aanwezigheid van een insecticide. De effecten op algen (RWZI Ootmarsum) kunnen mogelijk veroorzaakt zijn door een herbicide. De relatie tussen de gemeten geneesmiddelen en de toxiciteit is niet precies bekend en niet verder onderzocht in dit onderzoek.

Om de effecten goed te kunnen beoordelen is aangesloten bij de beoordeling die recent is ontwikkeld door RWS. In de volgende paragraaf wordt deze uitgebreid toegelicht en toegepast op de uitkomsten van het onderzoek.

Uit figuur 3 blijkt dat de uitslag van de testen meestal goed overeenkwam. Een uitzondering vormde het gemeten acute effect in de watervlo test voor de locatie RWZI Nijmegen en de algentesten van Ootmarsum. Uit de resultaten is verder duidelijk dat de groei van algen gevoeliger reageerde dan de fotosynthese bepaling in de PAM-test.

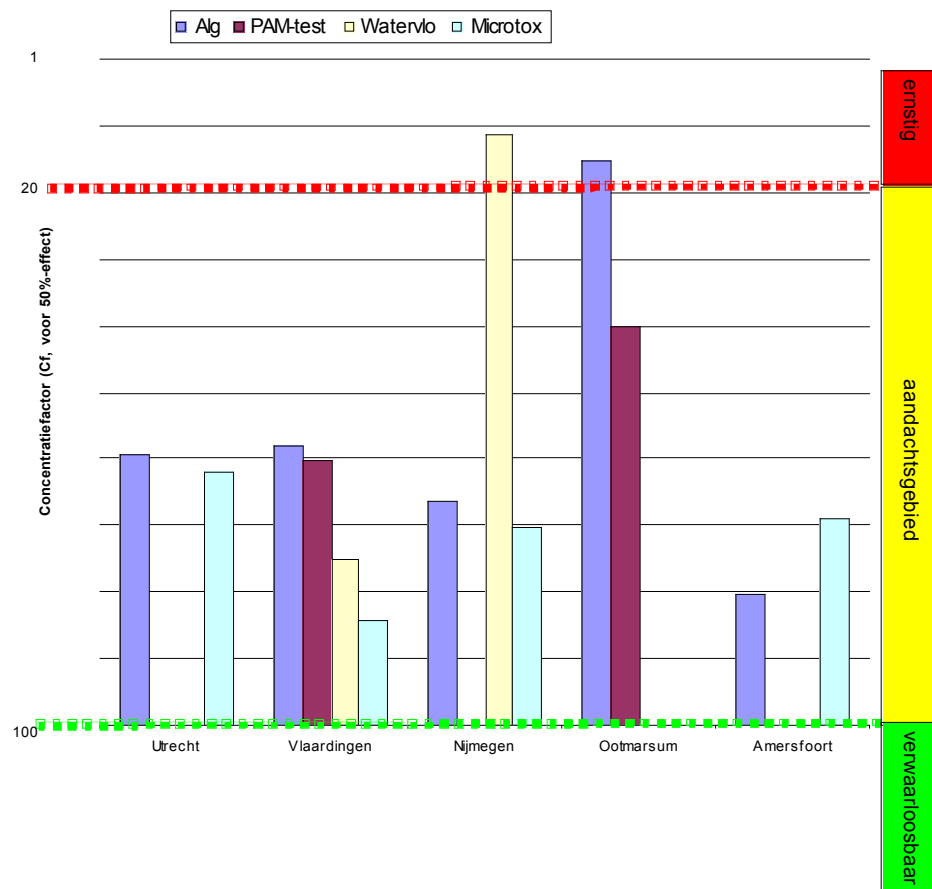
TABEL 5 RESULTATEN VAN DE UITGEVOERDE BIOASSAYS MET XAD EXTRACTEN VAN EFFLUENTMONSTERS. TUSSEN HAAKJES STAAT HET 95% BETROUWBAARHEIDINTERVAL AANGEGEVEN. VETGEDRUKT IS DE WAARDE WAAROP DE BEOORDELING VAN DE EFFECTEN VOORAL GEBASEERD IS

Bioassay / organisme	Effect Parameter Eenheid*)	Locaties				
		Utrecht	Vlaardingen	Nijmegen	Ootmarsum	Amersfoort
PAM-test	EC ₁₀ ^f	30x (26-36x)	11x (10-13x)	20x (17-24x)	7x (6-8x)	30x (25-35x)
	EC ₅₀ ^f	123x (114-131x)	60x (57-93x)	111x (103-119x)	40x (37-43x)	132x (124-140x)
Alg	EC ₅₀ ^f	59x (55-64x)	58x (52-66x)	66x (59-74x)	<15x	80x (74-85x)
	NOEC	21x	21x	21x	<15x	42x
Watervlo	EC ₅₀ ^f	107x (96-119x)	75x (65-87x)	<11x	>117x	103x (90-116x)
	NOEC	83x	42x	<11x	117x	83x
	Laagste conc. 100% sterfte	167x	167x	11x	>117x	167x
Microtox®	EC ₂₀ ^f	<21x	25x (22-28x)	<21x	40x (37-44x)	<21x
	EC ₅₀ ^f	62x (59-65x)	84x (77-93x)	70x (69-72x)	>117x	69x (64-75x)
ER-CALUX	Ng EEQ/l	0.98	1.1	4.3	5.7	2.9

*) Geconcentreerd monster: hoe lager de concentratie factor hoe meer toxisch het monster

FIGUUR 3

RESULTATEN VAN VERSCHILLENDE BIOASSAYS OP EXTRACTEN VAN EFFLUENT UIT 5 RIOOLWATERZUIVERINGEN. HOE LAGER DE CONCENTRATIEFACTOR, DES TE MEER TOXISCH. EEN CONCENTRATIE FACTOR VAN MEER DAN 100X IS NIET WEERGEGEVEN, WANT DIT IS VERWAARLOOSBAAR (ZIE DATA IN TABEL 5)



BEORDELING VAN DE ERNST VAN DE EFFECTEN

Bij de bioassays wordt gebruik gemaakt van concentraten. De mate van concentratie die effecten in de bioassay veroorzaakt wordt uitgedrukt als de concentratiefactor (Cf). De beoordeling van de ernst van de effecten is beschreven door Maas *et al.* (2003). Samengevat komt deze op het volgende neer:

- De effecten worden uitgedrukt als de mate van concentratie om een 50% effect in de acute bioassay te krijgen (EC_{50}^f). Hoe lager de concentratiefactor, hoe toxischer het monster is. Het hoeft immers minder vaak geconcentreerd te worden om een effect te veroorzaken.
- De waarden zijn vergeleken met de maatlat voor de Totaal Effluent Beoordeling (Maas *et al.*, 2003). Uitgangspunt daarbij is dat chronische toxiciteit in het oppervlaktewater moet worden vermeden. In deze methode wordt bepaald bij welke concentratiefactor van het monster het Maximaal Toelaatbaar Effect (MTE) optreedt. Als grenswaarde wordt een concentratiefactor (C_p) van 10 gehanteerd (Maas *et al.*, 2003). Deze wordt in ten minste 3 acute bioassays bepaald. Is de concentratiefactor lager, dan is het watermonster toxischer dan gewenst.
- In het huidige onderzoek is de toxiciteit bepaald *na extractie*. Mogelijk leidt dit tot een onderschatting van de werkelijke toxiciteit, omdat bepaalde stoffen niet in het extract komen. Bij het uitvoeren van een dergelijke beoordeling dient ook rekening te worden gehouden met het verlies van stoffen tijdens de extracties. Naast het feit dat de metalen, zeer lipofiele en hydrofiele organische verbindingen niet worden meegenomen

bij de XAD-extractie, blijkt ook dat niet alle stoffen voor 100% worden geëxtraheerd. Over het algemeen is de XAD-recovery circa 50-70%. In de meest recente discussie met de RWS-Waterdienst (RIZA) is de kritieke grens dan ook al op een concentratiefactor van 20 gezet. In deze studie wordt aangesloten bij deze aanpak. Dat betekent dat afvalwater waarin na extractie een EC_{50}^f lager dan 20 gemeten wordt met behulp van de acute bioassays dus chronische effecten kunnen optreden.

Het MTE (maximaal toelaatbaar effect) wordt daarmee dus 20 keer concentreren. Een extract dat in minstens 3 testen geen effect ($Cf > 100x$) laat zien, heeft een 'verwaarloosbaar effect' (VE). Een Ernstig Effect (EE): in 1 acute test een effect $\geq EC_{50}$ van $Cf = 20$. In figuur 3 en 4 is dat inzichtelijk gemaakt door de kleuren rood (ernstig, 'alarm'), geel (effect, aandachtsgebied) en groen (verwaarloosbaar, geen probleem).

Een extract dat in minstens 3 testen geen effect ($Cf > 100x$) laat zien, heeft een giftigheid die 'verwaarloosbaar' kan worden genoemd. Dat is bij geen van de vijf RWZI's in dit onderzoek het geval. Een concentratiefactor van minder dan 20x wordt in dit onderzoek bij de RWZI van Nijmegen en de conventionele RWZI Ootmarsum aangetoond ('ernstig effect'), zie figuur 3.

5.4 ANTIBIOTICA SCREENING

In tabel 6 is de laagste concentratiefactor van de gemeten monsters weergegeven waarbij nog geen groeiremming werd vastgesteld in de antibioticascreeppingsassay (de No Observed Effect Concentratie of NOEC-waarde).

TABEL 6 LAAGSTE CONCENTRATIE FACTOR (NOEC) WAARBIJ NOG GEEN BACTERIËLE GROEIREMMING OPTRAD. HOE LAGER DE CONCENTRATIEFACTOR, HOE GIFTIGER HET MONSTER

Antibioticum groep	RWZI			Ootmarsum	
	Utrecht	Vlaardingen	Nijmegen	(conventioneel)	Amersfoort
tetracyclines	>333	>333	>333	>233	>333
macroliden/ β -lactam	10	10	42	29	10
Quinolonen	83	83	>333	117	83
sulfonamiden	10	10	42	29	42
aminoglycosiden	167	167	167	>233	>333

Door het meten van de effecten in de antibiotica screeningsassay kan worden aangegeven welke groepen antibiotica aandacht vragen. Het effluent van alle RWZI's laat het meeste effect zien op de platen die testen op de sulfonamiden en de macrolide/ β -lactam antibiotica groepen. Immers, de concentratiefactoren zijn bij deze groepen het laagst; het monsters hoeft slechts weinig geconcentreerd te worden om effect op de groeiremming van bacteriën te veroorzaken. Andere groepen lijken minder van belang. Uit de resultaten blijkt dat de RWZI's Utrecht, Vlaardingen en Amersfoort het meeste effect vertonen, terwijl de RWZI's Ootmarsum en Nijmegen minder effecten laten zien.

Met behulp van de vastgestelde NOEC data zijn de effecten geschaald analoog aan de maatlat van Maas et al. (2003) en zoals hierboven is toegelicht. De resultaten staan weergegeven in figuur 4.

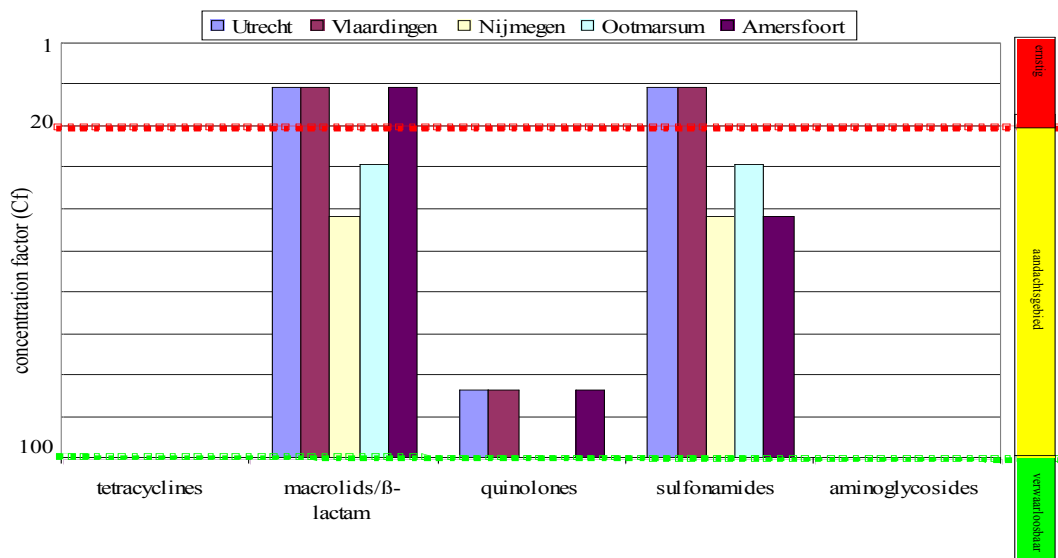
Het blijkt dat sulfonamiden en macroliden/ β -lactam antibiotica al bij twee respectievelijk drie van de RWZI's in het alarmgebied vallen. Quinolonen verdienen bij drie van de zuiveringen aandacht, terwijl de activiteit van glycosiden en tetracyclines verwaarloosbaar is.

Er is relatief veel effect van de sulfonamiden. De chemische analyse van de extracten laat zien dat van dat type antibiotica alleen het middel sulfamethoxazol is aangetoond boven de kwantificeringsgrens. De concentraties verschillen niet sterk tussen de locaties en lopen van 1 $\mu\text{g/L}$ (Nijmegen en Vlaardingen) tot 1.4 $\mu\text{g/L}$ (Ootmarsum). Andere middelen van deze

soort kunnen ook bijdragen aan de activiteit. Ook is deze plaat relatief gevoelig voor kruis-activiteit van antibiotica uit andere groepen. Het is niet uit te sluiten dat dit (deels) meespeelt.

Bij de RWZI Nijmegen en de oude RWZI van Ootmarsum is met deze screening de minste antibiotica activiteit aangetroffen, terwijl in Utrecht en Vlaardingen de meeste activiteit is gemeten. De activiteit van antibiotica bij de RWZI Amersfoort bevindt zich hier tussenin. De aanwezigheid van ziekenhuizen geeft geen verklaring voor dit verschil. De RWZI's van Utrecht en Vlaardingen ontvangen beiden ook een substantieel deel van ziekenhuizen. Zo ontvangt RWZI Utrecht het afvalwater van het academisch ziekenhuis Utrecht en RWZI Vlaardingen het afvalwater van drie regionale ziekenhuizen.

FIGUUR 4 GROEIREMMING VAN EFFLUENT VAN VIJF VERSCHILLENDE RWZI LOCATIES UITGEDRUKT ALS CONCENTRATIE FACTOR WAARBIJ NOG GEÉN EFFECT IS GEVONDEN.. ER IS GESCREEND OP VIJF VERSCHILLENDE GROEPEN VAN ANTIBIOTICA. HOE LAGER DE CONCENTRATIEFACTOR (CF) HOE GROTER HET EFFECT. EEN CONCENTRATIE FACTOR VAN MEER DAN 100X IS NIET WEEERGEGEVEN, WANT DIT IS VERWAARLOOSBAAR (ZIE DATA IN TABEL 6)



Ondanks de lage gemeten concentraties antibiotica, worden er op verschillende locaties wel effecten gezien in de test. Dit heeft een aantal mogelijke oorzaken:

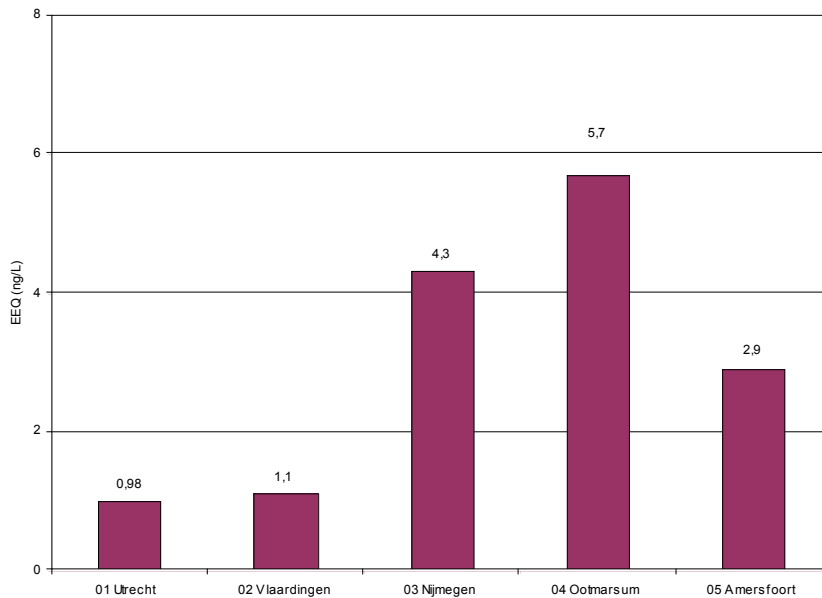
- Het kan betekenen dat het gevonden dosis gerelateerde effect is veroorzaakt door andere antibiotica dan die zijn gemeten.
- Een andere mogelijkheid is dat metaboliëten die niet chemisch worden aangetoond toch effecten kunnen hebben. Van verschillende geneesmiddelen is bekend dat de afbraakproducten van de actieve (moeder)stof juist actiever zijn.
- Ook is er de mogelijkheid dat andere stoffen (niet antibiotica) aanwezig zijn, die groeiremming veroorzaken. Denk bijvoorbeeld aan desinfectantia of biociden.
- Sommige antibiotica geven cross-reactiviteit op andere platen. Dat wil zeggen dat behalve de voor die groep bedoelde plaat ook een (geringe) remming op andere platen kan plaatsvinden. Dit effect laat zien dat een mengsel van stoffen gezamenlijk effecten kan veroorzaken (het totaal effect).

De specificiteit van de platen in hun reactie op antibiotica uit andere groepen, desinfectantia en/of biociden zal de komende tijd verder uitgezocht worden.

5.5 OESTROGENE ACTIVITEIT (ER-CALUX)

In figuur 5 zijn de resultaten van de ER-Calux test weergegeven. Hieruit blijkt dat in de RWZI Ootmarsum de hoogste activiteit is waargenomen (5,7 ng EEQ/l), gevolgd door Nijmegen (4,3 ng EEQ/l). Het extract van de RWZI Amersfoort is een factor 2 lager (2,9 ng EEQ/l), terwijl de activiteit van Utrecht en Vlaardingen rond de 1 ng EEQ/l is.

FIGUUR 5 OESTROGENE ACTIVITEIT VAN EFFLUENT VAN VERSCHILLENDE RIOOLWATERZUIVERINGEN, UITGEDRUKT IN NG EEQ/L



De resultaten van de ER-CALUX zijn vergeleken met eerdere analyses met deze methode en samengevat in tabel 7. Uit deze tabel wordt duidelijk dat de ER-CALUX resultaten voor Nijmegen en Ootmarsum aan de hoge kant zijn in vergelijking met eerder onderzoek aan conventionele zuiveringen. Het effluent van Amersfoort scoort gemiddeld en Utrecht en Vlaardingen aan de lage kant.

Een vuistregel waarbij effecten kunnen optreden is de grens van 1 ng EEQ/l zijn. Deze waarde is afgeleid van de zogenaamde PNEC (Predicted No Effect Concentration) voor 17-beta-estradiol in water (uit: STOWA, 2003). Deze concentratie is de indicatieve 'veilige' concentratie van het hormoon 17-beta-estradiol en van laboratorium onderzoek afgeleid. Beneden deze concentratie worden geen effecten verwacht. De activiteit van het water van de RWZI Amersfoort, Nijmegen en Ootmarsum was boven de 1 ng/L en dus aan de hoge kant. Bij een vertaling van de ER-Calux naar effecten in het veld dient wel de nodige voorzichtigheid betracht te worden. Zo verschilt de opname van hormonen in een organisme van de opname van hormonen in de ER-CALUX assay.

Bij een vertaling naar het veld is ook het van belang om de mate van verdunning van het effluent met het oppervlaktewater mee te wegen. Mocht het aandeel van de RWZI substantieel zijn, dan kan verder onderzoek naar het optreden van effecten in het oppervlaktewater (bijvoorbeeld bij vissen) zinvol zijn, met name bij de RWZI Ootmarsum en Nijmegen. De RWZI in Ootmarsum wordt op korte termijn aangepast. Het is interessant om in verder onderzoek te letten op het veranderingen in de oestrogene activiteit daar.

Van de RWZI Amersfoort is bekend dat metingen zijn verricht naar het voorkomen van vrouwelijking van vissen in het ontvangende oppervlaktewater (Gerritsen et al, 2003). Het water van de RWZI Amersfoort heeft een aandeel van 25% in het oppervlaktewater. Er werden veel vrouwelijke vissen en een lage groeisnelheid gevonden maar het bleef onduidelijk wat hiervan de oorzaken zijn. In het onderzoek naar de vissen was de conclusie dat de RWZI

in Amersfoort geen grote invloed heeft op de waargenomen effecten. Het bleef onduidelijk of het grote aandeel vrouwelijke vissen en de lage groeisnelheid wellicht door andere RWZI's kan komen. Dit kan komen door de RWZI bij Soest, die ook loost op de Eem of doordat nalevering van hormonen uit het sediment plaatsvindt.

TABEL 7 OVERZICHT EERDER ER-CALUX ONDERZOEK AAN RWZI INFLUENT EN EFFLUENT

Omschrijving	Extractiemethode ^a	Influent (ng EEQ/L)	Effluent (ng EEQ/L)	Aantal monsters, locaties	Referentie
Deze studie					
RWZI Utrecht	Liquid / liquid	n.b.	0,98	n=1, 1 locatie	
RWZI Vlaardingen	Liquid / liquid	n.b.	1,1	n=1, 1 locatie	
RWZI Nijmegen	Liquid / liquid	n.b.	4,3	n=1, 1 locatie	
RWZI Ootmarsum	Liquid / liquid	n.b.	5,7	n=1, 1 locatie	
RWZI Amersfoort	Liquid / liquid	n.b.	2,9	n=1, 1 locatie	
Conventioneel en met nageschakelde techniek					
LOES (RWZI onbekend)	Liquid / liquid (DEE)	38-3264	3,3	n=5, n=1 (effluent)	Vethaak et al., 2002
Conventioneel	SPE	9,1-71,0 ^b	0,18 - 5,2	n=20, 7 locaties	STOWA, 2005
Na zandfilter	SPE	n.b.	0,20 - 3,4	n=11, 4 locaties	idem
Na zand- en actief koolfilter	SPE	n.	0,21- 0,37	n=2, 1 locatie	idem
RWZI Steenwijk - Conventioneel	Liquid / liquid	58 - 89	<0.05- 0,62 ^c	n=6, 3 locaties	Grontmij, 2005
RWZI Steenwijk - Conventioneel	Liquid / liquid	n.b.	<0.05 - 0,83	n=2, 1 locatie	idem
RWZI Steenwijk - Zandfilter	Liquid / liquid	n.b.	0,33	n=1, 1 locatie	idem
RWZI "F"	SPE	n.b.	0,43-0,93	n=1, 1 locatie	STOWA, 2005
RWZI "F" + MBR	SPE	n.b.	0,06 - 0,10	n=3, 1 locatie	idem
Conventioneel, Maasbommel	Liquid / liquid (BDS)	n.b.	0,03-1,02	n=1, 1 locatie	STOWA, 2007
Na zandfilter, Maasbommel	Liquid / liquid (BDS)	n.b.	0,23-1,68	Idem	idem
Na koolfilter, Maasbommel	Liquid / liquid (BDS)	n.b.	<d.l.- 0,76	Idem	idem

^a liquid/liquid: extractiemiddel ethylactetaat of diethylether (DEE); SPE=solid phase extraction

^b influent gefilterd over een glasvezelfilter

^c ongefilterd extract

6

CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN

Dit rapport laat zien dat onderzoek aan identieke watermonsters succesvol is uitgevoerd door samenwerking van betrokken partijen, Kiwa Water Research, RIVM, Grontmij|AquaSense, BDS, de betrokken waterschappen en STOWA. De kennis over het voorkomen van 'nieuwe stoffen en hun effecten is vergroot en zal worden ingebracht in het netwerk 'monitoring nieuwe stoffen'. Hieronder worden de belangrijkste conclusies en aanbevelingen van de verschillende onderdelen kort samengevat.

6.1 CHEMISCHE ANALYSE VAN GENEESMIDDELEN

- De analyse door Kiwa Water Research is in staat om geneesmiddelen in effluent en extracties hiervan te bepalen. De concentraties in de ruwe watermonsters en de XAD extracten zijn goed vergelijkbaar.
- Met dit onderzoek heeft Kiwa Water Research de methode verder gevalideerd.
- Deze analyse toonde 26 middelen in het effluent aan, waarvan 14 boven de kwantificeringsgrens. De concentraties liggen in de range van 0,1 tot 2,7 µg/L. De hoogste concentraties betreffen de bètablokkers metoprolol en sotalol.
- De verschillen tussen de RWZI's zijn niet direct te verklaren door het type afvalwater dat wordt aangevoerd. Zo is van de betrokken RWZI's in deze studie bekend dat de RWZI in Ootmarsum geen aanvoer kent vanuit ziekenhuizen en de andere RWZI's wel (zie bijlage 1).
- Acute effecten op waterorganismen worden niet verwacht. De concentraties in het effluent in deze studie liggen lager (µg/L) dan de concentraties (mg/L) waarop effecten zijn aangetoond van geneesmiddelen in eerder onderzoek (Fent et al., 2006).
- De mogelijke risico's van een langdurige blootstelling aan de middelen die zijn aangetroffen en de chronische toxiciteit zijn onbekend. Omdat dergelijke gegevens niet eenvoudig beschikbaar zijn is het milieurisico in dit onderzoek niet verder uitgewerkt. Een analyse van de risico's van de aangetroffen middelen wordt daarom aanbevolen, waarin de laatste stand van zaken in de wetenschap, die zich snel ontwikkelt, wordt meegewogen.

6.2 EFFLUENT –BEOORDELING BIOASSAYS

- Het effluent van de RWZI van Utrecht, Amersfoort en Vlaardingen bevindt zich in het aandachtsgebied. Het blijft in dit onderzoek onder het maximaal toelaatbaar effect en boven het verwaarloosbaar effect.
- Het effluent van Nijmegen en Ootmarsum verdient aandacht, omdat ernstige effecten zijn aangetoond (Cf<20x). De RWZI Ootmarsum is recent aangepast met een hybride MBR en de verwachting is dat dit andere uitkomsten zal opleveren.
- Het achterhalen van de precieze oorzaak van de effecten in de bioassays viel buiten het doel van dit onderzoek. Verder is duidelijk dat de relatie tussen toxiciteit en de aanwezigheid van geneesmiddelen nog onbekend is. De aanwezigheid van andere oorzaken, zoals prioritair stoffen, is niet bepaald.

6.3 ANTIBIOTICA SCREENING

- De RWZI's van Ootmarsum en Nijmegen kennen een lage activiteit van antibiotica in het effluent, terwijl deze effluents wel effecten lieten zien bij de andere bioassays.
- De chemische analyse van de antibiotica verklaart niet direct de effecten in de screening, wat laat zien dat de activiteit niet altijd samenhangt met het aantonen van stoffen uit deze groepen.
- Wat betreft de ecologische en/of toxicologische relevantie van het meten van toxische druk van antibiotica in de antibiotica-screeningsassay dient nog validatie werk te worden verricht. Dit betreft dan vooral in hoeverre andere stoffen dan antibiotica van invloed zijn op het gemeten effect.

6.4 OESTROGENE ACTIVITEIT (ER-CALUX)

- De activiteit van het effluent van de RWZI's Utrecht en Vlaardingen is lager dan de andere locaties. Op de locaties met een hoge score (Nijmegen en Ootmarsum) is inzicht nodig in de verdunningsgraad op het oppervlaktewater en de lokale omstandigheden. Op basis daarvan kunnen uitspraken gedaan worden over de verwachting van het risico voor eventuele risico's, zoals vervrouwelijking van vissen.
- Mocht blijken dat de RWZI Ootmarsum met een recent gebouwde hybride MBR nog steeds een verhoogde oestrogene activiteit laat zien, dan wordt hierop een vervolgonderzoek aanbevolen. Een dergelijk onderzoek moet dan duidelijk maken of er effecten optreden van de oestrogene activiteit bij vissen in het oppervlaktewater stroomafwaarts van de RWZI+MBR Ootmarsum.

7

REFERENTIES

Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 2006;76:122-59.

Hilton MJ, Thomas KV and Ashton D (2003) Targeted Monitoring Programme for Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. R&D Technical Report P6-012/06/TR. Environment Agency, Bristol, United Kingdom.

Huggett DB, Brooks BW, Peterson B, Foran CM, Schlenk D (2002) Toxicity of Selected Beta-Adrenergic Receptor Blocking Pharmaceuticals (B-Blockers) to Aquatic Organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 43:229-235.

Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT (2003) Theoretical Model for Utilizing Mammalian Pharmacology and Safety Data to Prioritize Potential Impacts of Human Pharmaceuticals to Fish. *Human and Ecological Risk Assessment*, 9, 1789-1799

ISO 6341 (1996)Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. ISO guideline.

ISO 8692 (1989) Water quality -- Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. ISO Guideline.

ISO 11348-3 (1998) Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ISO guideline.

Gerritsen AAM, Rijs GBJ, Klein Breteler JGP, Lahr J (2003) Oestrogene effecten in vissen in regionale wateren. RWS-RIZA rapport 2003.019, Lelystad.

Grontmij (2005). Influent- en effluentonderzoek RWZI's Deel B: hormoonverstorende stoffen. In opdracht van: Waterschap Reest en Wieden. Grontmij|AquaSense Rapportnummer: 2360.

Grontmij (2007) Onderzoek zandfiltratie RWZI Steenwijk, rapport voor Waterschap Reest en Wieden. Grontmij|AquaSense rapport 217755.

Grontmij (2008) RWZI-monitoring hormonen en geneesmiddelen. Grontmij|AquaSense (nog ongepubliceerde data).

Kostisch M, Lazorchak JM (2008) Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use *Science of the Total Environment* 389 (2) 329-339.

Maas, J.L., E.J. van de Plassche, A. Straetmans, A.D. Vethaak, A.C. Belfroid, (2003), Normstelling voor bioassays, RIZA rapport nr. 2003.005

Schrap SM, Rijs GBJ, Beek MA, Maaskant JFN, Staeb J, Stroomberg G, Tiesnitsch J (2003) Humane en veterinaire geneesmiddelen in Nederlands oppervlakte- en afvalwater. RIZA rapport 2003.023, Lelystad.

Pikkemaat. G, Oostra-van Dijk S, Schouten J, Rapallini M., van Egmond H.J., A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening), Food control (2007) doi:10.1016/j.foodcont.2007.08.002

SOP LER 303/04 Voorschrift voor het concentreren van organische microverontreinigingen uit water m.b.v. XAD-harsen.

SOP LER 310/02 Opwerken van een aceton concentraat tot een water monster voor aquatische toxiciteits toetsen.

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

STOWA (2005) Verkennende monitoring van hormoonverstorende stoffen en pathogenen op RWZI's met aanvullende zuiveringstechnieken. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Utrecht. STOWA rapport 2005-32.

STOWA (2006a) Onderzoek MBR Varsseveld, deelstudierapport. Deelstudie verwijdering bijzondere stoffen. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Utrecht. STOWA rapport 2006-06.

STOWA (2006b) Filtratietechnieken RWZI'S. Stand van zaken en ervaringen met zandfiltratie. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Utrecht. STOWA rapport 2006-21.7

STOWA (2007) Effluent nabehandeling op de RWZI Maasbommel. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Utrecht. STOWA rapport 2007-17

Van Beusekom SAM et al, (1999), Handleiding PAM-test, RIVM Bilthoven

Vethaak, A.D. et al., 2002. Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of The Netherlands. RIZA/RIKZ rapportnummer 2002.001, Lelystad.



BIJLAGEN

BIJLAGE 1: KENMERKEN RWZIS

RWZI locatie (naam)													
Omschrijving	Eenheid	Utrecht	Vlaardingen (Grote Lucht)	Nijmegen (Weurt)	Ootmarsum	Amersfoort							
Waterschap		HDSR	HH Deifland	Rivierenland	Regge en Dinkel	Vallei & Eem							
Oppervlaktewater		Vecht	Maas	Maas-Waalkanaal	Dinkel	Eem							
Type		Conventioneel (A/B-systeem)	Conventioneel met VBT	Phoredox met VBT	Oxydatiesloot, type Carrousel	Conventioneel met VBT type Carrousel 2000							
Nageschakelde technieken		SHARON: behandeld filtraatwater van slibontwatering.	Ultra laagbelaste actiefslib installatie, drietraps installatie oxydaties loot m ³ /h	Gedeelte: Discontinuu zandfilter (1400 m ³ /h)	Nee	Nee							
Ontwerpbelasting (a 136g TZV)	i.e.	530.000	285.000	440.000	11.500	340.000							
Huidige belasting (a 136g TZV)	i.e.	420.846	244.890	320.000	11.604	290000 i.e.							
Huidig debiet	m ³ /d	Op meetdag: 87.063 m ³ /d Gemiddeld: 69.354 m ³ /d	76.970 m ³ /dag. (meetdag)	140.600 m ³ (meetdag)	2.500m ³ /d (meetdag)	85040 m ³ /d (meetdag)							
Verblijftijd					101 d.	10 uur in AT							
Stibbelasting	kg BZV/kg ds.dag	1 ^e trap: 2.8 2 ^e trap: 0.061	0.046	0.063	0.039	0.041							
Slibleeftijd	d	1 ^e trap: 0,4 2 ^e trap: 15	18,6	11	26	19							
Aanvoer ziekenhuis (aantal, soort)		1 academisch + 3x regionaal	3x regionaal	1 academisch 2 regionaal	Geen ziekenhuis: 1 lokaal gezondheidscentrum	1 regionaal (vanuit 2 lokaties)							
% Industrieel (% v.e.)	%	Niet bekend	ca. 9 %	20 %	17 %	ca 25% (CBS enquête, 2006)							
Reguliere parameters*		Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent						
CZV	mg/l	408	30	351	35	461	24	450	36	360	29	19/6/07	19/6/07
BZV ₅	mg/l	138	3,0	113	3,0	154	2	177	3,4	140	<2		
N _{ij} -N	mg/l	39	3,0			44	3	38	3,3	36,3	1,6		
NO _x -N	mg/l		4,2				6		3,3	nb	2,7		
NH ₄ ⁺ -N	mg/l							26	1,7	nb	nb		
N _{tot} -N	mg/l		7,4	36	7,4	7,3	9	6,8	6,8	=Kj-N 36,3	4,3		
P _{tot} -P	mg/l	6,1	0,5	6,1	1,9	6,7	0,8	6,5	2,5	6,3	0,28		
PO ₄ -P	mg/l												
SS (onopgeloste best.)	mg/l	208	4,3	169	2,6	216	3	207	5,7	68	<5		

SS=suspended solids of onopgeloste bestanddelen

NBT=nabezinktank, VBT=voorbezinkt tank,

BIJLAGE 2 OVERZICHT TESTEN

ACUTE TOXICITEITTEST MET *VIBRIO FISCHERI* (MICROTOX®)

Principe

De toxiciteitstest met de bacterie *Vibrio fischeri* werd uitgevoerd volgens ISO 11348-3 (1998). Deze bacterie zendt onder normale omstandigheden licht uit. Dit verschijnsel heet bioluminescentie. Door blootstelling aan toxische stoffen en/of extracten wordt de uitzending van licht geremd.

Uitvoering

In de test werd met een lichtmeter (Microtox®) de afname van de bioluminescentie bij de bacterie beoordeeld na 5, 15 en 30 minuten blootstelling aan een viertal concentraties testmedium. De concentratiereeks is gebaseerd op een 1:1 doorverdunding van het monster. Met uitzondering van monster 347603 (Ootmarsum) werd de volgende concentratiereeks toegepast: 166,5 ; 83,3 ; 41,6 en 20,8 maal geconcentreerd monster. Voor monster 347603 werden de bacteriën blootgesteld aan de volgende 4 concentraties testmedium: 116,5 ; 58,3 ; 29,1 en 14,6 maal geconcentreerd monster. De test- en incubatietemperatuur bedroeg 15 °C en de analyses werden in duplo uitgevoerd.

De geteste concentraten werden opgewerkt m.b.v. een XAD extractie. Aangezien de geëxtraheerde organische verontreinigingen na opwerking opgenomen worden in een standaard testmedium (DSW), zijn problemen met overschrijding van randvoorwaarden (ammonium, nitriet, geleidbaarheid etc.) uitgesloten. Gedurende de test is de geleidbaarheid bepaald i.v.m. het aanzouten van het monster. De osmolariteit van de testoplossingen moet 20 g/l NaCl zijn en werd hiernaar aangepast.

Verwerking en rapportage

Het effect wordt uitgedrukt als afname van de bioluminescentie t.o.v. de blanco (=verdunningsmedium) na een gegeven blootstellingduur. Uit de resultaten wordt per blootstellingduur één gemiddelde EC_{50}^f -waarde bepaald met behulp van de programmatuur behorende bij het Microtox-teststelsel. De EC_{50}^f -waarde (Effect Concentratie^{factor}) is gedefinieerd als het aantal maal dat het monster geconcentreerd is, waarbij na een gegeven blootstellingduur een afname van 50% van de bioluminescentie t.o.v. de blanco (=verdunningsmedium) kan worden waargenomen. Hoe lager de EC_{50}^f -waarde, hoe toxischer het monster is. Het monster hoeft dan immers minder vaak geconcentreerd te worden om 50% remming ten opzichte van de blanco te veroorzaken. De laagste van de op de 3 tijdstippen bepaalde EC_{50}^f -waarde, wordt gebruikt om de toxiciteit van het monster weer te geven.

ALGEN PLAATTEST: ACUTE TOXICITEITTEST

Principe

De acute toxiciteitstest met *Pseudokirchneriella subcapitata* werd uitgevoerd conform ISO 8692 (2004). De remming van de groeisnelheid (μ) van de alg werd beoordeeld na 72 uur blootstelling aan een vijftal concentraties testmedium. De zoetwateralgen groeien onder normale omstandigheden in een snel tempo. Echter, bij toxiciteit van waterextracten vindt remming van de groeisnelheid plaats.

Uitvoering

De test werd uitgevoerd in een 48 wells plaat. Blanco testmedium werd bereid door toevoeging van een 4-tal nutriëntoplossingen aan demi water. Om de nutriëntsamenstelling in alle testconcentraties gelijk te houden werden deze nutriëntoplossingen ook toegevoegd aan het uitgangsmonster. Zowel aan het blanco testmedium als aan het uitgangsmonster (met toegevoegde nutriënten) werden algen toegevoegd. De startconcentratie algen bij aanvang van de test bedroeg in alle oplossingen circa $0,5 \cdot 10^4$ cellen/ml. De test werd in triplo (blanco in zesvoud) uitgevoerd bij 23 ± 2 °C, met een continue belichting van 60-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (een maat voor de lichtintensiteit).

De concentratiereeks is gebaseerd op een 1:1 doorverdunding van het monster.

Met uitzondering van monster 347603 werd de volgende concentratiereeks toegepast: 333 ; 166,5 ; 83,3 ; 41,6 en 20,8 maal geconcentreerd monster. Voor monster 347603 werden de algen blootgesteld aan de volgende 5 concentraties testmedium: 233 ; 116,5 ; 58,3 ; 29,1 en 14,6 maal geconcentreerd monster.

Om te kunnen corrigeren voor eventuele storende invloeden van het monster, zoals kleur of deeltjes, werden per testconcentratie tevens 2 replica's meegenomen waaraan geen algen werden toegevoegd. Aan het begin van de test en na 72 uur werden de cel dichtheden bepaald. Hiertoe werden de testoplossingen doorgemeten met een fluorimeter. Aan de hand van een ijklijn werden de fluorescentiesignalen omgerekend naar cel dichtheden in de testoplossingen. Hieruit werd per testconcentratie de groeisnelheid (μ) berekend.

De geteste concentraten werden opgewerkt m.b.v. een XAD extractie. Aangezien de geëxtraheerde organische verontreinigingen na opwerking opgenomen worden in een standaard testmedium (DSW), zijn problemen met overschrijding van randvoorwaarden (ammonium, nitriet, geleidbaarheid etc.) uitgesloten. Gedurende de test is de pH gemeten op $t=0$ en $t=72$ uur. De start pH van de blanco en de testconcentraties was $8,1 \pm 0,2$. De pH van de blanco en de monsters is naar deze waarde bijgesteld m.b.v. een HCl of NaOH oplossing. Tevens is één van de geldigheidscriteria van de test dat de pH toename in de blanco gedurende de test niet meer dan 1,5 eenheid mag bedragen

Resultaten en rapportage

Verschillen in het gemiddelde van de groeisnelheden per testconcentratie t.o.v. de blanco zijn getoetst met behulp van het statistische pakket ToxCalc (Tidepool, 1995). Op basis hiervan is de EC_{50}^f -waarde (Effect Concentratie^{factor}) geschat. Deze concentratiefactor geeft aan hoeveel maal het originele monster geconcentreerd moet worden om, na 3 dagen blootstelling, 50% remming op de groeisnelheid van de algen te veroorzaken. Daarnaast werd aan de hand van een hypothese toets uit het Toxcalc-software pakket de NOEC (No Observed Effect Concentration) bepaald.

WATERVLO TEST (DAPHNIA MAGNA) : ACUTE TOXICITEITTEST

Principe

De acute toxiciteitstest met de watervlo *Daphnia magna* werd uitgevoerd volgens ISO 6341 (1998). De watervlooien behoorden tot Kloon 4 zoals gedefinieerd door Calow & Bradley (1987). Als effectparameter werd de immobiliteit bestudeerd. Als watervlooien bloot worden gesteld aan bepaalde stoffen, dan stoppen ze met zwemmen en worden ze immobiel genoemd. Naarmate de stoffen en/of het extract toxischer zijn, zullen meer watervlooien stoppen met zwemmen.

Uitvoering

De watervlooien werden in deze test gedurende 48 uur blootgesteld aan een vijftal concentraties testmedium. De concentratiereeks is gebaseerd op een 1:1 doorverdunding van het monster. Met uitzondering van monster 347603 werd de volgende concentratiereeks toegepast: 166,5 ; 83,3 ; 41,6 ; 20,8 en 10,4 maal geconcentreerd monster. Voor monster 347603 werden de *Daphnia* blootgesteld aan de volgende 5 concentraties testmedium: 116,5 ; 58,3 ; 29,1 ; 14,6 en 7,3 maal geconcentreerd monster. Voor de bereiding van de testconcentraties werd ISO *Daphnia* medium als verdunningsmedium gebruikt. Dit medium diende tevens als blanco. Het testvolume bedroeg 5 ml per buis. De test werd in viervoud uitgevoerd met in ieder testvat 5 watervlooien. De testorganismen waren bij het inzetten van de test jonger dan 24 uur en afkomstig van ouderdieren met een leeftijd van 2-3 weken. De test werd uitgevoerd bij een temperatuur van $20 \pm 1^\circ\text{C}$ en een lichtregime van 16 uur licht en 8 uur donker. Tijdens de test werden de proefdieren niet gevoerd.

De watervlooien werden als immobiel beschouwd indien ze niet binnen 15 seconden gingen zwemmen nadat voorzichtig tegen het testvatje was getikt. Ook de watervlooien die niet meer zwommen, maar wel bewegende antennen hadden, werden als immobiel beoordeeld.

Resultaten en rapportage

Uit de resultaten werd m.b.v. het ToxCalc-softwarepakket (Tidepool, 1995) de EC_{50}^f -waarde (Effect Concentratie^{factor}) geschat. Deze concentratiefactor geeft aan hoeveel maal het originele monster geconcentreerd moet worden, om 50% effect op de immobiliteit van de watervlooien na 48 uur blootstelling te veroorzaken. Daarnaast werd aan de hand van een hypothese toets uit het Toxcalc-software pakket de NOEC (No Observed Effect Concentration) bepaald.

ER-CALUX (HORMOONVERSTORING)

Extractiemethode

De afvalwatermonsters zijn geëxtraheerd met ethylacetaat, waarna de extracten zijn opgeschoond op een natriumsulfaat kolom om mogelijk aanwezig water te verwijderen. De watervrije extracten zijn opgenomen in dimethylsulfoxide (DMSO). Van alle extracten zijn verdunningen gemaakt in DMSO, 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%. De ER-CALUX extractie is uitgevoerd door BioDetection-Systems.

Principe

De ER-CALUX assay is 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 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 stof luciferine om te zetten, waarbij licht vrijkomt. De hoeveelheid licht vormt een maat voor de hoeveelheid oestrogene stoffen.

Uitvoering

De ER-CALUX bepaling is uitgevoerd door BioDetectionSystems.

Resultaat en rapportage

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

BIJLAGE 3

TABELLEN RESULTATEN GENEESMIDDEL ANALYSE KIWA WATER RESEARCH

TABEL 1 RWZI WATERMONSTERS KWANTITATIEF GEANALYSEERD (CONCENTRATIES IN $\mu\text{G/L}$. CONCENTRATIE BEREKEND, T.O.V. EEN ADDITIE VAN 1,0 OF 5,0 $\mu\text{G/L}$ VAN DE VERMELDE GENEESMIDDELEN AAN RWZI WATER (NIEUWEGEIN). VETGEDRUKT ZIJN DE MIDDELEN DIE BOVEN DE KWANTIFICERING GRENS ZIJN AANGETROFFEN

Geneesmiddelen	C-07 2097 Vlaardingen 19-6-2007	C-07 2098 Utrecht 18/19-6-2007	C-07 2099 Nijmegen 19-6-2007	C-07 2100 Amersfoort 18/19-6-2007	C-07 2101 Ootmarsum 19?-6-2007
Atenolol	0,2	0,5	1,5	0,3	0,3
Bezafibraat	<	<	<	<	<
carbamazepine	0,4	0,5	0,5	0,6	0,4
5-chlooramphenicol	-	-	-	-	-
clindamycine	<	<	<	<	<
cyclofosfamide	-	-	<	-	-
diclofenac	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
fenazon	<	<	<	<	<
fluoxetine	-	-	-	<	-
furosemide	-	0,2	0,2	<	0,2
ibuprofen	-	-	-	-	-
ifosfamide	-	<	<	-	-
lidocaïne	0,1	0,1	0,1	0,1	<
lincomycine	-	-	-	-	<
metoprolol	1,8	2,0	2,6	1,8	2,7
metronidazol	-	-	-	-	-
naproxen	-	-	0,6	-	-
nitrofurantoin	-	-	-	-	-
paroxetine	<	<	<	<	<
propyfenazon	<	<	<	<	
salbutamol	-	-	-	-	-
sotalol	1,6	1,5	1,9	0,7	2,6
sulfadiazine	-	-	-	-	-
sulfamethoxazol	0,4	0,7	0,6	1,1	0,4
tramadol	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2
trimethoprim	<	<	<	<	<

'<' = geneesmiddelen aanwezig onder de kwantificering grens

'-' = geneesmiddelen niet aangetoond.

TABEL 2 RWZI WATERMONSTERS: KWALITATIEF GEANALYSEERD

Componenten	C-07 2097 Vlaardingen 19-6-2007	C-07 2098 Utrecht 18/19-6-2007	C-07 2099 Nijmegen 19-6-2007	C-07 2100 Amersfoort 18/19-6-2007	C-07 2101 Ootmarsum 19?-6-2007
amoxicilline	-	-	-	-	-
cephalexine	-	-	-	-	-
ciprofloxacine	-	-	-	-	-
clofibrinezuur	+	+	+	+	+
doxycycline	-	-	-	-	-
enrofloxacin	-	-	-	-	-
erythromycine	-	-	-	-	-
ethosuxemide	-	-	-	-	-
5-fluorouracil	-	-	-	-	-
jopromide	-	+	+	-	-
ofloxacin	+	+	+	+	-
omeprazole	+	+	+	+	+
oxytetracycline	-	-	-	-	-
simvastatine	-	-	-	-	-

Een deel van de geneesmiddelen kon nog niet kwantitatief bepaald worden, maar er kan wel bepaald worden of deze aanwezig zijn in het RWZI monster. Dit is in de tabel vermeld met een '+'. Daar waar een '-' is vermeld zijn deze geneesmiddelen niet aangetoond.

TABEL 3 RIVM RWZI EXTRACTEN KWANTITATIEF GEANALYSEERD (CONCENTRATIES IN $\mu\text{G/L}$. CONCENTRATIE BEREKEND, T.O.V. EEN ADDITIE VAN 1,0 OF 5,0 $\mu\text{G/L}$ VAN DE VERMELDE GENEESMIDDELEN AAN RWZI WATER (NIEUWEGEIN)

Geneesmiddelen	Vlaardingen 19-6-2007	Utrecht 18/19-6-2007	Nijmegen 19-6-2007	Amersfoort 18/19-6-2007	Ootmarsum 19-6-2007
atenolol	<0,1	0,2	0,7	0,2	0,1
bezafibraat	<	-	<	-	-
carbamazepine	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2
5-chlooramphenicol	-	-	-	-	-
clindamycine	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
cyclofosfamide	-	-	0,1	-	-
diclofenac	<	0,1	<	<	-
fenazon	<	<	<	-	-
fluoxetine	-	-	-	-	-
furosemide	-	-	-	-	-
ibuprofen	-	-	-	-	-
ifosfamide	-	-	0,1	-	-
lidocaïne	<	<	<	<	<
lincomycine	-	-	-	0,1	0,2
metoprolol	0,6	0,8	1,5	1,2	1,3
metronidazol	-	-	-	-	-
naproxen	-	-	-	-	-
nitrofurantoin	-	-	-	-	-
paroxetine	<	<	<	<	-
propyfenazon	<	<	<	<	<
salbutamol	-	-	-	-	-
sotalol	0,4	0,4	0,5	0,4	0,7
sulfadiazine	-	-	-	-	-
sulfamethoxazol	1,0	1,1	1,0	1,1	1,4
tramadol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
trimethoprim	<	<	<	<	<

'<' = geneesmiddelen aanwezig onder de kwantificeringsgrens

'-' = geneesmiddelen niet aangetoond.

TABEL 4 RIVM RWZI EXTRACTEN: KWALITATIEF GEANALYSEERD

Componenten	Vlaardingen 19-6-2007	Utrecht 18/19-6-2007	Nijmegen 19-6-2007	Amersfoort 18/19-6-2007	Ootmarsum 19-6-2007
amoxicilline	-	-	-	-	-
cephalexine	-	-	-	-	-
ciprofloxacin	-	-	-	-	-
clofibrinezuur	-	-	-	-	-
doxycycline	-	-	-	-	-
enrofloxacin	-	-	-	-	-
erythromycine	-	-	-	-	-
ethosuxemide	-	-	-	-	-
5-fluorouracil	-	-	-	-	-
jopromide	-	+	+	-	-
ofloxacin	+	+	+	+	+
omeprazole	+	+	+	+	+
oxytetracycline	-	-	-	-	-
simvastatine	-	-	-	-	-

Een deel van de geneesmiddelen kon nog niet kwantitatief bepaald worden, maar er kan wel bepaald worden of deze aanwezig zijn in het RWZI monster. Dit is in de tabel vermeld met een '+'. Daar waar een '-' is vermeld zijn deze geneesmiddelen niet aangetoond.

TABEL 5 GENEESMIDDELEN (µG/L) IN 'RUWE' RWZI WATERMONSTERS EN RIVM EXTRACTEN

Geneesmiddelen	Therapeutische werking	Utrecht	Vlaardingen	Nijmegen	Ootmarsum	Amersfoort	extract
clindamycine	antibioticum	<	<	<	<	<	0,1
lincomycine	antibioticum	-	-	-	<	-	0,2
sulfadiazine	antibioticum	-	-	-	-	-	-
sulfamethoxazol	antibioticum	0,7	0,4	0,6	0,4	1,1	1,4
Atenolol	bètablokker	0,5	0,2	1,5	0,3	0,3	0,1
metoprolol	bètablokker	2	1,8	2,6	2,7	1,5	1,3
sotalol	bètablokker	1,5	1,6	1,9	2,6	0,5	0,7
diclofenac	pijnstiller	0,2	0,2	0,1	0,2	<	-
lidocaine	pijnstiller	0,1	0,1	0,1	<	<	<
naproxen	pijnstiller	-	-	0,6	-	-	-
tramadol	pijnstiller	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1
cyclofosfamide	cytostaticum	-	-	<	-	0,1	-
ifosfamide	cytostaticum	<	-	<	-	0,1	-
Furosemide	diureticum	0,2	-	0,2	0,2	-	-
Carbamazepine	anti-epilepticum	0,5	0,4	0,5	0,4	0,3	0,2

BIJLAGE 4

OVERZICHT METINGEN GENEESMIDDELEN IN EFFLUENT VAN DIVERSE RWZI'S. ALLEEN MIDDELEN DIE ZIJN AANGETOOND IN EERDERE STUDIES ZIJN VERMELD (CONCENTRATIES IN µG/L).

Locatie	Monsters	Carbamazepine	Diclofenac	Erythromycine	Naproxen	Metoprolol	Sulfamethoxazol	Trimethoprim	Referentie
Utrecht	n=1	0,5	0,2	-	-	2	0,7	<d.l.	deze studie
Vlaardingen	n=1	0,4	0,2	-	-	1,8	0,4	<d.l.	deze studie
Nijmegen	n=1	0,5	0,1	-	0,6	2,6	0,6	<d.l.	deze studie
Ootmarsum	n=1	0,4	0,2	-	-	2,7	0,4	<d.l.	deze studie
Amersfoort	n=1	0,6	0,2	-	-	1,8	1,1	<d.l.	deze studie
Diverse RWZI's	N=6	0,33 - 1,0	0,42 - 0,89	n.b.	0,15 - 1,3	0,32 - 0,99	0,06 - 0,13	0,08 - 0,14	Schrap et al., 2003
Diverse RWZI's	N=8	0,38 - 0,96	0,23 - 0,44	<d.l. - 0,12	0,12 - 0,35	0,79 - 2,60	0,10 - 0,35	<d.l. - 0,24	Grontmij AquaSense, 2008
Apeldoorn	N=2	0,29 - 0,31	0,08 - 0,12	n.b.	0,14 - 0,17	0,48 - 0,51	0,03 - 0,03	0,11 - 0,12	STOWA, 2006a
- , actief kool	N=2	0,09 - 0,12	0,05 - 0,07	n.b.	0,07 - 0,11	0,10 - 0,18	0,05 - 0,06	<0,02 - 0,02	STOWA, 2006a
- , nanofiltratie	N=2	0,08 - 0,10	0,02 - 0,03	n.b.	0,03 - 0,03	0,06 - 0,07	0,02 - 0,02	<0,02 - 0,02	STOWA, 2006a
Varsseveld, MBR	N=4	0,23 - 0,46	0,25 - 0,37	n.b.	0,14 - 0,16 (<0,20)	2,0 - 2,4	<0,01 - <0,15 (0,05)	0,14 - 0,79	STOWA, 2006a
Steenwijk, ZF	N=1	0,96	0,37	<0,05	0,17	1,9	0,08	0,18	Grontmij AquaSense, 2007
Leeuwarden, ZF	N=1	0,67	0,1	0,08	< 0,02	0,59	0,1	0,13	STOWA, 2006b

'-' = geneesmiddelen niet aangetoond.

<d.l.' = geneesmiddelen aanwezig, maar onder de kwantificeringsgrens

Schrap et al. (2003) Humane en veterinaire geneesmiddelen in Nederlands oppervlakte- en afvalwater. RIZA rapport 2003.023

Kools en de Kort, conceptstudie, nog niet gepubliceerd

STOWA (2006a) Onderzoek MBR Varsseveld, deelstudierapport. Deelstudie verwijdering bijzondere stoffen. STOWA rapport 2006-06.

Kools en Derksen (2007) Onderzoek zandfiltratie RWZI Steenwijk, rapport voor Reest en Wieden. Grontmij|AquaSense rapport 217755.

STOWA (2006b) Filtratietechnieken RWZI'S. Stand van zaken en ervaringen met zandfiltratie. STOWA rapport 2006-21.7