

Influent- en effluentonderzoek rwzi's

Deel B: hormoonverstorende stoffen



Influent- en effluentonderzoek rwzi's

Deel B: hormoonverstorende stoffen

in opdracht van	Waterschap Reest en Wieden
------------------------	----------------------------

uitvoering door	ir. J.G.M. Derksen
namens opdrachtgever	ir. A.L. van der Mark

rapportnummer	code opdrachtgever	status
2360	ZEE/ZEM/AvdM/5007fws (deel 1); ZEE/ZEM/AvdM/ 5896fws (deel 2)	Eindrapport

autorisatie	naam	paraaf	datum
opgemaakt	ir. J.G.M. Derksen		07-10-05
gecontroleerd	Dr. J.F. Postma		07-10-05
goedgekeurd	Dr. J.F. Postma		

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

Inhoud

1.	Inleiding	1
2.	Uitvoering.....	3
2.1.	Uitgangspunten	3
2.2.	Onderzoekslocaties	4
2.3.	Stap 1: Screening activiteit van drie rwzi's en een actief slib monster.....	4
2.4.	Stap 2: Verdere focus op slibfractie	5
3.	Resultaten.....	7
3.1	Stap 1	7
3.2	Stap 2	8
4.	Discussie	13
4.1	Vergelijking met andere studies	13
4.2	Relevantie restactiviteit	14
4.3	Invloed type zuivering en slibleeftijd	14
4.4.	Vergelijking gemeten en theoretisch verwachte activiteit in het actief slib.....	15
5.	Conclusies en aanbevelingen	17
5.1.	Conclusies	17
5.2.	Aanbevelingen	18
6.	Referenties	19
	Bijlagen	21

1. Inleiding

Ter onderbouwing van kwaliteitseisen die in de aansluitvergunningen kunnen worden opgenomen heeft het waterschap Reest en Wieden onderzoek uitgevoerd naar verontreinigingen in het influent en effluent van de zuiveringsinstallaties. Hierbij is niet alleen gekeken naar 'reguliere' stoffen als stikstof en fosfaat maar onder andere ook naar zware metalen, bestrijdingsmiddelen en hormoonverstorende stoffen. In deze rapportage wordt het onderzoek naar hormoonverstorende stoffen beschreven.

Het onderzoek betreft een eerste verkenning van het voorkomen en de effecten van hormoonverstorende stoffen binnen het beheersgebied van Waterschap Reest en Wieden. Het onderzoek heeft zich uitsluitend gericht op stoffen die een vervrouwelikkend effect hebben. Deze stoffen worden ook wel oestrogene stoffen genoemd. Bij de uitvoering van het onderzoek is zo veel mogelijk aangesloten bij het STOWA-onderzoek 'Monitoringsonderzoek hormoon-verstorende stoffen en pathogenen in rwzi's'.

Om het beschikbare budget zo kosteneffectief mogelijk te kunnen besteden is het onderzoek stapsgewijs uitgevoerd. Daarnaast heeft de nadruk vooral op effectmetingen gelegen in plaats van op dure chemische analyses.

De onderzoeksvragen en uitgangspunten voor de twee stappen, alsmede de wijze van uitvoering worden toegelicht in hoofdstuk 2. De resultaten worden besproken in hoofdstuk 3 en bediscussieerd in hoofdstuk 4. De conclusies en aanbevelingen tenslotte staan in hoofdstuk 5.

2. Uitvoering

2.1. Uitgangspunten

Stapsgewijs

Om het beschikbare budget zo kosteneffectief mogelijk in te zetten is het onderzoek gefaseerd, in twee stappen, uitgevoerd zodat bij de invulling van stap 2 de resultaten van stap 1 mee hebben kunnen wegen.

Focus op effect

In eerste instantie is vooral gefocust op effectmetingen. Dit is kosteneffectief en relevant voor het ontvangende watermilieu. Bovendien, als er geen restactiviteit is, is verdere inspanning om deze terug te brengen niet relevant.

In tweede instantie zijn ook chemische metingen van hormoonverstorende stoffen in actief slib uitgevoerd. De inspanning is hierbij beperkt tot natuurlijke en synthetische hormonen omdat bekend is dat deze kwantitatief een belangrijke, zo niet de belangrijkste, bijdrage aan de hormoonverstorende activiteit leveren. Om dit te kunnen verifiëren is tevens een ER-calux meting op het extract voor de chemische analyse uitgevoerd.

Metingen in tweevoud

Alle metingen zijn in tweevoud uitgevoerd. Dit geeft een indicatie van de betrouwbaarheid van de resultaten en voorkomt toevalstreffers. Uitzondering vormt de chemische analyse van slib, vanwege budgettaire redenen.

Focus op bijdrage uit slib

Er is nog weinig bekend over hoe groot de bijdrage van nalevering van hormoonverstorende stoffen uit slib kan zijn, maar er zijn diverse aanwijzingen dat deze bijdrage waarschijnlijk niet verwaarloosbaar is (Vethaak *et al.*, 2002; STOWA, 2003; STOWA, 2005). Ook bij riooloverstorten kan veel slib uitspoelen naar het oppervlaktewater. Indien de condities zodanig veranderen dat het slib wordt afgebroken kunnen hieruit theoretisch weer hormoonverstorende stoffen vrij komen. Behalve influent en effluent zijn daarom voor een eerste indicatie van de bijdrage van slib ook monsters uit de actief slib tank onderzocht.

2.2. Onderzoekslakaties

Voor dit onderzoek zijn in overleg met het waterschap drie rwzi's geselecteerd:

- **Rwzi Steenwijk**
Dit betreft een BCFS zuivering (52.400 VE). Deze rwzi loost op water dat in verbinding staat met het natuurgebied de Weerribben. In de nabije toekomst zal op deze locatie een zandfiltratie-installatie geplaatst worden.
- **Rwzi Vollenhove**
Dit betreft een BCFS zuivering (16.000 VE). De rwzi loost op het Kadoelermeer. Voor dit meer gelden strengere lozingseisen.
- **Rwzi Echten**
Dit betreft een carrousel (132.350 VE). Op deze zuivering wordt het slib van 7 van de 9 rwzi's van het waterschap ontwaterd. Er wordt zowel uitgedist als aerobisch slib ontwaterd. De zuivering is de grootste in het beheersgebied van Reest en Wieden. Met ingang van 1 januari 2005 worden alle slibben van het waterschap op de rwzi Echten ontwaterd. Daarvoor werd het slib van de zuiveringen Steenwijk en Vollenhove extern ontwaterd.

2.3. Stap 1: Screening activiteit van drie rwzi's en een actief slib monster

De eerste stap is gericht op een screening van oestrogene effecten in het influent en effluent van de drie rioolwaterzuiveringsinstallaties door middel van de ER-calux assay.

In deze assay wordt gebruik gemaakt van een cellijn die na binding van vrouwelijke stoffen aan de receptor licht uitgaat. Hoe meer licht wordt uitgezonden, hoe groter het vrouwelijke effect. Deze extractie en de analyse van de monsters zijn uitgevoerd door het laboratorium BioDetection Systems. De extractie betreft een vloeistof-vloeistof extractie. Voor een uitgebreide methodebeschrijving wordt verwezen naar bijlage 1.

NB. In stap 1 is het zwevende stof slechts gedeeltelijk meegeëxtraheerd: de monsters zijn bezonken en vervolgens afgeschonken. De grote slibvlokken blijven daarbij achter terwijl fijner zwevend stof wordt meegeëxtraheerd. Vooral bij het influentmonster wordt hierdoor een gedeelte van de aan het slib gerelateerde activiteit gemist.

Behalve influent en effluent is bij de rwzi Steenwijk ook actief slib onderzocht. Op de zuivering Steenwijk treden incidenteel verhoogde concentraties onopgeloste bestanddelen in het effluent op door een overbelasting van de nabezinktank. Dit slib

komt in het oppervlaktewater terecht. In de toekomst zal bij deze zuivering een extra nabezinktank en een zandfilter worden gebouwd. Met dit zandfilter zal het grootste deel van de onopgeloste bestanddelen uit het effluent worden verwijderd.

In deze verkenning is voor een eerste indicatie van de bijdrage van slib een monster uit de actief slib tank onderzocht. De concentraties slib in het effluent zijn zodanig laag dat er grote hoeveelheden effluent moeten worden verzameld om voldoende slibmateriaal te verkrijgen. Actief slib is veel eenvoudiger te bemonsteren en het slib is naar verwachting in grote lijnen vergelijkbaar met het slib dat uitspoelt via het effluent.

In tabel 1 worden de uitgevoerde bemonsteringen samengevat. Elke lokatie is tweemaal bemonsterd, op 20 oktober 2004 en op 26 oktober 2004. De bemonstering is uitgevoerd door medewerkers van het waterschap conform de wijze beschreven in het monsternameprotocol dat gebruikt is voor het STOWA-onderzoek 'Monitoringsonderzoek hormoonversturende stoffen en pathogenen' (zie bijlage 2). De monsters zijn afgeleverd bij Grontmij|AquaSense in Amsterdam. Grontmij|AquaSense heeft verder zorg gedragen voor het conserveren, verder transporteren naar de laboratoria, verzamelen van de analyseresultaten, de interpretatie en de rapportage.

Tabel 1 Uitgevoerde bemonsteringen voor ER-calux metingen stap 1.

Monster	Steenwijk	Vollenhove	Echten
Influent	2	2	2
Effluent	2	2	2
Slib	2		
Monsters totaal	6	4	4

2.4. Stap 2: Verdere focus op slibfractie

In stap 2 is, op basis van de resultaten van stap 1, verder gefocust op de bijdrage van de slibfractie aan de gemeten (rest)activiteit. Hiertoe zijn de influent en effluent monsters zowel als geheel geëxtraheerd als na filtratie over een 0.45 µm nylon filter. Aangenomen wordt dat het verschil tussen beide activiteiten de met slib geassocieerde activiteit is.

Behalve influent en effluent zijn ook actief slib en rejectiewater van de slibontwatering bemonsterd. Een deel van het slib is onder anaerobe omstandigheden vergist. Het rejectiewater van de slibontwatering geeft daarom een eerste indicatie van wat er met het slib gebeurt onder anaerobe omstandigheden, of met andere woorden of er onder anaerobe omstandigheden weer hormoonversturende stoffen vrij komen.

Tevens is door middel van chemische analyses van natuurlijke en synthetische hormonen bepaald welke stoffen verantwoordelijk (kunnen) zijn voor de gemeten restactiviteit. Niet elke stof is even hormoonversturend. Aan de hand van de oestrogene potentie en de aangetroffen concentraties kan

berekend worden wat de theoretische bijdrage van elke individuele stof is. Op deze manier kan het waargenomen effect (in een op hetzelfde extract uitgevoerde ER-calux assay) theoretisch al dan niet verklaard worden. Ook wordt op deze wijze duidelijk welke stof de belangrijkste bijdrage levert aan het effect. De chemische analyses zijn uitgevoerd door het Instituut Voor Milieuvraagstukken in Amsterdam. De extractie betreft een Solid Phase Extractie. Voor details over de extractie en de chemische analyse wordt verwezen naar bijlage 3.

In tabel 2 worden de uitgevoerde bemonsteringen samengevat. Het onderzoek heeft plaatsgevonden op de rwzi Echten. De rwzi is tweemaal bemonsterd, op 28 februari 2005 en op 5 april 2005.

Tabel 2 Uitgevoerde bemonsteringen op rwzi Echten voor ER-calux metingen en chemische analyse in stap 2.

Monster	ER-calux gefiltreerd ¹	ER-calux ongefiltreerd ¹	Natuurlijke en synthetische hormonen + ER-calux ²
Influent	2	2	
Effluent	2	2	
Slib		2	1
Rejectiewater		2	
<i>Monsters totaal</i>	<i>4</i>	<i>8</i>	<i>1</i>

¹ vloeistof-vloeistofextractie

² SPE-extractie

3. Resultaten

3.1 Stap 1

Uit de reguliere metingen, die tegelijkertijd met de bemonstering voor de hormoonversturende stoffen hebben plaatsgevonden, blijkt dat de zuiveringen normaal functioneerden. In Vollenhove is op 20 oktober 4.4 mm regen gevallen. De resultaten van de reguliere bemonsteringen en analyses zijn opgenomen in bijlage 4. De rwzi Vollenhove is op 26 oktober 2004 niet regulier bemonsterd.

De resultaten van de ER-calux metingen staan in tabel 3. De resultaten worden uitgedrukt ten opzichte van de activiteit van het natuurlijke hormoon 17-beta oestradiol, in ng 17-beta oEstradiol EQuivalenten per liter (ng EEQ/l).

Tabel 3 Met behulp van de ER-calux gemeten oestrogene activiteit (vloeistof-vloeistof extractie). In ng EEQ/l tenzij anders vermeld. De standaarddeviatie in de meting bedraagt 1.2 tot 10%.

Locatie	Datum	Influent ongefiltreerd	Effluent ongefiltreerd	Actief slib (ng/kgds)	verwijdering (%)
Steenwijk	20-10-'04	78	<0.05 (0.03)	2918	>99.9
Steenwijk	26-10-'04	69	<0.05 (0.02)	3045	>99.9
Vollenhove	20-10-'04	58	0.14	-	99.8
Vollenhove	26-10-'04	67	0.15	-	99.8
Echten	20-10-'04	89	0.62	-	99.3
Echten	26-10-'04	70	0.46	-	99.3

De resultaten geven een eenduidig beeld. In het effluent van de rwzi Vollenhove en rwzi Echten is nog een restactiviteit meetbaar, terwijl in Steenwijk de concentratie in het effluent onder de Limit of Quantification ligt, d.w.z. zo laag is dat deze niet meer betrouwbaar te bepalen is. Het verwijderingsrendement ligt tussen de 99.3 en 99.9%.

De lichte regenval in Vollenhove op 20 oktober lijkt tot een iets lagere influentconcentratie te leiden, hetgeen conform de verwachting is aangezien het influent verdund is door regenwater. Er is geen noemenswaardig effect op de effluent concentratie en het verwijderingsrendement. Het is echter bekend dat het zuiveringsrendement afneemt bij regenwateraanvoer. Dit wordt in de huidige studie niet bevestigd.

Berekeningen op basis van resultaten stap 1

Met de gegevens is een indicatieve massabalans voor de rwzi Steenwijk opgesteld:

Via het influent komt dagelijks circa 10.500 ng per ve binnen (150 l per ve per dag * gemiddeld 70 ng EEQ/l). De dagelijkse slibproductie is 35 g ds per ve per dag. Indien de binnenkomende oestrogene activiteit volledig aan het geproduceerde slib zou binden, zou het slib een activiteit van 300.000 ng EEQ/kg hebben (10.500 ng per ve / 35 g ds per ve per dag). Hierbij wordt aangenomen dat de bindingsplaatsen van het reeds aanwezige slib volledig bezet zijn en dat de hoeveelheid activiteit die met het effluent uitspoelt verwaarloosbaar is (effluent <0,05 t.o.v. influent >70 ng/l). In het slib is echter een concentratie van circa 3.000 ng/kg gemeten. Dit is 1% van wat maximaal aan het slib zou kunnen binden.

De concentratie onopgeloste bestanddelen in het effluent van de rwzi Steenwijk bedraagt op de bemonsteringsdagen 14 en 19 mg/l. Uitgaande van een concentratie van onopgeloste bestanddelen en een concentratie in het slib van 3.000 ng/kg, d.w.z. 0.003 ng/mg wordt een effluentconcentratie verwacht van $15 * 0.003 = 0.045$ ng/l. Gezien de gemeten concentraties in het effluent (<0,05 ng/l) kan geconcludeerd worden dat de onopgeloste bestanddelen dus de belangrijkste bijdrage leveren aan de restactiviteit in Steenwijk. In deze zuivering lijkt het dan ook zinvol om verdere zuiveringsstappen concentreren op slib te concentreren. Voor de andere zuiveringen zijn in stap 1 geen concentraties in het slib gemeten en kan een dergelijke vergelijking niet gemaakt worden.

Dit duidt er op dat de hormoonontregelende stoffen grotendeels worden afgebroken (ca. 99%). Ongeveer 1% wordt opgenomen in het slib en een zeer kleine hoeveelheid (kwantitatief gezien) wordt met het effluent afgevoerd. De activiteit in het effluent lijkt hoofdzakelijk aan de slibfractie gebonden te zijn.

In stap 2 is nagegaan of deze bevindingen ook optreden op de rwzi Echten.

3.2 Stap 2

Uit de reguliere metingen, die tegelijkertijd met de bemonstering voor de hormoonversturende stoffen hebben plaatsgevonden, blijkt dat de zuivering normaal functioneerde ten tijde van de bemonstering. De resultaten van de reguliere bemonsteringen en analyses zijn opgenomen in bijlage 4. Tijdens de tweede bemonsteringsperiode (5 april 2004) is 4,8 mm regen gevallen.

De resultaten van de ER-calux metingen in stap 2 (vloeistof-vloeistof extractie) staan in tabel 5. In deze tabel is ook het verwijderingsrendement, zowel op basis van het totale gehalte als op basis van het opgeloste gehalte gegeven. Aangenomen wordt dat het verschil tussen activiteit in ongefiltreerde en

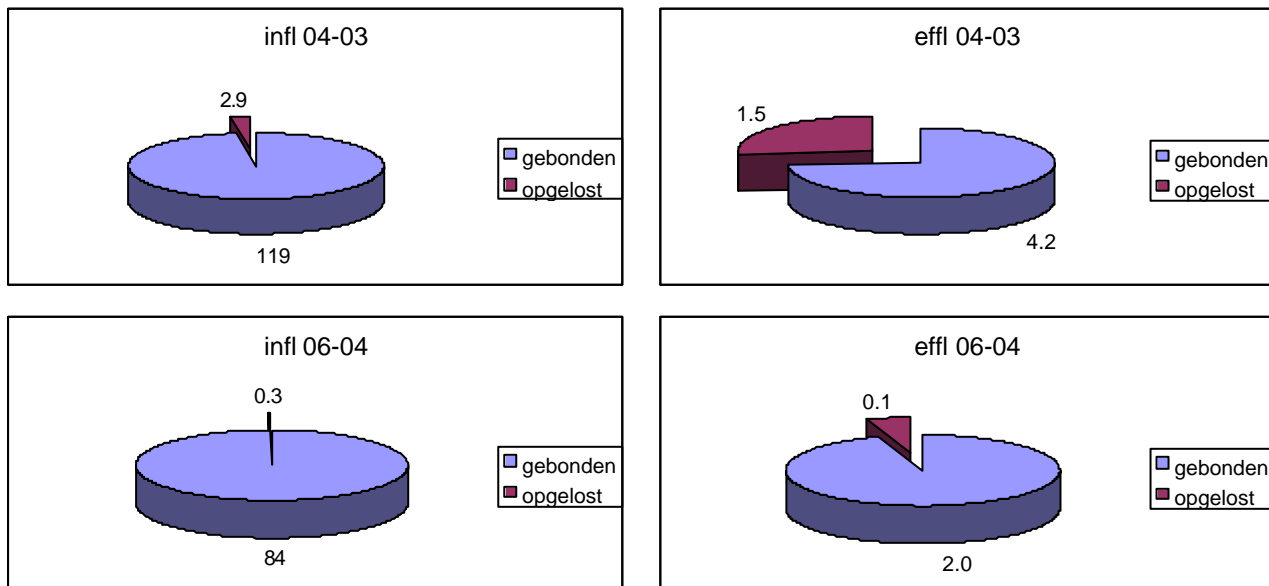
gefiltreerde monsters aan het slib is gebonden. Dit aandeel is in figuur 1 grafisch weergegeven.

Tabel 5 Gemeten oestrogene activiteit en het verwijderingsrendement in stap 2 (vloeistof-vloeistof extractie). In ng EEQ/l tenzij anders vermeld. LOQ = Limit Of Quantification (drie maal de detectielimiet). De standaarddeviatie in de meting bedraagt 0.9 tot 13.3%.

Monster	Activiteit	Verwijderings- rendement	Activiteit	Verwijderings- rendement
	(ng EEQ/l) 28-02-05		(ng EEQ/l) 05-04-05	
Influent ongefiltreerd	122		84	
Influent gefiltreerd	2.9		0.32	
Effluent ongefiltreerd	5.7	95.3 (totaal)	2.1	97.5 (totaal)
Effluent gefiltreerd	1.5	48.3 (opgelost)	<LOQ (0.11)	65.6 (opgelost)
Rejectiewater ongefiltreerd	14.6		21	
Actief slib	7132 ng/kgds		8180 ng/kgds	

De influentconcentraties en effluentconcentraties zijn in stap 2 hoger dan in stap 1. Dit is volgens de verwachting omdat in stap 1 het monster in behandeling is genomen nadat de grove delen waren bezonken. In stap 2 is het monster als geheel – inclusief grove delen – geëxtraheerd.

De hogere concentraties en de verschillen tussen de gefiltreerde en ongefiltreerde monsters bevestigen het vermoeden dat een groot deel van de activiteit met de slibfase is geassocieerd (zie figuur 1).



Figuur 1 Aandeel gebonden en opgeloste oestrogene activiteit in influent en effluent. De aangegeven oestrogene activiteit is in ng EEQ / l.

Ook voor de rwzi Echten is berekend of de restactiviteit is geassocieerd met het slib. Op 28 februari spoelde 13 mg/l zwevend stof uit. Uitgaande van een activiteit in het slib van

0.007 ng EEQ/mg zou dit een met slib geassocieerde effluentconcentratie van 0.09 ng EEQ/l betekenen. In het ongefiltreerde effluent is echter 5.7 ng EEQ/l gemeten, waarvan 1.5 ng EEQ/l opgelost. De overige 4.2 ng EEQ/l is echter veel hoger dan de berekende 0.09 ng EEQ/l. Voor 5 april geldt hetzelfde: op basis van 5 mg/l zwevend stof en een slibconcentratie van 0.008 ng EEQ/mg is in het effluent 0.04 ng EEQ/l met slib geassocieerd. Dit is veel lager dan de gemeten 2.0 ng EEQ/l.

Een goede verklaring voor het verschil is nog niet gevonden. Meer metingen zijn daarvoor noodzakelijk.

Bij lichte regenval (op 06-04-05) blijkt de activiteit in zowel influent als effluent lager. Voor het influent is dit conform de verwachting aangezien dit verdund is door regenwater. Het is echter bekend dat het zuiveringsrendement afneemt bij regenwateraanvoer. Dit wordt in de huidige studie niet bevestigd.

De resultaten van de chemische analyse en de ER-calux assay op SPE-extracten van het actief slib van rwzi Echten staan in tabel 6. De concentraties in tabel 6 zijn gecorrigeerd voor de recovery, op basis van interne standaarden die voorafgaand aan de extractie zijn toegevoegd. Bij de bereiding van het extract voor de ER-calux assay is geen interne standaard toegevoegd omdat dit zou storen in de test. De concentraties waaraan de cellijn in deze test is blootgesteld zijn de werkelijk concentraties in het extract. Omdat de recovery <100% is, zijn deze lager dan in tabel 6 gepresenteerd.

Tabel 6 Resultaten van de metingen van een aantal hormoonverstorende stoffen en de oestrogene activiteit in actief slib van rwzi Echten. De gehalten zijn gecorrigeerd voor de recovery van toegevoegde interne standaarden.

Parameter	Concentratie (ng/gds)	Recovery (%)
Bisfenol A	<8.3	¹
17-alfa oestradiol	4.5	(29) ²
Oestron	18	10
17-beta oestradiol	12	29
17-alfa ethinyloestradiol	<0.8	(29) ²
Oestriol	<0.4	¹
Activiteit in ER-calux (ng EEQ/gds)	3.59	n.v.t.

¹ Bisfenol A en oestriol zijn waarschijnlijk verloren gegaan in de extractie stap (de fractie met deze stoffen is niet opgevangen in de clean-up stap). In een meegenomen gespiked sediment zijn deze stoffen ook niet teruggevonden.

² Aangenomen wordt dat de recovery van 17-alfa oestradiol en 17-alfa ethinyloestradiol gelijk is aan die van 17-beta oestradiol.

In het actief slib zijn de natuurlijke hormonen 17-alfa oestradiol, 17-beta oestradiol en oestron aangetroffen. Het synthetische hormoon 17-alfa ethinyloestradiol, de stof bisfenol A en het

natuurlijke hormoon oestriol konden niet worden aangetoond. Hierbij moet worden opgemerkt dat bisfenol A en oestriol waarschijnlijk verloren zijn gegaan in de extractie stap, dat wil zeggen dat de fractie met deze stoffen niet opgevangen is in de clean-up stap door middel van HPLC fractionering (zie bijlage 3 voor details over de extractiemethode). In een meegenomen gespiked sediment zijn deze stoffen ook niet teruggevonden. Tevens dient opgemerkt te worden dat de recovery in het actief slib erg laag (10 – 29%) is. In tegelijkertijd meegenomen standaard monsters (zeezand en een natuurlijk sediment) werden voor 17-alfa oestradiol, 17-beta oestradiol, oestron en 17-alfa ethinyloestradiol wel hoge recoveries (89 – 125%) gemeten.

De activiteit in het slib in het SPE-extract (tabel 6) is ongeveer de helft lager is dan gemeten in het vloeistof-vloeistof extract (tabel 5) in hetzelfde monster. De meest waarschijnlijke verklaring hiervoor is het verschil in extractiemethode. Bij SPE-extractie wordt een deel van het monster afgevangen op het filter. Bij vloeistof-vloeistof extractie is dit niet het geval. Deze laatste geeft dan ook altijd een hogere activiteit.

Op basis van de gemeten gehalten en de verschillen in oestrogene potentie kan berekend worden hoeveel de stoffen theoretisch bijdragen aan de gemeten activiteit in de ER-calux assay. De resultaten van deze berekening staan in tabel 7. De oestrogene potentie wordt uitgedrukt ten opzichte van 17-beta oestradiol in de oEstradiol Equivalent Factor (EEF) (Legler et al., 2002, 2004; Houtman et al., 2004). Deze factor is gebaseerd op molariteit. Er is gerekend met gehalten die niet gecorrigeerd zijn voor de recovery, omdat in de ER-calux assay ook niet wordt gecorrigeerd voor recovery. Stoffen met een hoge oestrogene potentie, zoals ethinyloestradiol, kunnen ook in gehalte onder de detectielimiet bijdragen aan de oestrogene activiteit. Er is daarom een minimale en een maximale theoretische activiteit uitgerekend, respectievelijk exclusief en inclusief de bijdrage van ethinyloestradiol.

Tabel 7 Berekende theoretische activiteit in de ER-calux. EEF = oEstradiol Equivalent Factor op basis van molariteit.

Parameter	EEF	Theoretische activiteit o.b.v. niet gecorr. gehalten (ng EEQ/gds)
Bisfenol A	$1.13 \cdot 10^{-5}$	-
17-alfa oestradiol	0.01	0.01
Oestron	0.12	0.22
17-beta oestradiol	1	3.48
17-alfa ethinyloestradiol	1.12	<0.24
Oestriol	0.13	-
Activiteit in ER-calux (ng EEQ/gds)		Minimaal 3.71 Maximaal 3.95

De berekende activiteit (tabel 7) blijkt goed overeen te komen met de gemeten activiteit (tabel 6). Veruit de belangrijkste bijdrage aan de activiteit wordt geleverd door 17-beta oestradiol. Ook oestron draagt nog in enige mate bij. De maximale bijdrage van ethinyloestradiol is vergelijkbaar met die van oestron.

4. Discussie

4.1 Vergelijking met andere studies

In tabel 4 wordt ter vergelijking een overzicht gegeven van oestrogene activiteiten zoals gemeten in Nederlandse rwzi's, afkomstig uit diverse literatuurbronnen.

Tabel 4 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 styreendivinybenzeen polymeer.

Referentie	Extractie-methode	Influent	Effluent	Actief slib (ng/kgds)	Verwijdering (%)
Deze studie stap 1	Liquid / liquid na bezinken	58 – 89 n=6	<0.05 - 0.64 n=6	2918 – 3064 n = 2	99.3 - >99.9
Deze studie stap 2	Liquid / liquid ongefiltreerd	84 – 122 n=2	2.1 – 5.7 n=2	7132 – 8180 n=2	95.3 – 97.5
Deze studie stap 2	SPE			3586 n=1	
Vethaak <i>et al.</i> (2002)	Liquid / liquid	38 – 3264 n=5	-	-	-
Vethaak <i>et al.</i> (2002)	Gefiltr., SDB disks	27 – 109 n=?	1.2 – 5.7 n=?	789 – 1740 n=?	-
Vethaak <i>et al.</i> (2002)	Ongefiltr., SPE	0.64 – 75 n=12	<d.l. – 0.61 n=10	-	88 – 99.9
Vethaak <i>et al.</i> (2002)	Ongefiltr., SPE	3.8 – 52 n=5	-	-	-
STOWA (2003)	?	1.1 – 120 n=12	0.03 – 16 n=12	-	90 - 95
STOWA (2005)	SPE	9.1 – 71 n=12	0.18 – 5.2 n=20	-	89.7 – 98.0

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. In het actief slib van rwzi Echten is het verschil een factor 2. Uit de recovery van de interne standaarden, die bij de SPE extractie ten behoeve van de chemische analyses zijn toegevoegd, kan worden afgeleid dat de SPE extractie voor actief slib (nog) niet optimaal was.

De in de huidige studie gemeten oestrogene activiteit in de influenten en effluenten ligt binnen de ranges die in andere

onderzoeken zijn gemeten. Het verwijderingsrendement in stap 1 ligt echter hoger dan in andere onderzoeken en is zonder meer goed te noemen. Er dient daarbij gerealiseerd te worden dat met name de activiteit in het influent een onderschatting van de werkelijke activiteit betreft, doordat de bezonken delen niet mee zijn geëxtraheerd. De werkelijke verwijderingsrendementen in stap 1 zijn dus nog hoger.

4.2 Relevantie restactiviteit

In de effluenten is in bijna alle gevallen nog steeds een restactiviteit meetbaar in de ER-calux assay. Deze varieert van <0.05 tot 5.7 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). De gemeten *in vitro* activiteit in de ER-calux assay is echter moeilijk door te vertalen naar *in vivo* effecten bij waterorganismen omdat zowel de effectconcentraties als de oestrogene potentie in organismen verschilt van die in de ER-calux assay. Op basis van deze PNEC is een oestrogeen effect van het effluent vooralsnog niet uit te sluiten.

Hoewel het niet in alle gevallen mogelijk is een eenduidige massabalans op te stellen, lijkt de restactiviteit grotendeels geassocieerd te zijn met de slibfractie. Deze slibfractie zal gedurende langere tijd in het milieu aanwezig zijn en daar mogelijk voor nalevering zorgen.

4.3 Invloed type zuivering en slibleeftijd

De rwzi in Echten (Carrousel) lijkt op basis van stap 1 iets minder goed te functioneren qua verwijdering van oestrogene activiteit dan de BCFS installaties, hoewel de zuiveringsrendementen vergelijkbaar zijn met andere conventionele zuiveringen.

rejectiewater

Op de rwzi Echten is door de aanwezige slibontwatering sprake van een 'interne' belasting door de terugvoer van rejectiewater vanuit de slibontwatering. De oestrogene activiteit die met het rejectiewater wordt teruggevoerd in de zuivering blijkt echter verwaarloosbaar ten opzichte van de oestrogene activiteit die via het influent de zuivering binnenkomt.

Dagelijks wordt ca. 500 m³ rejectiewater teruggevoerd. Dit komt overeen met ca. 0.01 g EEQs/dag. Het influent komt met meer dan 1000 m³ per uur binnen (ca. 20.000 m³/dag). Dit komt overeen met meer dan 2 g EEQs/dag. Extra toevoer via het rejectiewater vormt dus geen verklaring voor een lager zuiveringsrendement.

procescondities

Op de rwzi's in Vollenhove en Steenwijk worden zeer hoge zuiveringsrendementen voor hormoonverstorende stoffen gehaald. Deze zuiveringen zijn beiden BCFS installaties. Een BCFS installatie wordt gekenmerkt door compartimentering en zodanige uitvoering van de retourstromen dat per compartiment sterk verschillende procescondities optreden van anaeroob (-300 mV) tot aerob (2,5 mg O₂/l).

Dit in tegenstelling tot zuiveringen van het type Carroussel (zoals in Echten) waarin geleidelijke zuurstofgradiënten voorkomen (in Echten tot 1,7 mg O₂/l) en slecht in beperkte mate anaerobie optreedt (indien een contacttank of 'anaerobe' tank is voorgeschakeld).

slibleeftijd

Verder worden BCFS installaties gekenmerkt door een relatief lage slibproductie wat leidt tot een relatief hoge slibleeftijd. Door een hoge slibleeftijd krijgen geadsorbeerde stoffen meer tijd om af te breken en kunnen langzamer groeiende organismen zich ook in het actiefslibstelsel handhaven.

De BCFS installatie Steenwijk heeft een vrij lage slibbelasting van 0,035 g BZV/ g droge stof en een slibleeftijd van 27 dagen. De Carroussel in Echten heeft juist een hoge slibbelasting van 0,072 g BZV / g droge stof.d (overbelast) en daardoor een vrij korte slibleeftijd van 14 dagen.

De langere verblijftijd van het slib en de sterk verschillende procescondities waaraan de stoffen in een BCFS installatie worden blootgesteld lijken het zuiveringsrendement ten goede te komen. Op basis van de resultaten kan geen conclusie getrokken worden welk proces de grootste invloed heeft op het zuiveringsrendement.

Omdat een groot deel van de restactiviteit in de slibfractie zit, wordt verwacht dat het zuiveringsrendement verder verbeterd kan worden door de slibfractie af te vangen.

4.4. Vergelijking gemeten en theoretisch verwachte activiteit in het actief slib

De activiteit berekend op basis van de in het slib gemeten hormoonverstorende stoffen blijkt goed overeen te komen met de gemeten activiteit. De activiteit in het slib kan vrijwel geheel verklaard worden op basis van de concentratie 17-beta oestradiol. In mindere mate draagt ook oestron bij. Ethinyloestradiol kan ook onder de detectielimiet nog een bijdrage leveren die vergelijkbaar is met die van oestron. Een bijdrage van andere, onbekende stoffen aan de gemeten oestrogene activiteit in het actief slib kan niet aannemelijk gemaakt worden.

5. Conclusies en aanbevelingen

5.1. Conclusies

- In het influent is een oestrogene activiteit gemeten van 58 – 89 ng EEQ/l (na bezinken) of 84 – 122 ng EEQ/l. Deze activiteit lijkt vrijwel volledig geassocieerd met de slibfractie.
- Ondanks verschillen in de extractiemethode lijken deze influentgehalten in dezelfde ordegrrootte te liggen als in andere onderzoeken.
- De gemeten verwijderingsrendementen zijn hoog (95.3 - 99.9%). Het rendement ligt boven in de range die in andere onderzoeken zijn gemeten.
- In de effluënten is echter in bijna alle gevallen nog steeds een restactiviteit meetbaar (<0.05 tot 5.7 ng EEQ/l). Op basis van de Predicted No Effect Concentration voor 17 beta oestradiol van 1 ng/l is een oestrogeen effect van het effluent niet uit te sluiten.
- De restactiviteit lijkt met name geassocieerd met de slibfractie.
- De gehalten in het actief slib lijken te verschillen per zuivering (ca. 3.000 ng/kgds in Steenwijk en ca. 8.000 ng/kgds in Echten). In de BCFS installatie van Steenwijk vindt verdergaande afbraak plaats dan in de Caroussel van de rwzi Echten. Mogelijke oorzaken zijn de gunstigere condities in het BCFS proces en de hogere slibleeftijd.
- De hoeveelheid oestrogene activiteit die met het rejectiewater wordt teruggeleid naar de zuivering is verwaarloosbaar ten opzichte van de hoeveelheid die via het influent de zuivering in komt.
- De berekende activiteit in actief slib van de rwzi Echten komt goed overeen met de gemeten activiteit en kan vrijwel geheel verklaard worden op basis van de concentratie 17-beta oestradiol. In mindere mate draagt ook oestron bij. Ethinyloestradiol kan ook onder de detectielimiet nog een bijdrage leveren. Een bijdrage van andere, onbekende stoffen aan de gemeten oestrogene activiteit in het actief slib kan niet aannemelijk gemaakt worden. Dit betekent dat de gevonden effecten met name veroorzaakt worden door natuurlijke vrouwelijke hormonen. Ook het synthetische hormoon uit 'de pil' kan een bijdrage leveren. Oestrogene stoffen vanuit andere bronnen, zoals industriële lozingen, schoonmaakmiddelen of weekmakers, lijken geen of een ondergeschikte rol te spelen.

5.2. Aanbevelingen

De rol van zwevend stof in de gemeten oestrogene activiteit in influent en effluent is nog nauwelijks onderzocht. De uitgevoerde studie geeft duidelijke indicaties dat het overgrote deel van de oestrogene activiteit in influent en effluent is geassocieerd met de slibfractie (zwevend stof). Dit aspect verdient nader onderzoek.

De restactiviteit in het effluent is milieurelevant. Verdere inspanning om de oestrogene activiteit in het terug te dringen lijkt daarom gewenst. Voor de korte termijn wordt het verder verbeteren van het zuiveringsrendement als het meest kansrijk gezien. Omdat een groot deel van de restactiviteit in de slibfractie lijkt te zitten, wordt verwacht dat het zuiveringsrendement verder verbeterd kan worden door de slibfractie af te vangen. Dit voorkomt ook dat in het ontvangende oppervlaktewater nalevering uit slib kan plaatsvinden. Ook kan gedacht worden aan andere aanvullende zuiveringstechnieken. Zo is bijvoorbeeld behandeling met ozon bijzonder effectief gebleken om hormonen te verwijderen (Ternes et al., 2004).

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, het apart houden en behandelen van afval(water)stromen en dergelijke. Ook is het terugdringen van het aantal riooloverstorten en het voorkomen van verdunning van rioolwater wenselijk. 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.

Het wordt aanbevolen voor de middellange en lange termijn aan te sluiten bij landelijke initiatieven.

6. Referenties

- Houtman, C.J., Oostveen, A.M. van, Brouwer, A., Lamoree, M.H. & Legler, J. (2004). Identification of estrogenic compounds in fish bile with bioassay directed fractionation. *Environmental Science & Technology* 38, 6415-6423.
- Legler, J., Jonas, A., Lahr, J., Vethaak, A.D., Brouwer, A & 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 & Chemistry* 21(3), 473-479.
- Legler, J. & Hopman-Ubbels, G. (2004). ACE project annual report 2003. Unpublished results.
- STOWA (2003). Verwijdering van hormoonverstorende stoffen in rioolwaterzuiveringsinstallaties. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Utrecht. Rapportnummer 2003-15.
- STOWA (2005). Monitoring hormoonverstoorders en pathogenen in rwzi's. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), Utrecht. Rapportnummer 2005-XX.
- Ternes, T.A., M.-L. Janex-Habibi, T. Knacker, N. Kreuzinger & H. Siegrist (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 1st, 2001 – June 30th, 2004. POSEIDON project, contract no. EVK1-CT-2000-00047.
- Vethaak, A.D., G.B.J. Rijs, S.M. Schrap, H. Ruiter, A. Gerritsen & J. Lahr (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands. Occurrence, Potency and Biological Effects. Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA) and Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ). RIZA/RIKZ-report no. 2002.001.

Bijlagen

Bijlage 1 Methodebeschrijving ER-calux assay

De ER-CALUX assay werd uitgevoerd met de humane borstkanker T47D cellijn waarin van nature een oestrogen receptor aanwezig is. In de cel is een reporter gen (ERE) aangebracht, die 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.

De monsters zijn driemaal geëxtraheerd met methyl-tert-butylether (1 deel oplosmiddel op 5 delen monster). Deze extracten zijn samengevoegd, ingedampt (N_2 , $37^\circ C$) en overgebracht naar 50 μl DMSO. De actief-slibmonsters zijn voor extractie gedroogd, waarna ze zijn geëxtraheerd met behulp van de ASE (methanol). Na extractie zijn de actief-slibextracten gedroogd en gefilterd over $NaSO_4$ en overgebracht naar 500 μl 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 resultaten worden uitgedrukt t.o.v. het natuurlijke oestrogene hormoon 17β -oestradiol, als oestradiol equivalenten (ng EEQ/l). Hiertoe wordt bij elke serie analyses een calibratiecurve met 17β -oestradiol meegenomen.

De analyse is uitbesteed aan het laboratorium van Bio Detection Systems te Amsterdam waar de ER-CALUX als standaardanalyse wordt uitgevoerd.

**Bijlage 2 Monsternameprotocol uit STOWA (2005)
(exclusief bijbehorende bijlages)**

Monitoring hormoonverstoorders en pathogenen bij rwzi's

1. Achtergrond en doelstelling

Uit verschillende onderzoeken in de afgelopen jaren is naar voren gekomen dat hormoonverstorende stoffen¹ effecten kunnen veroorzaken bij organismen in het oppervlaktewater. Zo is van bepaalde stoffen aangetoond dat zij bij mannelijk vissen vrouwelijke kenmerken te weeg kunnen brengen. Hormoonverstorende stoffen komen voor een belangrijk deel via effluenten van RWZI's in het oppervlaktewater terecht.

Hormoonverstorende stoffen staan dan ook volop in de belangstelling. De STOWA onderkent dit en heeft meerdere onderzoeken laten uitvoeren om de gezonde onrust te toetsen en de omvang te inventariseren. Zo verscheen in 2003 verscheen het STOWA-rapport "Verwijdering van hormoonverstorende stoffen in RWZI's". Dit rapport informeert over de verwijdering van hormoonverstorende stoffen in conventionele en geavanceerde zuiveringssystemen in het licht van de huidige en toekomstige Nederlandse zuiveringspraktijk. Momenteel wordt een monitoringsprotocol opgesteld waarin standaard analyses en meetmethoden zullen worden aanbevolen, zodat toekomstige onderzoeksresultaten beter vergelijkbaar worden. Een monitoringsonderzoek bij een aantal Nederlandse RWZI's is voor de STOWA de vervolgstap.

Ook is de mogelijkheid onderzocht om pathogenen te monitoren. Deze groep staat in de belangstelling vanwege de herziening van de Europese zwermtwaterrichtlijn. Besloten is om enkele (indicatoren voor) fecale verontreiniging en pathogenen mee te nemen in het monitoringsonderzoek.

Bij dit onderzoek worden diverse zuiveringssystemen betrokken die tegenwoordig in de belangstelling staan voor het bereiken van een verbeterde effluentkwaliteit, zoals de membraanbioreactor (MBR), zandfiltratie, nageschakelde membraanfiltratie en helofytenfilters. Het onderzoek focust zich voornamelijk op de vraag in hoeverre een aanvullende zuiveringstechniek een verbetering van de effluentkwaliteit te weeg brengt.

2. Monitoringsprogramma

2.1 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, NH₄, NO₃, NKj, PO₄ en P_{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

¹ Hormoonverstorende stoffen worden ook wel eens EDC's (Endocrine Disrupting Chemicals) genoemd.

uitgevoerd kunnen worden. Indien dit niet het geval is wordt u verzocht contact op te nemen met mevrouw Derksen van 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 detergenten. De meting beperkt zich tot die alkylfenol(ethoxylat)en met de grootste hormoonversturende 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 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 paragraaf 3).

Tabel 1: Metingen in het kader van het monitoringsprogramma hormoonverstoorders en pathogenen in rwzi's.

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

2.2 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 debietsproportionele 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.
- Monsternamen van schoon naar vuil, dus eerst effluent bemonsteren en van daaruit naar influent werken.

2.3 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 bevindt.

De codes voor de door externe laboratoria uit te voeren analyses worden verklaard in tabel 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 schematische voorstellingen in de bijlage 1):

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

Voor een overzicht van de monstercodes die voor uw lokatie relevant zijn wordt verwezen naar bijlage 2.

3. Werkverdeling

In tabel 2 wordt de werkverdeling samengevat.

Tabel 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.

4. Adressen

Coördinatie:

AquaSense
Mevrouw J.G.M. (Anja) Derksen
Postbus 95125
1090 HC Amsterdam
Tel: 020 – 592 22 44
Fax: 020 – 592 22 49
Email: anja.derksen@aquasense.nl

Voor **specifieke vragen** die betrekking hebben op de **indicatoren** voor fecale verontreiniging en pathogenen kunt u contact opnemen met:

Grontmij
Mevrouw E.J.T.M. (Imke) Leenen
Postbus 119
3990 DC Houten
Tel: 030-6344788/06-51104626
Fax: 030-6381429
Email: imke.leenen@grontmij.nl

Ontvangst en verder transport monsters voor analyse hormoonverstoorders (code HORM, ALKYL en CALUX):

AquaSense
Mevrouw J.G.M. (Anja) Derksen
Kruislaan 411A
1098 SJ Amsterdam
Tel: 020 – 592 22 44
Fax: 020 – 592 22 49
Email: anja.derksen@aquasense.nl

Ontvangst monsters en analyses indicatoren voor fecale verontreinigingen en pathogenen (code COLI, FAAG en CAMP):

Het Waterlaboratorium
De heer H. Spiering of mevrouw M. van Maren
J.W. Lucasweg 2
2031 BE Haarlem
Tel: 023-5175948 (dhr. Spiering) of 023- 5175970 (mevr. van Maren)
Email: hans.spiering@hetwaterlaboratorium.nl /
marloes.vanmaren@hetwaterlaboratorium.nl

Bijlage 3 Methodebeschrijving extractie en chemische analyse natuurlijke en synthetische hormonen

De natuurlijke en synthetische hormonen zijn gemeten door het Instituut voor Milieuvraagstukken in Amsterdam. Al deze stoffen zijn opgenomen in één analysepakket, waarin ook bisfenol A wordt meegenomen. Het analysepakket bestaat uit de volgende stoffen:

- 17 alfa-oestradiol
- 17 beta-oestradiol (E2)
- oestron (E1)
- oestriol (E3)
- 17 alfa-ethinyloestradiol (EE2)
- bisfenol A (BPA)

De monstervoorbewerking voor de chemische analyse en de ER-calux assay hebben een grotendeels identiek 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 uit te voeren.

De monsters zijn eerst gevriesdroogd, waarna extractie heeft plaatsgevonden met Accelerated Solvent Extraction (ASE), gevolgd door gelpermeatiechromatografie (GPC). Voor een eerste cleanup wordt gebruik gemaakt van C₁₈/NH₂ cartridges, waarna uitsluitend voor de hormoonanalyse een verdere opzuivering wordt gedaan met behulp van reversed phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) met een C₁₈ kolom. De analyse heeft plaatsgevonden met gaschromatografie, gekoppeld met ion trap detectie (GC-ITD).

Aan de monsters voor de chemische analyse zijn gedeutereerde interne standaarden toegevoegd ten behoeve van de bepaling van de recovery. Aan de monsters voor de ER-calux assay zijn geen interne standaarden toegevoegd omdat deze stoffen in de bepaling.

Bijlage 4 Analyseresultaten reguliere influent- en effluentbemonsteringen

RWZI Vollenhove												
influent												
Datum	ss mg/l	Zuurgraad (pH)	CZV mg/l	BZV mg/l	N-Kj mg N/l	Cl mg/l	P totaal mg P/l	Debiet m3/d				
20/okt/04	551	7.6	1030	350	69.8		14	1170				
effluent												
Datum	ss mg/l	CZV mg/l	BZV mg/l	N-Kj mg/l	NH-N mg N/l	NO2/NO3 mg N/l	ortho-P mg P/l	Cl mg/l	SO4 mg/l	P-totaal mg P/l	Debiet m3/d	Neerslag mm
20/okt/04	6	39	3	1.9	0.1	4.1	0.04	135	46	0.22	1170	4.4

RWZI Steenwijk												
influent												
Datum	ss mg/l	Zuurgraad (pH)	CZV mg/l	BZV mg/l	N-Kj mg N/l	Cl mg/l	P totaal mg P/l	Debiet m3/d	Neerslag mm			
20/okt/04	131	7.8	300	95	48.2		7.6	6165	0.1			
26/okt/04	99	7.6	275	83	38.1		6.1	8055	0.1			
effluent												
Datum	ss mg/l	CZV mg/l	BZV mg/l	N-Kj mg/l	NH-N mg N/l	NO2/NO3 mg N/l	ortho-P mg P/l	Cl mg/l	SO4 mg/l	P-totaal mg P/l	Debiet m3/d	Neerslag mm
20/okt/04	19	41	6	2.5	0.14	4.9	0.08	81	39	0.8	6165	0.1
26/okt/04	14	36	4	1.7	0.1	3.3	0.18	34	24	0.81	8055	0.1

RWZI Echten												
influent												
Datum	ss mg/l	Zuurgraad (pH)	CZV mg/l	BZV mg/l	N-Kj mg N/l	P totaal mg P/l	Debiet m3/d					
20/okt/04	414	7.6	755	300	56.2	14	21052					
26/okt/04	308	7.3	715	330	47.8	13	25882					
28/feb/05	384	7.6	850	310.0	51.9	17	20465					
05/apr/05	355	7.4	690	160	48.6	13	31255					
effluent												
Datum	ss mg/l	CZV mg/l	BZV mg/l	N-Kj mg/l	NH-N mg N/l	NO2/NO3 mg N/l	ortho-P mg P/l	Cl mg/l	SO4 mg/l	P-totaal mg P/l	Debiet m3/d	Neerslag mm
20/okt/04	7	37	2	6.10	4.70	1.03	0.94	110	53	1.20	21052	0.09
26/okt/04	4	32	2	3.30	2.50	0.70	0.67	71	29	0.79	25882	0.60
28/feb/05	13	52	3	3.20	0.96	4.00	0.66	185	43	0.95	20465	0.10
05/apr/05	5	51	3	5.00	3.20	0.74	1.00	155	56	1.20	31255	4.80