



Mogelijke effecten van geneesmiddelen in effluent op aquatische organismen

Alterra-rapport 2338
ISSN 1566-7197

I. Roessink, G. Fait, J.D.M. Belgers en M.C. Boerwinkel

Mogelijke effecten van geneesmiddelen in effluent op aquatische organismen

Mogelijke effecten van geneesmiddelen in effluent op aquatische organismen

I. Roessink, G. Fait, J.D.M. Belgers en M.C. Boerwinkel

Alterra-rapport 2338

Alterra, onderdeel van Wageningen UR
Wageningen, 2012

Referaat

Roessink, I., G. Fait, J.D.M. Belgers en M.C. Boerwinkel, 2012. *Mogelijke effecten van geneesmiddelen in effluent op aquatische organismen*. Wageningen, Alterra, Alterra-rapport 2338. 46 blz.; 10 fig.; 5. tab.; 30 ref.

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van het waterschap Regge en Dinkel. In dit onderzoek wordt met de beschikbare internationale literatuur en een experimentele studie onderzocht of er mogelijke effecten op populaties van aquatische organismen te verwachten zijn van geneesmiddelen in effluent van waterzuiveringsinstallaties. De gevonden resultaten in de testsystemen laten zien dat met uitzondering van Sulfamethoxazole en Bisphenol A de geneesmiddelen in het testmedium onder de gebruikte testcondities niet persistent zijn. Er kon geen negatieve impact van het geteste effluent op populaties van watervlooien, waterpissebedden, wormen, slakken en waterplanten aangetoond worden. Het effluent had echter wel een stimulerend effect op de populatiedichtheden van deze waterorganismen. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door de hoge voedselbeschikbaarheid (nutriënten; organisch materiaal) in het effluent.

Trefwoorden: effluent, geneesmiddelen, effecten, aquatische organismen.

Foto omslag: Waterzuivering WRL te Tiel (Fabrice Ottburg)

Overige foto's gemaakt door Ivo Roessink

ISSN 1566-7197

Dit rapport is gratis te downloaden van www.alterra.wur.nl (ga naar 'Alterra-rapporten'). Alterra Wageningen UR verstrekt geen gedrukte exemplaren van rapporten. Gedrukte exemplaren zijn verkrijgbaar via een externe leverancier. Kijk hiervoor op www.rapportbestellen.nl.

© 2012 Alterra (instituut binnen de rechtspersoon Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek)
Postbus 47; 6700 AA Wageningen; info.alterra@wur.nl

- Overname, verveelvoudiging of openbaarmaking van deze uitgave is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.
- Overname, verveelvoudiging of openbaarmaking is niet toegestaan voor commerciële doeleinden en/of geldelijk gewin.
- Overname, verveelvoudiging of openbaarmaking is niet toegestaan voor die gedeelten van deze uitgave waarvan duidelijk is dat de auteursrechten liggen bij derden en/of zijn voorbehouden.

Alterra aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Alterra-rapport 2338

Wageningen, juni 2012

Inhoud

Samenvatting	7
1 Inleiding	9
1.1 Waterbeheer	9
1.2 Mogelijke effecten in het aquatische milieu	9
1.3 Onderzoeksvraag en hypothese	11
2 Experiment	13
2.1 Opzet	13
2.2 Data analyse	16
3 Resultaten	17
3.1 Karakterisering testcondities	17
3.2 Geneesmiddelen-concentraties	17
3.3 Respons test organismen	20
3.4 Respons waterkwaliteitsparameters en chlorofyl-A	24
4 Discussie en conclusie	27
Dankwoord	31
Referenties	33
Bijlage 1 Overzicht chemische analyse	35
Bijlage 2 Testorganismen per testsysteem	39
Bijlage 3 Resultaten statistiek	43

Samenvatting

Recent onderzoek van waterschap Regge en Dinkel toont aan dat in het effluentwater van enkele van haar rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI) meer (rest)geneesmiddelen achterblijven dan voorheen gedacht werd. Hierbij valt op dat enkele van deze nieuw gedetecteerde stoffen (metformine, guanylurea, metoprolol, sotalol, etenolol, valsartan, irbersartan, hydrochloorthiazide, diclofenac, carbamazepine) in opvallend hogere concentraties (ordegrootte $\mu\text{g/L}$) voorkomen dan de residuen van andere geneesmiddelen (ordegrootte ng/L). Omdat niet bekend is of deze nieuw-gedetecteerde stoffen mogelijk negatieve effecten op het onderwaterleven hebben, heeft waterschap Regge en Dinkel bij Alterra een oriënterend onderzoek uitgezet.

Hoewel over het algemeen voor de meeste individuele geneesmiddelen die goed onderzocht zijn geldt dat de concentraties waarbij effecten op waterorganismen in het laboratorium worden waargenomen hoger zijn dan de concentraties die in het oppervlaktewater of effluent gemeten worden, kunnen mogelijke effecten niet uitgesloten worden. Deze onzekerheid komt vooral door de geringe beschikbaarheid van acute toxiciteitsdata voor niet-standaard soorten en de schaarste aan chronische toxiciteitgegevens voor zowel standaard als niet-standaard soorten. Het is mogelijk dat bij een constante aanvoer van concentraties die in kortdurende testen geen direct negatief effect hebben op de standaard toetsorganismen, er wel effecten optreden bij andere organismen (die taxonomisch verder van deze standaard toetsorganismen afstaan) of dat er subtiele effecten optreden die pas tijdens de voortplanting tot uiting komen (chronische effecten), en zo populaties nadelig beïnvloeden.

De vraag die in dit onderzoek beantwoord moet worden was of een langdurige blootstelling aan normaal effluent, of een geselecteerde mix van stoffen uit dit effluent (metformine, guanylurea, metoprolol, sotalol, etenolol, irbersartan, hydrochloorthiazide, diclofenac en carbamazepine), mogelijk nadelige effecten voor aquatische organismen kan hebben. Om deze onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden is gebruik gemaakt van testsystemen bestaande uit een glazen cilinder met een totale inhoud van 14 liter waarin een 2 cm dikke laag schoon sediment werd ingebracht. Vervolgens werd er, zonder het sediment te verstoren, 12 liter testmedium toegevoegd. Als laatste werden watervlooien (*Daphnia magna*), waterpissebedden (*Asellus aquaticus*), wormen (*Lumbriculus variegatus*), slakken (*Physella* sp.) en een waterplant (*Elodea canadensis*) ingebracht. Hiermee werd het testsysteem zo opgezet dat de aanwezige organismen representatief zijn voor verschillende trofische niveaus en taxonomische groepen.

Naast de geneesmiddelenconcentraties was het grootste verschil tussen de 'effluent'-behandeling enerzijds en de controle en 'MIX'-behandeling anderzijds het nutriëntengehalte. Nutriëntenconcentraties in het water waren namelijk veel hoger in de 'effluent'-behandeling. Tijdens de opslag (koelcel (4°C)) waren de geneesmiddelen gemeten in het effluent stabiel. In de eigenlijke test echter bleek dat waterconcentraties van geneesmiddelen in twee weken tijd gemiddeld 59.6% (± 26.6) afgenomen waren. Welke afbraakprocessen aan de afname van geneesmiddelen concentraties in de testsystemen bijdragen (microbieel, fotolyse, hydrolyse, et cetera) is niet duidelijk. Deze afname resulteerde wel in een lagere blootstelling van de testorganismen aan de geneesmiddelen. De daadwerkelijke blootstelling in de testsystemen, uitgedrukt als TWA (tijdgewogen gemiddelde) concentraties, was echter nog steeds binnen de spreiding van de concentraties gemeten in het effluent van RWZIs.

Alle geteste populaties laten in alle behandelingen een toename in populatiedichtheid zien. Dit geeft in ieder geval aan dat er reproductie plaatsvond waardoor mogelijke verstoringen door blootstelling aan geneesmiddelen in principe bestudeerd kon worden. In tegenstelling tot de verwachte negatieve impact van de

geneesmiddelen in het effluent, werd in de effluent-behandeling juist de grootste toename van de populaties waargenomen. Dit wijst erop dat (1) de in het effluent gevonden geneesmiddelen geen negatief effect hebben op de testorganismen of (2) dat mogelijke negatieve effecten door de testorganismen gecompenseerd werden met de betere voedselcondities. Het is in ieder geval duidelijk dat de geneesmiddelen uit de 'MIX'-behandeling, gedurende de acht weken van het experiment, geen nadelig effect hadden op de groei van waterpest (*Elodea canadensis*) en de populaties van de waterpissebed *Asellus aquaticus*, de watervlo *Daphnia magna*, de worm *Lubriculus variegatus* en de slak *Physella* sp.

Hoewel de (gelimiteerde) literatuurgegevens voor vissen laten zien dat de huidige concentraties in het milieu onder het niveau liggen die een effect veroorzaken, gaat het te ver de conclusies van die onderzoeken en de huidige studie te betrekken op andere hogere organismen zoals amfibieën.

Toch kon in de huidige studie in acht weken geen direct nadelig effect op de geselecteerde soorten waterorganismen waargenomen worden bij blootstelling aan realistische concentraties van geneesmiddelen in het effluent (met relatief hoge concentraties van metformine, guanyl urea, metoprolol, sotalol, atenolol, irbersartan, hydrochloorthiazide, diclofenac en carbazepine). De blootstelling aan het effluent heeft in deze periode geen nadelig effect, maar eerder een stimulerende invloed (door de hogere voedingswaarde) op de populatiedichtheden van de geselecteerde testorganismen laten zien.

1 Inleiding

1.1 Waterbeheer

Waterschappen zijn verantwoordelijk voor een optimaal beheer van de kwaliteit en kwantiteit van oppervlakte- en grondwater. Dit betekent onder andere dat in monitoringsprogramma's de kwaliteit van het water stelselmatig gecontroleerd wordt. Recent heeft waterschap Regge en Dinkel het effluent-water van enkele van haar rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI) uitgebreider laten onderzoeken naar het voorkomen van geneesmiddelen. Uit dit onderzoek blijkt dat er meer (rest)geneesmiddelen in dit effluent achterblijven dan voorheen gedacht werd. Hierbij valt ook op dat enkele van deze nieuw gedetecteerde stoffen in opvallend hogere concentraties (ordegrootte µg/L) voorkomen dan de residuen van andere geneesmiddelen (ordegrootte ng/L; zie Tabel 1).

Tabel 1

Stoffen uit het effluent met opvallend hoge concentraties.

Stof	Gemiddelde conc. in effluent (µg/L)	Gebruikt als...
Metformine	6.0	Anti-diabeticum; suikerziekte
Guanylurea	77	Afbraakproduct van metformine
Metoprolol	2.5	Beta-blokker; hart medicatie
Sotalol	1.5	Beta-blokker; hart medicatie
Atenolol	0.5	Beta-blokker; hart medicatie
Valsartan	1.0	Angiotensine II receptor antagonist; bloeddruk verlagend
Irbesartan	1.5	Angiotensine II receptor antagonist; bloeddruk verlagend
Hydrochloorthiazide	1	Diureticum; bloeddruk verlagend
Diclofenac	0.5	Ontstekingsremmer; pijnstiller
Carbamazepine	0.5	Anti-epilepticum

Op dit moment is niet bekend of deze nieuw-gedetecteerde stoffen mogelijk negatieve effecten op het onderwater-leven hebben. Het waterschap Regge en Dinkel heeft daarom bij Alterra een oriënterend onderzoek uitgezet.

1.2 Mogelijke effecten in het aquatische milieu

Humane geneesmiddelen zijn stoffen die met opzet ontwikkeld zijn om een specifieke activiteit uit te voeren in het menselijk lichaam. In combinatie met het feit dat veel geneesmiddelen slecht worden afgebroken in het menselijk lichaam en RWZI's, en hierdoor in een redelijk constante stroom met het uiteindelijke effluent in het aquatische milieu binnenkomen, is het niet uitgesloten dat deze stoffen onbedoeld nog effecten hebben op het waterleven. Dat dergelijke onbedoelde effecten *a priori* niet uitgesloten kunnen worden, is in eerder onderzoek naar oestrogene stoffen aangetoond (Vethaak et al., 2002). Zo vonden onderzoekers bijvoorbeeld dat onder invloed van lage concentraties hormoon-regulerende stoffen in het oppervlaktewater mannelijke vissen kunnen

‘vervrouwelijken’. Hoewel het in deze onderzoeken niet duidelijk werd wat de precieze impact op de betreffende vispopulaties was, geeft dit wel aan dat kleine hoeveelheden van specifiek actieve stoffen potentieel grote effecten tot gevolg kunnen hebben.

Aandacht voor de milieurisico's van geneesmiddelen is vooral gedurende het laatste decennium toegenomen. Hoewel er gegevens beschikbaar zijn over mogelijke effecten van geneesmiddelen gaat het vooral om zogenaamde kortdurende standaard-testen voor acute toxiciteit (Ferrari et al., 2003). Dit zijn testen van 24 tot 96 uur met of een alg (bijvoorbeeld *Scenedesmus acutus*), of een watervlo (*Daphnia magna*) of een vis (*Oncorhynchus mykiss*) die volgens internationaal afgesproken protocollen worden uitgevoerd (OECD Guideline 201, 1984; OECD Guideline 203, 1992; OECD Guideline 211, 1998; OECD Guideline 202, 2004). In de gevallen dat er naar effecten van een chronische blootstelling aan geneesmiddelen gekeken werd (Crane et al., 2006; Fent and Kümmerer, 2008), waren het vaak studies met algen (omdat een blootstelling van 72 uur al chronisch is voor een alg met een zeer korte levenscyclus) of studies met vis (Huggett et al., 2002; Kang et al., 2002; Hoeger et al., 2005) waarbij visbroed voor langere tijd gevolgd werd. Hierbij moet opgemerkt worden dat bij geneesmiddelenonderzoek met vissen er vaak naar histopathologische parameters zoals veranderingen in levercellen wordt gekeken. Daarnaast zijn er ook enkele multi-generatie studies met een watervlo (*Daphnia*) beschikbaar (Lürling et al., 2006; Dietrich et al., 2010).

Naast dergelijke testen met standaard toetsorganismen zijn er maar enkele testen bekend met andere waterorganismen zoals watervlokreeft (*Gammarus* sp. en *Hyalella azteca*), hydra en biofilms (Huggett et al., 2002; De Lange et al., 2006; Borgmann et al., 2007; Bonnineau et al., 2010). Deze studies zijn allemaal laboratorium toxiciteitstoetsen op individu-niveau. Alleen de studie van Borgmann et al. (2007) is een onderzoek naar de mogelijke effecten van geneesmiddelen op een laboratoriumpopulatie van *Hyalella azteca*.

Studies naar de mogelijke gevolgen van de blootstelling aan (dier)geneesmiddelen voor aquatische organismen onder meer natuurlijke condities zijn ook schaars. In dergelijke zogenaamde micro-/mesocosm-studies (al dan niet buiten uitgevoerd) worden meerdere populaties van evertelaten en planten in één testsysteem gehuisvest (Brain et al., 2004; Boonstra et al., 2011).

De toxiciteit van een stof wordt vaak uitgedrukt in LC₅₀, EC₅₀, NOEC- of LOEC-waarden. Deze waarden geven aan bij welke concentratie 50% van de geteste populatie sterft (LC₅₀), 50% van de geteste populatie een effect vertoont (EC₅₀), bij welke concentratie geen effect wordt waargenomen (NOEC) en bij de hoogst geteste concentratie waarbij voor het eerst effect wordt waargenomen (LOEC). Hierbij is het zo dat een lage waarde aangeeft dat het organisme sterk reageert op de blootstelling aan de teststof en een hoge waarde juist een maat is voor een ‘ongevoelige’ reactie op de teststof. Of er in het veld ook daadwerkelijk een risico voor het organisme bestaat hangt, naast de laboratoriumgevoeligheid van de soort, in hoge mate af van de mate waarin het organisme in het veld wordt blootgesteld (in deze studie dus de concentratie van de stoffen in het effluent). Als de concentratie in het effluent veel lager is dan de concentratie die tot effecten leidt, is het risico voor het blootgestelde organisme over het algemeen gering.

Tabel 2*Toxiciteitsgegevens van de stoffen met hoge concentraties in effluent*

Stof	Oplosbaarheid in water*	Gemiddelde conc. in effluent (µg/L)**	<i>Daphnia</i> acuut 48 u LC ₅₀ (mg/L)***	Algen acuut 24 u LC ₅₀ (mg/L)***	Vis acuut 96 u LC ₅₀ (mg/L)***
Metformine	Vrij oplosbaar	6.0	1345	Niet bekend	Niet bekend
Guanylurea	8.9 g/L	77	Niet bekend	Niet bekend	Niet bekend
Metoprolol	16.9 g/L	2.5	8.8	7.3	Niet bekend
Sotalol	0.8 g/L	1.5	300	Niet bekend	Niet bekend
Atenolol	26.7 g/L	0.5	33.4	620	Niet bekend
Valsartan	23.4 mg/L	1.0	Niet bekend	Niet bekend	Niet bekend
Irbesartan	8.8 mg/L	1.5	Niet bekend	Niet bekend	Niet bekend
Hydrochloorthiazide	0.7 g/L	1	Niet bekend	Niet bekend	Niet bekend
Diclofenac	50 g/L	0.5	22.4	14.5	Niet bekend
Carbamazepine	0.2 g/L	0.5	13.8	33.6	Niet bekend

* www.drugbank.ca

** niet-gepubliceerde data waterschap Regge en Dinkel

*** Naar Sanderson and Thomsen, 2009

Over het algemeen geldt dat bij geneesmiddelen waarvan toxiciteitsgegevens beschikbaar zijn en die geen hormonale werking hebben, de concentraties waarbij effecten worden waargenomen vele malen hoger zijn dan de concentraties die in het oppervlaktewater of effluent gemeten worden (Tabel 2; Cleuvers, 2005).

Echter, door de geringe beschikbaarheid van acute toxiciteitdata voor niet-standaard soorten en de schaarste aan chronische toxiciteitgegevens voor zowel standaard als niet-standaard soorten kunnen negatieve effecten op aquatische ecosystemen niet vooraf worden uitgesloten (Cunningham et al., 2006; Fent et al., 2006). Het is mogelijk dat bij een constante aanvoer van concentraties die geen direct negatief effect hebben op de standaard toetsorganismen er wel effecten optreden bij andere organismen (die taxonomisch verder van deze standaard toetsorganismen afstaan) of dat er subtiele effecten optreden die pas tijdens de voortplanting tot uiting komen (chronische effecten) en zo populaties nadelig beïnvloeden.

1.3 Onderzoeksvraag en hypothese

De vraag die in dit onderzoek beantwoord wordt is of een langdurige blootstelling aan normaal effluent, of een geselecteerde mix van geneesmiddelen uit dit effluent, mogelijk nadelige effecten voor aquatische organismen kunnen hebben.

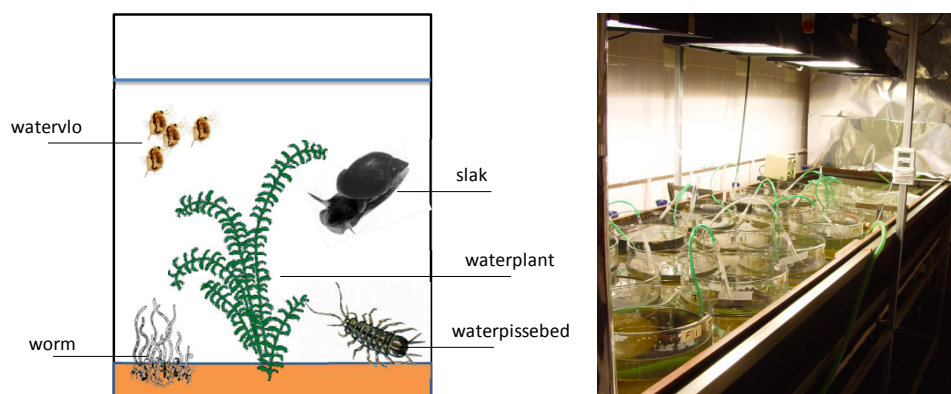
De geteste hypothese is dat de populatiedichtheden van waterorganismen in de testsystemen die acht weken blootgesteld worden aan effluent, significante afwijkingen laten zien vergeleken met populatiedichtheden van deze organismen in de controle-systemen (blootgesteld aan schoon water).

Als deze afwijkingen ook te zien zijn in de test-systemen blootgesteld aan een mix van geselecteerde geneesmiddelen, betekent dit dat deze middelen volledig of gedeeltelijk verantwoordelijk zijn voor de geobserveerde afwijkingen. Hierbij moet worden opgemerkt dat de mix van geselecteerde geneesmiddelen bestond uit de stoffen die in relatief hoge concentraties in het effluent zijn aangetroffen (zie Tabel 1).

2 Experiment

2.1 Opzet

Om de onderzoeksvragen te beantwoorden is gebruikt gemaakt van een zogenaamde multi-species testsysteem. Een multi-species testsysteem bestaat uit een glazen cilinder met een totale inhoud van 14 liter waarin een 2 cm dikke laag schoon sediment werd ingebracht. Vervolgens werd er, zonder het sediment te verstoren, 12 liter testmedium opgebracht. De testsystemen werden belicht met zogenaamde daglicht-lampen ($121.5 \pm 25.5 \mu\text{S}/\text{m}^2$) en waren in een waterbad geplaatst zodat de temperatuur op een constant niveau van 19°C gehouden kon worden (Figuur 1).



Figuur 1

Schematische weergave van het gebruikte multi-species testsysteem en impressie van de uiteindelijke opzet.

Zoals de term 'multi-species testsysteem' al aangeeft, is het testsysteem geen volledige weergave van de werkelijke veldsituatie maar een benadering ervan. Het is daarom van belang om enerzijds het testsysteem zodanig in te richten dat de componenten ook daadwerkelijk representatief zijn voor het aquatische ecosysteem en anderzijds componenten te kiezen die ook daadwerkelijk te testen zijn gedurende de experimentele periode. Zo is het praktisch heel uitdagend om een populatie muggen acht weken lang te testen omdat de dieren na enkele weken uitvliegen en dus uit de test verdwijnen.

Omdat de aard en mogelijke werkingsmechanismen van de te testen geneesmiddelen divers zijn, is het (in tegenstelling tot bijvoorbeeld insecticiden en herbiciden) vooraf lastig te voorspellen welke organismen mogelijk door de stoffen beïnvloed worden. Om dit enigszins te ondervangen werd het testsysteem ingericht met verschillende soorten organismen. Het 'multi-species'-testsysteem is zo opgezet dat de aanwezige organismen representatief zijn voor verschillende niveaus en taxonomische groepen. Per test systeem waren dit (zie ook Figuur 1):

- twintig exemplaren *Lumbriculus variegatus*, een relatieve grote detritus-etende worm die in het sediment leeft.
- tien exemplaren *Asellus aquaticus*, een waterpissebed die op de bodem en waterplanten voorkomt en leeft van micro-organismen op afstervend organisch materiaal.

- tien exemplaren *Physella* sp., een herbivore slak die algen graast op het oppervlak van bijvoorbeeld waterplanten.
- twintig exemplaren *Daphnia magna*, watervlo. Dit diertje is een standaard testorganisme die representatief voor zooplankton wordt verondersteld en algen en micro-organismen graast.
- Eén 10 cm lange stengel *Elodea canadensis*, waterpest, een veel voorkomende ondergedoken waterplant in ondiepe Nederlandse wateren.

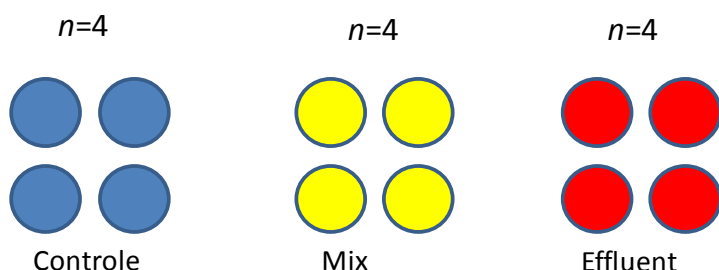
Verschillende waterkwaliteitsparameters (zuurgraad, zuurstofgehalte, elektrisch geleidend vermogen) en fytoplankton chlorofyl-A werden gemeten om de potentiële effecten van geneesmiddelen (en effluent) op het functioneren van de verschillende typen testsystemen te monitoren.

Omdat het vooraf niet duidelijk was hoe stabiel de teststoffen in de testsystemen zouden zijn, is ervoor gekozen om de testsystemen om de twee weken volledig te verversen en opnieuw in te richten. Hierbij werden alle testorganismen handmatig overgezet naar hun nieuwe behuizing op de volgende manier:

Per bemonstering werd eerst het zuurstofgehalte, de zuurgraad (pH), het elektrisch geleidend vermogen (EGV) en het aanwezige fytoplankton Chl-A gemeten. Hierna werd twee liter uit het systeem genomen en gefixeerd om op een later tijdstip het aantal watervlooien te bepalen. Daarna werden de overgebleven watervlooien uit de waterkolom gefilterd en overgezet naar het nieuwe systeem. De wormen, slakken en waterpissebedden werden vervolgens handmatig uit de systemen gevangen, geteld en ook voorzichtig overgezet. Dit gebeurde ook met de scheut waterpest. Deze werd echter alleen bij de eindbemonstering gewogen.

De eigenlijke proefopzet bestaat uit het vergelijken van de geobserveerde effecten op de geselecteerde waterorganismen in testsystemen waaraan schoon bronwater (zonder geneesmiddelen) is toegevoegd (controle), met die waar bronwater en een geselecteerde mix van geneesmiddelen is toegevoegd (mix), en die waaraan effluent uit een representatieve RWZI is toegevoegd. Omdat het aanvoeren van 1000 liter effluent uit bijvoorbeeld de RWZI in Ootmarsum enkele logistieke uitdagingen met zich meebracht, is ervoor gekozen om effluent uit de RWZI in Bennekom te gebruiken. Deze installatie is vergelijkbaar qua apparatuur, schaal en ontvangend rioolwater met die in Ootmarsum en heeft als enige toevoeging een additioneel zandfilter om nutriënten te verwijderen. Het gebruikte effluent is in dit geval voor het zandfilter onttrokken om zo dicht mogelijk bij de situatie in het beheersgebied van Waterschap Regge en Dinkel te blijven. Dit is van belang om te weten omdat de bepaling van het nutriëntengehalte (ter karakterisering van het effluent) dus niet weergeeft wat er daadwerkelijk door de RWZI van Bennekom geloosd wordt.

De drie behandelingen werden in vier-voud ingezet zodat in totaal twaalf testsystemen werden gebruikt (Figuur 2).



Figuur 2

Schematische weergave van het experimentele ontwerp.

Het verzamelde effluent werd in een koelcel (4°C) bewaard en bij elke verversing van het testsysteem werd het benodigde volume een dag van te voren naar het testlaboratorium gebracht zodat het langzaam op temperatuur kon komen en de testorganismen bij introductie in het systeem geen temperatuurschok opliepen.

Het water van de controle en mix-systemen was afkomstig van de experimentele testlocatie 'De Sinderhoeve' van Alterra. Het benodigde water werd net als het effluent ook in één grote portie opgeslagen en werd donker bewaard op de experimentele testlocatie. Bij elke verversing werden aan de volumina van de mix-behandeling de stoffen uit Tabel 3 toegevoegd.

Tabel 3

Stoffen geselecteerd voor de Mix-behandeling.

Stof	Concentratie (µg/L)
Metformine	6.0
Guanylurea	77
Metoprolol	2.5
Sotalol	1.5
Atenolol	0.5
Irbesartan ¹	2.5
Hydrochloorthiazide	1
Diclofenac	0.5
Carbamazepine	0.5

Om de concentraties van de geneesmiddelen in het testmedium te meten, werden er op verschillende tijdstippen monsters genomen. Deze monsters werden geanalyseerd door het Technologiecentrum Wasser (TZW) in Karlsruhe, Duitsland. Hiervoor werd gebruik gemaakt van geavanceerde LC-MSMS techniek. De limiet waaronder geen betrouwbare gegevens meer kunnen worden gegenereerd (limiet van kwantificatie) werd door TZW bepaald volgens DIN 32645 voorschrift (Duitse Industrie Norm).

Het beschikbare budget voor de analyse van concentraties van geneesmiddelen was beperkt en daarom zijn ook een beperkt aantal monsterpunten geselecteerd:

- Een monster van het water van Sinderhoeve om te controleren of dit water vrij van geneesmiddelen was.
- Drie monsters van het opgeslagen effluent om na te gaan of er tijdens de opslag in de koelcel mogelijk afbraak optrad.
- Twee monsters van het effluent na twee weken 'gebruik' in de testopstelling, om na te gaan of de stoffen stabiel waren in de testsystemen.
- Eén monster van de mix-behandeling direct na installatie van het systeem en na twee weken 'gebruik' in de testopstelling, om na te gaan of de juiste concentraties waren aangelegd en of deze stabiel bleven.

Met de resultaten van deze geselecteerde monsterpunten werd het mogelijk geacht voldoende inzicht te krijgen in de blootstelling aan geneesmiddelen gedurende de gehele experimentele periode.

¹ Daar Valsartan niet besteld kon worden, is in overleg met de opdrachtgever besloten om de concentratie van Irbesartan te verhogen. Zo bleef de totale hoeveelheid van dit type stoffen gelijk met de concentratie die verwacht werd in het effluent.

2.2 Data analyse

Het voorkomen van mogelijke verschillen tussen behandelingen werd statistisch onderzocht met een variantieanalyse (ANOVA). Deze methode geeft per geteste parameter per monstertijdstip aan of er een statistisch significant verschil aanwezig is ($p < 0,05$). Er is voor gekozen op deze ANOVA-uitkomsten geen zogenaamde post-hoc test meer uit te voeren (maakt duidelijk tussen welke behandelingen het verschil aanwezig was), omdat als de verschillen wel significant, maar niet duidelijk uit de bijbehorende grafieken af te lezen zijn, dergelijke verschillen als ecologisch minder relevant beschouwd worden.

3 Resultaten

3.1 Karakterisering testcondities

De studie werd in de laboratoria van Alterra uitgevoerd tussen 1 december 2011 en 25 januari 2012. De testsystemen werden twaalf uur per dag belicht en verbleven acht uur in het donker. De temperatuur van het water in de systemen bedroeg over de gehele test periode $19.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$ (gemiddelde $\pm$ standaard afwijking).

Tabel 4

Nutriëntgehalten in Sinderhoeve-water en effluent.

Monster- omschrijving	N-NH ₄ (mg/l)	N-(NO ₃ +NO ₂) (mg/l)	N _{totaal} (mg/l)	P-PO ₄ (mg/l)	P _{totaal} (mg/l)
Aantoonbaarheidsgrens	0.04	0.03	0.3	0.02	0.1
Sinderhoeve-water	0.16	0.00	0.7	0.00	0.00
Effluent ²	0.49	5.67	7.3	0.051	0.19

Het water afkomstig van de experimentele testlocatie De Sinderhoeve was duidelijk armer aan voedingsstoffen dan het gebruikte effluent (Tabel 4).

3.2 Geneesmiddelen-concentraties

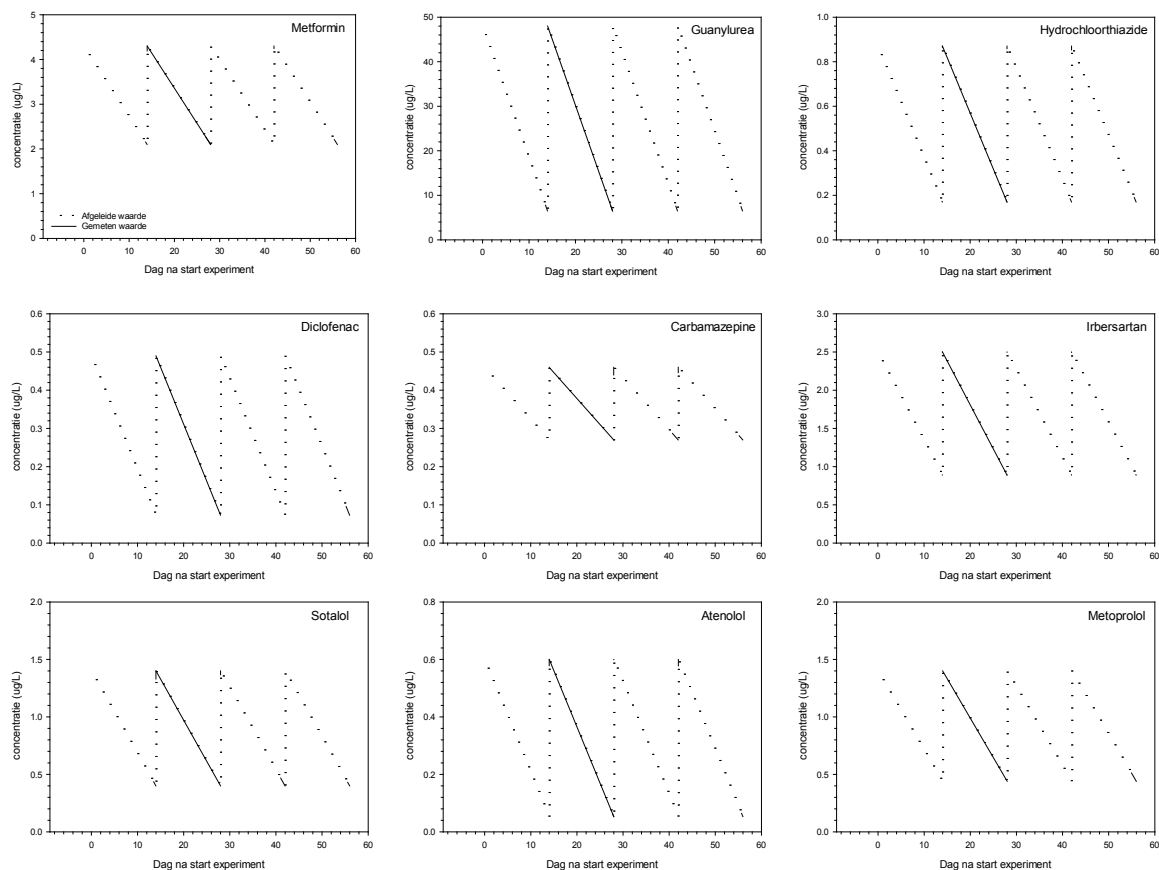
Het gebruikte water werd op verschillende tijdstippen bemonsterd voor analyse (Bijlage 1). Het effluent in koude opslag werd bemonsterd op 15 december 2011, 11 en 26 januari 2012. Het gebruikte Sinderhoeve-water werd bemonsterd op 1 februari 2012. Verder werd water dat twee weken in de testsystemen had gezeten, bemonsterd in één systeem van de mix (mix 4) en twee van de effluent behandelingen (effluent 2 en 4).

Het geanalyseerde Sinderhoeve-water bleek, met uitzondering van een waarneming van het antibiotica Azithromycin (0.11 µg/L; wordt onder andere gebruikt tegen keelontsteking), vrij te zijn van geneesmiddelen (Bijlage 1). Waarom Azithromycin in het watermonster is aangetroffen is niet duidelijk. Het is vreemd dat van de 57 geanalyseerde middelen, er maar één middel in het Sinderhoeve-water werd aangetroffen. De vraag rijst of dit inderdaad een contaminatie van het testwater is of dat dit een artefact is. Omdat deze stof niet is aangetroffen in de analyses van het(zelfde) water uit de 'mix'-behandeling is het niet waarschijnlijk dat het Sinderhoeve-water daadwerkelijk Azithromycin bevat en dat het Sinderhoeve water inderdaad als zijnde 'schoon' gekarakteriseerd mag worden.

² Dit is water dat verzameld is voordat het effluent het zandfilter passeert waardoor deze gehalten hoger zijn dan de concentraties in het daadwerkelijk geloosde effluent.

De analyses van het koud en donker opgeslagen effluent laten zien dat de concentraties van de aangetroffen geneesmiddelen stabiel blijven in de tijd (Bijlage 1). Dit betekent dat elke keer dat de testsystemen met dit effluent gevuld werden, de testorganismen weer aan min of meer dezelfde concentraties van de geneesmiddelen werden blootgesteld. Dat de blootstelling aan geneesmiddelen gedurende het verblijf van twee weken in de testsystemen niet constant bleef, wordt aangetoond door de metingen van effluent 2 en 4 op 28 december 2011 (Bijlage 1). Hierin zijn na twee weken in de testsystemen van de 'effluent'-behandeling de gehalten met gemiddeld $59.6 (\pm 26.6) \%$ afgenomen. Als hierbij alleen gekeken wordt naar de stoffen die ook in de mix-behandeling zitten is de afname gemiddeld $60.0 (\pm 28.0) \%$.

Een dergelijke afname in blootstellingsconcentraties werd ook waargenomen in de test-systemen van de 'mix'-behandeling (Bijlage 1). De concentraties van de, aan het schone Sinderhoeve-water toegediende, geneesmiddelen nam in twee weken tijd gemiddeld $71.1 (\pm 16.8) \%$ af. Als het concentratieverloop in de test-systemen van de 'mix'-behandeling uitgezet wordt tegen de tijd, wordt duidelijk dat de blootstelling gedurende het experiment niet constant was maar een zogenaamd zaagtandpatroon vertoonde (Figuur 3).



Figuur 3

Dynamiek van concentraties in de waterfase van de mix 2-behandeling.

Omdat over de gehele testperiode vier van dergelijke zaagtanden aanwezig waren, is het dus lastiger om de precieze blootstelling over de gehele acht weken te karakteriseren. Een methode die hierbij uitkomst kan bieden is de zogenaamde 'Time Weighted Average' methode (Brock et al., 2010) waarbij een gemiddelde concentratie over een specifiek tijdsinterval berekend wordt met de formule:

$$TWA_t = \frac{C_0}{k * t_{TWA}} [1 - \exp(-k * t_{TWA})] \text{ (Vergelijking 1)}$$

Waarin: TWA_t = gemiddelde concentratie van een stof over tijd t in dagen

C_0 = de concentratie van de stof bij de start van de periode

k = verdwijnsnelheidsconstante

t_{TWA} = periode (in dagen) waarover TWA berekend wordt

Hierbij is de verdwijnconstante k als volgt bepaald:

$$k = \frac{-\ln(C_t/C_0)}{\Delta t} \text{ (Vergelijking 2)}$$

Waarbij: C_t = de concentratie van de stof bij het eind van de periode

C_0 = de concentratie van de stof bij de start van de periode

Δt = de duur van de periode (in dagen)

De TWA werd over twee weken berekend omdat dit de duur van een blootstelling was. Na twee weken werd het testwater ververs met nieuw effluent (met dezelfde concentratie als bij de start van de vorige periode, zie Bijlage 1) of met een nieuw-aangemaakte MIX-behandeling. Dit betekende dat met de berekening van één tweewekelijkse periode meteen de blootstelling voor de vier tweewekelijkse perioden bekend was en hiermee dus de gemiddelde blootstelling over de gehele test duur van acht weken (Tabel 5).

De concentraties van de geneesmiddelen in de MIX-behandeling waren in eerste instantie berekend op getallen uit een RWZI van waterschap 'Regge en Dinkel' (Tabel 2). Uiteindelijk werd gekozen om effluent van de RWZI van Bennekom te gebruiken. In dit effluent kwamen alle geneesmiddelen voor die ook in het effluent van Regge en Dinkel als problematisch werden beschouwd. In het Bennekom-effluent waren de concentraties van de geselecteerde geneesmiddelen in bijna alle gevallen (iets) lager dan de concentraties van hetzelfde geneesmiddelen in het effluent van de RWZI van 'Regge en Dinkel'.

Uit de analyse van het effluent uit Bennekom blijkt dat in onze multi-species test de testorganismen aan twaalf verschillende geneesmiddelen en in de mix aan negen verschillende geneesmiddelen zijn blootgesteld (Bijlage 1).

Tabel 5

TWA concentraties van de gemeten geneesmiddelen in effluent en 'MIX'-behandeling.

Compound	Effluent start ³ (µg/L)	Effluent eind ⁴ (µg/L)	TWA effluent (14d)	Mix start (µg/L)	Mix eind ⁵ (µg/L)	TWA mix (14d)
Diclofenac *	0.7	0.28	0.46	0.5	0.07	0.22
Carbamazepine *	0.9	0.70	0.76	0.5	0.27	0.36
Gemfibrozil	<0.5	0.38				
Hydrochlorothiazide *	5.3	2.15	3.38	1.0	0.17	0.43
Irbesartan *	3.2	0.44	1.09	2.5	0.89	1.56
Valsartan	<0.5	0.07	-			
Anhydroerythromycin A	0.2	0.09	0.14			
Azithromycin	0.2	<LOQ	-			
Clarithromycin	0.1	<LOQ	-			
Sotalol *	4.1	1.85	2.87	1.5	0.40	0.80
Atenolol *	0.3	<LOQ	-	0.5	0.05	0.23
Metoprolol *	2.5	0.58	1.00	2.5	0.44	0.83
Iohexol	0.4	0.54	0.24			
Ioxithalamic acid	0.3	0.35	0.31			
Ciprofloxacin	0.2	<LOQ	-			
Sulfamethoxazole	0.5	0.62	0.57			
Bisphenol A	<0.5	0.07	-			
Metformin *	2.4	1.70	2.07	6.0	2.1	3.07
Guanyl urea *	61.7	38.50	48.02	77.0	6.5	20.76

* = stoffen ook aanwezig in de 'MIX'-behandeling

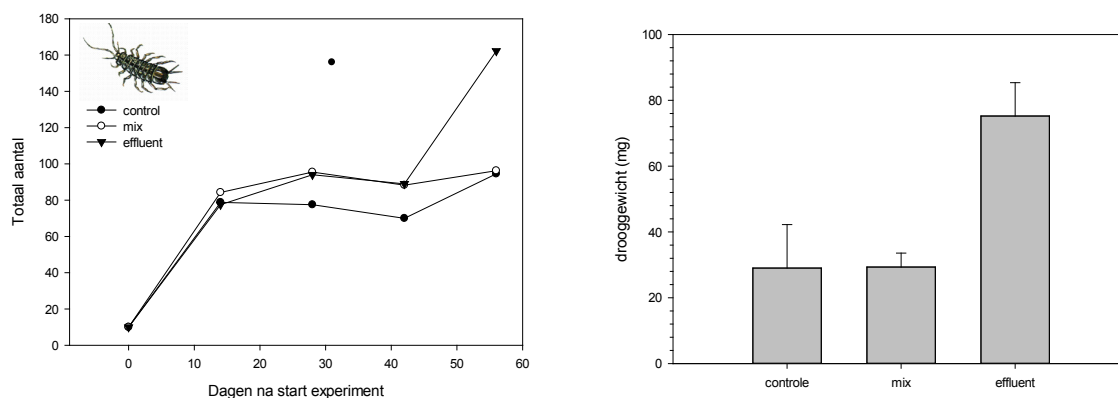
3.3 Respons test organismen

Omdat kort na het inzetten van de adulte dieren reproductie plaats vond, namen de aantallen van de waterpissebed *Asellus aquaticus* na de start van het experiment toe in de drie behandelingen (Figuur 4). Kort na de reproductie stierven de adulte dieren, waardoor voornamelijk juveniele dieren overbleven in de testsystemen (Bijlage 2).

³ Concentratie effluent van 15-12-2011

⁴ Gemiddelde concentratie 'effluent 2 & 4' van 28-12-2012

⁵ Concentraties van MIX 4 van 28-12-2012



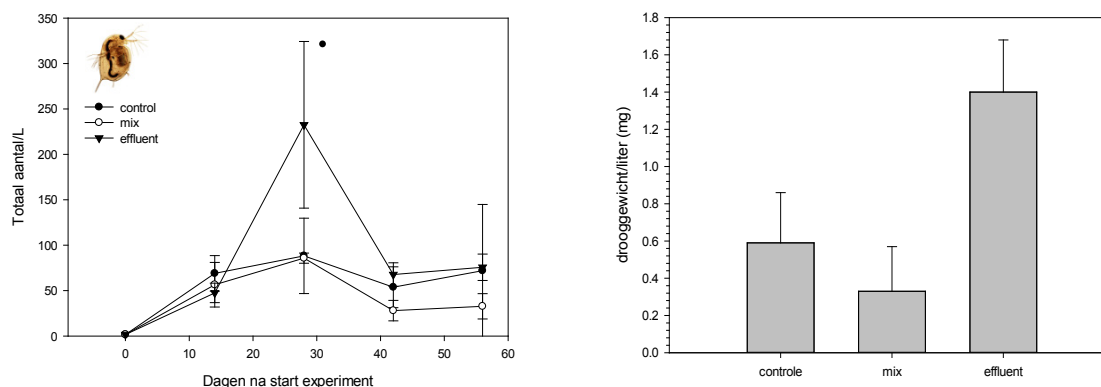
Figuur 4

Dynamiek van de populatie waterpissebedden (*Asellus aquaticus*) en eindgewicht, weergegeven als geometrisch gemiddelde, in de drie behandelingen (* = significant verschil).

Hoewel er verschillen lijken te zijn tussen de totale aantallen in de drie behandelingen zijn deze niet statistisch significant (Bijlage 3). Dit komt doordat er tussen de replica's binnen de behandelingen meer variatie voorkomt dan tussen de behandelingen zelf (Bijlage 2). Op basis van de gevonden aantallen wordt echter wel de indruk gewekt dat vooral in de effluent-behandeling meer jonge waterpissebedden opgroeien (Figuur 4). Dit beeld wordt bevestigd door de gevonden drooggewichten aan het einde van het experiment (Figuur 4), waarbij het *Asellus* drooggewicht in de effluent-behandeling statistisch significant hoger is dan in de controle en 'mix'-behandeling (Bijlage 3).

De dynamiek van de watervlo *Daphnia magna* in de verschillende behandelingen gedurende de duur van het experiment is redelijk vergelijkbaar (Figuur 5). Uit Figuur 5 blijkt dat de populatie in de eerste 28 dagen toeneemt waarbij er in de effluent-behandeling na 28 dagen een duidelijke piek in de aantallen watervlooien waargenomen werd, die statistisch significant verschilde van de aantallen in de controle en 'mix'-behandeling (Bijlage 3). Hierna nam de watervlo-dichtheid in de 'effluent'-behandeling weer af, maar werd op dag 42 na start van het experiment werd een iets lagere watervlo-dichtheid in de 'mix'-behandeling waargenomen ten opzichte van 'effluent'-behandeling en de controle-systemen. Omdat er op deze dag relatief weinig spreiding tussen de replica's binnen de drie behandelingen voorkwam (Bijlage 2), kon dit verschil statistisch significant aangetoond worden.

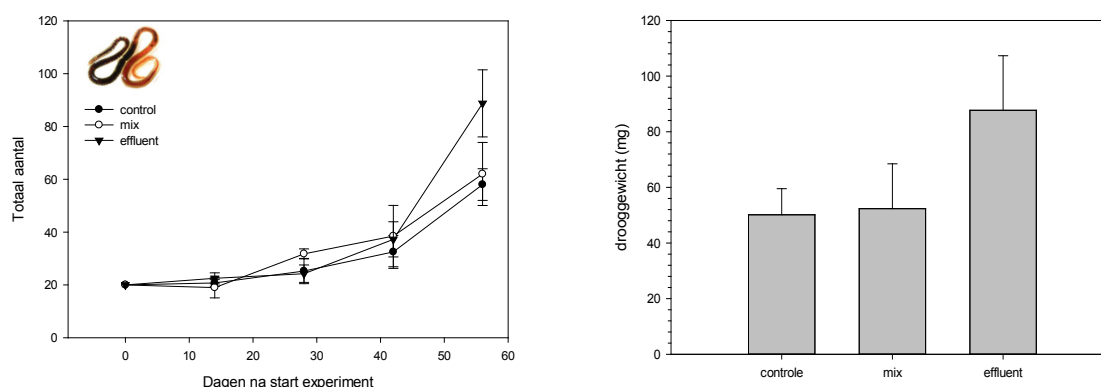
Hoewel aan het einde van het experiment de aantallen watervlooien tussen de behandelingen niet significant verschillen, is dit wel het geval voor het eindgewicht. Een significant hoger gewicht werd waargenomen in de 'effluent'-behandeling (Bijlage 3). Dit betekent dat de watervlooien in de 'effluent'-behandeling zwaarder waren dan in de overige behandelingen. Het laagste gewicht werd waargenomen in de 'mix'-behandeling, hoewel dit gewicht niet significant afweek van de controle.



Figuur 5

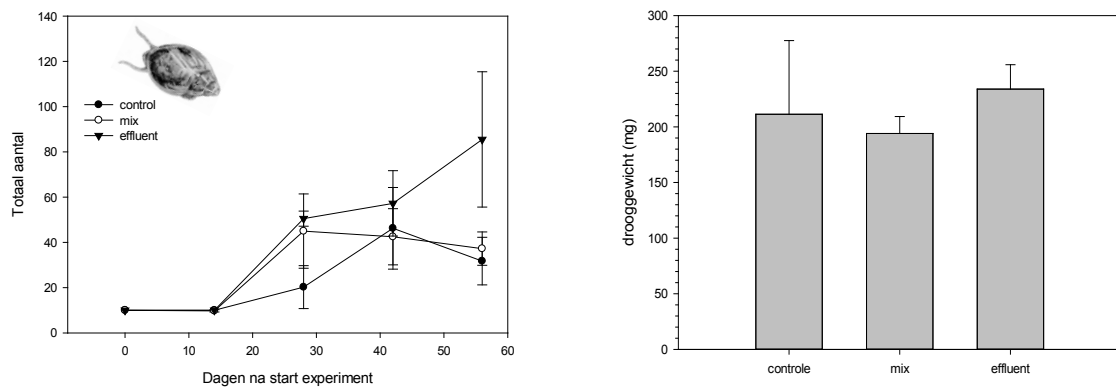
Dynamiek van de watervlo (*Daphnia magna*) populatie en eindgewicht, weergegeven als geometrische gemiddelde, in de drie behandelingen (* = significant verschil).

De aantallen van de, in het sediment gravende, worm *Lumbriculus variegatus* nemen gedurende de duur van het experiment in alle behandelingen toe (Figuur 6). Significante verschillen tussen de aantallen in de verschillende behandelingen werden op dag 28 en 56 waargenomen, waarbij respectievelijk de aantallen in de 'mix'- en de 'effluent'-behandeling hoger waren (Bijlage 3). Aan het eind van het experiment was ook het totale drooggewicht aan wormen het hoogst in de 'effluent'-behandeling (Figuur 6). Omdat de aantallen wormen in de 'effluent'-behandeling ongeveer 0,7 keer hoger zijn dan in de andere behandelingen en het totale drooggewicht ongeveer 0,6 keer hoger is, geeft dit aan dat er tussen de individuele wormen uit de verschillende behandelingen geen grote verschillen zijn, maar er gewoonweg meer wormen in de 'effluent'-behandeling voorkomen.



Figuur 6

Dynamiek van de worm (*Lumbriculus variegatus*) populatie en eindgewicht, weergegeven als geometrische gemiddelde, in de drie behandelingen (* = significant verschil).

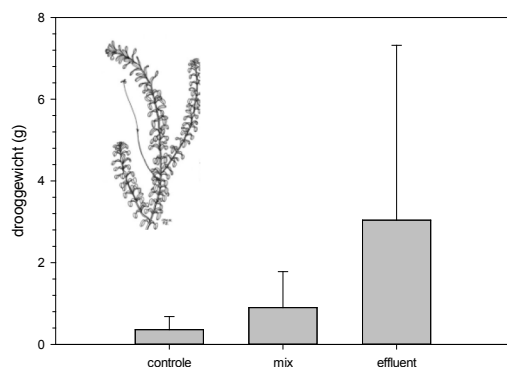


Figuur 7

Dynamiek van de slak (*Physa sp.*) populatie en eindgewicht, weergegeven als geometrische gemiddelde, in de drie behandelingen (* = significant verschil).

Na dag 14 is een duidelijke toename in de slakkenpopulatie waar te nemen (Figuur 7). Dit heeft te maken met het feit dat de tien geïntroduceerde slakken eerst eieren moesten afzetten die pas na deze periode uitkwamen. In eerste instantie lijkt het alsof de ontwikkeling van de slakkenpopulatie in de controle-behandeling iets achter loopt (significant lagere aantallen op dag 28; Bijlage 3), maar aan het eind van de experimentele periode zijn de aantallen alleen in de 'effluent'-behandeling significant hoger dan in beide andere behandelingen (Bijlage 3). Aan het eind van het experiment is er echter geen sprake van een verschil tussen het totale drooggewicht van de slakkenpopulaties in de verschillende systemen (Figuur 7). Dit betekent dat in de 'effluent'-behandeling weliswaar meer slakken aanwezig zijn, maar dat ze kleiner zijn dan die in de controle- en 'mix'-behandeling.

Hoewel de waterpestplanten (*Elodea canadensis*) aan het einde van de experimentele periode het best leken te zijn gegroeid in de systemen van de 'effluent'-behandeling (Figuur 8), kan dit niet statistisch worden aangetoond (Bijlage 3). Dit komt voornamelijk door de brede spreiding die aanwezig was tussen de systemen van de 'effluent'-behandeling. Deze spreiding werd hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door draadalgen die zich ontwikkelden in de nutriënt-rijke effluent-systemen, en in enkele gevallen de groei van de waterpest nadelig beïnvloedde.

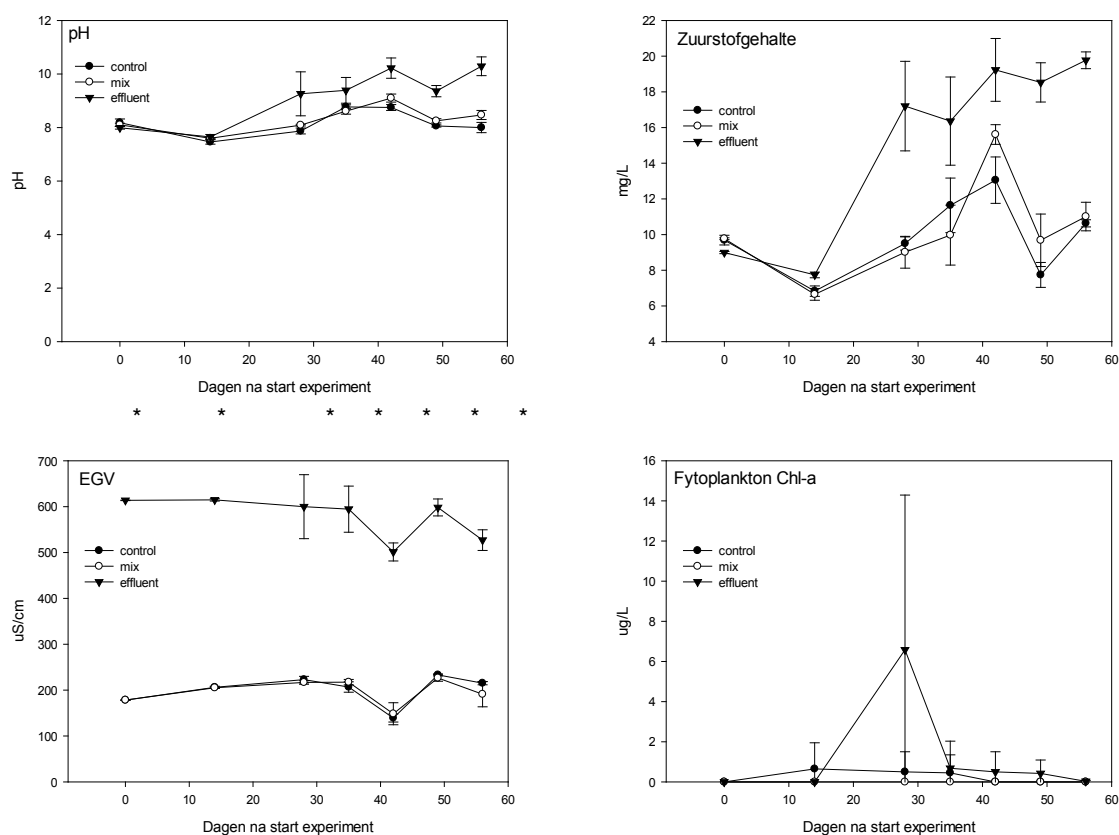


Figuur 8

Eindgewicht van waterpest (*Elodea canadensis*), weergegeven als geometrische gemiddelde, in de drie behandelingen (geen significant verschil).

3.4 Respons waterkwaliteitsparameters en chlorofyl-A

De waterkwaliteitsparameters pH, zuurstofgehalte en elektrisch geleidend vermogen (EGV) zijn aan elkaar gecorreleerd binnen het zogenaamde 'pH-zuurstof-alkaliniteit-EGV syndroom'. Dit wil zeggen dat deze parameters allemaal gekoppeld zijn aan primaire productie- en respiratie-processen in het water. Tijdens de fotosynthese nemen ondergedoken waterplanten en/of algen o.a. bicarbonaat ionen (HCO_3^-) op en wordt zuurstof geproduceerd. Hierdoor wordt het zuurstofgehalte van het water dus verhoogd. Omdat er negatief geladen ionen aan het water onttrokken worden (HCO_3^-), daalt het EGV. Omdat het zwak zure bicarbonaat ion verdwijnt, wordt hierbij het water iets meer basisch en dit komt tot uiting in het hoger worden van de pH. Daar HCO_3^- ook een (zwak)bufferende werking heeft, heeft het verdwijnen van dit ion ook een kleine verlaging van de alkaliniteit (bufferend vermogen) van het water tot gevolg. Vaak zijn kleine effecten op de primaire productie al waar te nemen op de parameters van dit syndroom voordat dit tot uiting komt bij de biomassa en/of dichtheden van primaire producenten zelf (Brock, 1988).



Figuur 9

Dynamiek van pH, zuurstofgehalte, EGV en fytoplankton chlorofyl-A, weergegeven als geometrische gemiddelde, in de drie behandelingen (* = significant verschil).

In de 'effluent'-behandeling was het EGV vanaf de start van het experiment circa drie maal hoger dan in de controle en 'mix'-behandeling (Figuur 9). Omdat effluent per definitie een geconcentreerd mengsel van veel stoffen en opgeloste zouten is, is dit niet verwonderlijk. De parameters pH en zuurstofgehalte later echter wel een min of meer gelijk startniveau zien bij de start van het experiment (Figuur 9). In de eerste 28 dagen van het experiment is er een toename te zien voor deze parameters, waarbij op dag 28 de pH en het

zuurstofgehalte duidelijk hoger worden in de 'effluent'-behandeling, ten opzichte van de waarden in de controle en de 'mix'-behandeling. Dit verschil werd in de verdere duur van het experiment groter (Figuur 9). Deze verschillen waren allemaal statistisch significant (Bijlage 3). Deze verschillen tussen effluent enerzijds en de controle en 'mix'-behandeling anderzijds zijn te verklaren door de hogere nutriëntengehalten in de 'effluent'-behandeling. Fytoplankton chlorofyl-A was laag maar piekte éénmalig op dag 28 in de 'effluent'-behandeling (Figuur 9).



Figuur 10

Van links boven met de klok mee: de dosering van de 'mix'-behandeling, het uitzoeken van de test-organismen bij de start van het experiment, test systeem bij de start, adulte Asellus aquaticus met jongen.

4 Discussie en conclusie

Buiten de aanwezigheid van de verschillende (genees)middelen, was het nutriëntengehalte het grote verschil tussen de effluent-behandeling enerzijds en de controle en 'MIX'-behandeling anderzijds. In dit onderzoek is er bewust niet voor gekozen om dit verschil met additionele nutriëntentoevoegingen aan de controle en MIX-behandeling op te heffen, omdat niet geheel duidelijk was door welke nutriënten/stoffen (opgelost, particulier) dit verschil veroorzaakt werd. Het precies gelijkstellen van de controle en MIX-behandeling met de 'effluent'-behandeling zou daarmee lastig geworden zijn. Het niet gelijkstellen zorgde er ook voor dat een mogelijk verschil tussen de controle en 'effluent'-behandeling (met alle componenten - al dan niet gemeten in de analyse die deze bevatte) duidelijker zou worden (door het mogelijke compenserende effect van betere voedingscondities op toxiciteit).

Gedurende de test bleek dat het hanteren en overzetten van de testorganismen goed werkte. Het verzamelen van de slakken en waterpissebedden was het makkelijkste omdat de dieren middels een pipet of zachte pincet één voor één opgepakt konden worden. Het voorzichtig losmaken van de scheut waterpest was geen probleem en daar dit een redelijk robuuste plant betrof was het daadwerkelijke overzetten geen probleem. Het verzamelen van de watervlooien en wormen werd vooraf als zijnde het meest uitdagend geschat. Dit bleek echter mee te vallen omdat de wormen zich vlak onder het sediment oppervlakte ophielden en daardoor redelijk gemakkelijk uit te zeven waren. Ook het afgieten en filteren van het water over een fijnmazig net werkte goed waardoor de watervlooien ook goed naar hun nieuwe 'behuizing' overgezet konden worden. Omdat deze handeling voor alle systemen hetzelfde was en omdat het hanteren van de testorganismen goed verliep, wordt aangenomen dat de mogelijke negatieve stress van het overzetten weinig invloed heeft gehad op de verschillen tussen behandelingen.

Het was vooraf niet bekend hoe stabiel de geneesmiddelen zouden zijn in water. De beperkt beschikbare informatie bij de opdrachtgever en het TWZ (analyse laboratorium) wijst erop dat het stabiele verbindingen betreft. Ook Bendz en collega's (Bendz et al., 2005) vonden in een Zweedse monitoringstudie dat veel geneesmiddelen, o.a. beta-blockers zoals atenolol en metoprolol maar ook carbamazepine, zeer persistent zijn terwijl de stof diclofenac weer wel afbreekbaar lijkt te zijn. Het feit dat deze middelen zeer makkelijk alle reinigungsstappen in de RWZI passeren (niet-gepubliceerde data Waterschap Regge en Dinkel) versterkt het beeld van 'stabiele stoffen'.

Dat de geneesmiddelen in koel opgeslagen effluent nauwelijks afbreken, kon in deze studie inderdaad bevestigd worden (Bijlage 1). In de eigenlijke test echter bleek dat waterconcentraties van geneesmiddelen in twee weken tijd gemiddeld met 59.6 ($\pm$ 26.6) % afnemen. Omdat de geteste geneesmiddelen allemaal goed water oplosbaar zijn (Tabel 2) is het niet waarschijnlijk dat deze stoffen sorberen aan organisch materiaal. Welke afbraakprocessen aan de afname van geneesmiddelenconcentraties in de testsystemen ten grondslag liggen (microbieel, fotolyse, hydrolyse, et cetera) is niet duidelijk.

De afname van de geneesmiddelen in het testmedium resulteerde in een lagere blootstelling van de testorganismen. De daadwerkelijke blootstelling, berekent met behulp van TWA (tijdsgewogen gemiddelde) concentraties, was echter nog steeds binnen de spreiding van de concentraties die in het effluent van RWZIs en/of oppervlakte water gevonden worden (niet-gepubliceerde data waterschap Regge en Dinkel, Calamari et al., 2003; Brun et al., 2006; Sacher et al., 2008).

De populaties van alle testorganismen lieten, zoals op basis van de beschikbare toxiciteitsdata verwacht werd (Sanderson and Thomsen, 2009), inderdaad geen acuut effect zien. Hoewel dit uit de resultaten van het multi-species experiment lastig op te maken is, is dit voor fytoplankton chlorofyl-A hoogstwaarschijnlijk ook het geval. Dat in alle gebruikte testsystemen de Chl-A waardes laag bleven kan verklaard worden door de begrazing door *Daphnia*. Hierdoor werd al het geproduceerde fytoplankton (gemeten als chlorofyl-A) direct opgegeten (Figuur 9). De populatie watervlooien kon hoogstwaarschijnlijk toenemen omdat de productie van de algen voldoende hoog was maar wel zeer effectief begraasd werd (Figuur 5). De beperkende factor voor de groei van algen in onze testsystemen was hoogstwaarschijnlijk de hoeveelheid nutriënten. Omdat in het effluent de nutriënten gehalten het hoogst waren, waren de groeiomstandigheden voor algen in de effluent-behandeling het gunstigst. Dit is terug te zien in het feit dat hier ook de hoogste waardes voor pH en zuurstofgehalten (zijnde een maat voor primaire productie) werden waargenomen (Figuur 9). Doordat de algen in de effluent-behandeling het beste groeiden, konden hier ook de watervlooien het meest toenemen. Dat in de effluent-behandeling na dag 28 het aantal watervlooien afnam wil niet zeggen dat de algen niet meer groeiden, maar dat veel kleine (juvenile) watervlooien nu vervangen werden door minder, maar wel grotere adulte dieren (Figuur 5). Omdat de toename van jonge watervlooien in de overige twee behandelingen niet zo groot was als in de effluent-behandeling viel dit proces hier veel minder op.

Net als de watervlooien laten de andere geteste populaties in alle typen testsystemen een toename zien. Dit geeft in ieder geval aan dat er reproductie plaatsvond waardoor mogelijke verstoringen ten gevolge van blootstelling aan geneesmiddelen in principe bestudeerd kon worden. In tegenstelling tot de verwachte negatieve impact van de geneesmiddelen in het effluent en 'mix'-behandeling, werd in de effluent-behandeling juist de grootste toename van de populaties waargenomen terwijl de respons van de testorganismen in controles en de mix-behandeling zeer vergelijkbaar was (zie sectie 3.3). Dit wijst erop dat (1) de in het effluent- en mix-behandeling gevonden geneesmiddelen geen negatief effect hebben op de testorganismen of (2) dat in de effluent-behandeling mogelijke negatieve effecten op de testorganismen gecompenseerd werden door de betere voedselcondities. Dit laatste fenomeen is o.a. eerder waargenomen bij larven van de dansmug (*Chironomus riparius*) welke een toenemende vervuilingsgraad met koper kan overleven als er maar voldoende kwalitatief goed voedsel voorradig is (De Haas et al., 2004). Het is in ieder geval duidelijk dat de geneesmiddelencocktail uit de 'MIX'-behandeling, gedurende de acht weken van het experiment, geen statistisch aantoonbaar nadelig effect had op de groei van waterpest (*Elodea canadensis*) en de populaties van de waterpissebed *Asellus aquaticus*, de watervlo *Daphnia magna*, de worm *Lubriculus variegatus* en de slak *Physella* sp.

Dit resultaat is niet in overeenstemming met de studie van Dietrich et al. (2010) die wel effecten konden aantonen van een mengsel van carbamazepine, diclofenac, 17 α -ethinylestradiol en metoprolol op de vierde generatie *Daphnia magna* terwijl er geen effecten werden waargenomen op de eerste drie generaties. Echter de resultaten van onze studie sluiten weer wel aan bij de waarnemingen van Lüring et al. (2006) en Borgmann et al. (2007) waarin ook geen eenduidige chronische effecten van blootstelling aan respectievelijk carbamazepine en een mengsel van zeven stoffen (acetaminofen, diclofenac, gemfibrozil, ibuprofen, naproxen, salicylic acid en triclosan) werden aangetoond op zowel *Daphnia pulex* en *Hyalella azteca*.

Hoewel er (in beperkte mate) literatuurgegevens beschikbaar zijn voor vissen die laten zien dat de huidige concentraties van (individuele) geneesmiddelen in het milieu onder het niveau liggen die effect bewerkstelligen, is het niet duidelijk of dit ook opgaat voor andere aquatische vertebraten zoals amfibieën. Amfibieën worden gekenmerkt door ingewikkeldere interne processen gedurende verschillende fases van hun ontwikkeling die sterk afwijken van de ontwikkeling die vis doormaakt.

Concluderend, in de huidige studie kon in acht weken geen direct nadelig effect op de geselecteerde waterorganismen (*Asellus aquaticus*, *Daphnia magna*, *Lumbriculus variegatus*, *Physa* sp. en *Elodea canadensis*) waargenomen worden bij blootstelling aan realistische concentraties van geneesmiddelen in het effluent (met relatief hoge concentraties van metformine, guanyl urea, metoprolol, sotalol, atenolol, irbersartan, hydrochloorthiazide, diclofenac en carbazepine bevatte). De blootstelling aan het effluent heeft eerder een stimulerende invloed (door de hogere voedingswaarde) op de populatiedichtheden van de geselecteerde testorganismen laten zien.

Dankwoord

De auteurs bedanken graag de collega's Wim Beltman, Arrienne Matser, Hans Zweers en Theo Brock voor hun inzet bij de discussies, het aanmaken van doseringen en het becommentariëren van teksten in dit project.

Referenties

- Bendz, D., N.A. Paxeus, T.R. Ginn en F.J. Loge, 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. Journal of Hazardous Materials **122**(3): 195-204.
- Bonnineau, C., H. Guasch, L. Proia, M. Ricart, A. Geiszinger, A.M. Romani en S. Sabater, 2010. Fluvial biofilms: A pertinent tool to assess beta-blockers toxicity. Aquatic Toxicology **96**(3): 225-233.
- Boonstra, H., E. Reichman en P. van den Brink, 2011. Effects of the Veterinary Pharmaceutical Ivermectin in Indoor Aquatic Microcosms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **60**(1): 77-89.
- Borgmann, U., D.T. Bennie, A.L. Ball en V. Palabrica, 2007. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. Chemosphere **66**(7): 1278-1283.
- Brain, R.A., D.J. Johnson, S.M. Richards, M.L. Hanson, H. Sanderson, M.W. Lam, C. Young, S.A. Mabury, P.K. Sibley en K.R. Solomon, 2004. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. Aquatic Toxicology **70**(1): 23-40.
- Brock, T.C.M., 1988. De invloed van waterplanten op hun omgeving. Waterplanten en waterkwaliteit. F.H.J.L. Bloemendaal en J.G.M. Roelofs, Stichting Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging: 27-41.
- Brock, T.C.M., A. Alix, C.D. Brown, E. Capri en E. Gottesburen, 2010. Linking Aquatic Exposure and Effects: Risk Assessment of Pesticides. Linking Aquatic Exposure and Effects in the Risk Assessment of Plant Products. T. C. M. Brock, A. Alix, C. D. Brown, E. Capri, B. F. F. Gottesburen, F. Heimbach, C. M. Lythgo, R. Schulz en E. Streloke. Boca Raton, London, New York SETAC Press & CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Brun, G.L., M. Bernier, R. Losier, K. Doe, P. Jackman en H.B. Lee, 2006. Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. Environmental Toxicology and Chemistry **25**(8): 2163-2176.
- Calamari, D., E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati en R. Fanelli, 2003. Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. Environmental Science & Technology **37**(7): 1241-1248.
- Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three beta-blockers found in the aquatic environment. Chemosphere **59**(2): 199-205.
- Crane, M., C. Watts en T. Boucard, 2006. "Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals." Science of the Total Environment **367**(1): 23-41.
- Cunningham, V.L., M. Buzby, T. Hutchinson, F. Mastrocco, N. Parke en N. Roden, 2006. Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps. Environmental Science & Technology **40**(11): 3456-3462.
- De Haas, E.M., L.M. Paumen, A.A. Koelmans en M.H.S. Kraak, 2004. Combined effects of copper and food on the midge *Chironomus riparius* in whole-sediment bioassays. Environmental Pollution **127**: 99-107.
- De Lange, H.J., W. Noordoven, A.J. Murk, M. Lurling en E. Peeters, 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. Aquatic Toxicology **78**(3): 209-216.
- Dietrich, S., F. Ploessl, F. Bracher en C. Laforsch, 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. Chemosphere **79**(1): 60-66.
- Fent, K. en K. Kümmerer, 2008. Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Organisms Pharmaceuticals in the Environment, Springer Berlin Heidelberg: 175-203.

- Fent, K., A.A. Weston en D. Caminada, 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology **76**(2): 122-159.
- Ferrari, B., N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio en J. Garric, 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. Ecotoxicology and Environmental Safety **55**(3): 359-370.
- Hoeger, B., B. Kollner, D.R. Dietrich and B. Hitzfeld, 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). Aquatic Toxicology **75**(1): 53-64.
- Huggett, D.B., B.W. Brooks, B. Peterson, C.M. Foran en D. Schlenk, 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **43**(2): 229-235.
- Kang, I.J., H. Yokota, Y. Oshima, Y. Tsuruda, T. Yamaguchi, M. Maeda, N. Imada, H. Tadokoro en T. Honjo, 2002. Effect of 17 beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere **47**(1): 71-80.
- Lüring, M., E. Sargant en I. Roessink, 2006. Life-history consequences for *Daphnia pulex* exposed to pharmaceutical carbamazepine. Environmental Toxicology **21**(2): 172-180.
- OECD Guideline 201, 1984. Alga, Growth Inhibition Test. Paris: 14.
- OECD Guideline 202, 2004. Guideline for the testing of chemicals, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Paris: 12.
- OECD Guideline 203, 1992. Guideline for testing of chemicals, Fish, Acute Toxicity Test. Paris, France: 9.
- OECD Guideline 211, 1998. *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris: 21.
- Sacher, F., M. Ehmann, S. Gabriel, C. Graf en H.J. Brauch, 2008. Pharmaceutical residues in the river Rhine - results of a one-decade monitoring programme. Journal of Environmental Monitoring **10**(5): 664-670.
- Sanderson, H. en M. Thomsen, 2009. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. Toxicology Letters **187**(2): 84-93.
- Vethaak, A.D., G.B. J. Rijs, S.M. Schrap, H. Ruiter, A. Gerritsen en J. Lahr, 2002. Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands; Occurrence, Potency and Biological Effects, RIZA/RIKZ: 297.

Bijlage 1 Overzicht chemische analyse

	<i>Sample:</i>	<i>Effluent</i>	<i>Effluent</i>	<i>Effluent</i>
	<i>Date:</i>	15-12-2011	11-1-2012	26-1-2012
Di-(2-ethylhexyl)phthalate	µg/L	< 1	< 1	< 1
Di-n-butylphthalate	µg/L	< 1	< 1	< 1
Diethylphthalate	µg/L	< 1	< 1	< 1
Acetylsalicylic acid	µg/L	< 1	< 1	< 1
Salicylic acid	µg/L	< 1	< 1	< 1
Diclofenac	µg/L	0.71	0.64	0.78
Ibuprofen	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5
Carbamazepine	µg/L	0.82	0.93	0.90
Bezafibrate	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5
Gemfibrozil	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5
Hydrochlorothiazide	µg/L	5.0	5.4	5.6
Irbesartan	µg/L	2.2	3.6	3.7
Valsartan	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5
Erythromycin A	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Anhydroerythromycin A	µg/L	0.20	0.20	0.18
Lincomycin	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Azithromycin	µg/L	0.16	0.17	0.26
Clarithromycin	µg/L	0.15	0.14	0.13
Phenazone	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Sotalol	µg/L	4.2	4.0	4.1
Atenolol	µg/L	0.32	0.34	0.33
Metoprolol	µg/L	1.6	3.0	3.0
Diatrizoic Acid	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Iohexol	µg/L	0.080	0.53	0.46
Iomeprol	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Iopamidol	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Iopromide	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Iotalamic acid	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Ioxaglic acid	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Ioxithalamic acid	µg/L	0.27	0.36	0.35
Naproxen	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Ciprofloxacin	µg/L	0.22	0.24	0.22
Sulfamethoxazole	µg/L	0.52	0.56	0.52
iso-Nonylphenol diethoxylate	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5
iso-Nonylphenol monoethoxylate	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5

Waarden weergegeven als 'kleiner dan' zijn waarden die beneden de 'limiet van kwantificering' vielen en zijn daarom op die limiet afgekapt.

<i>Sample:</i>		Effluent	Effluent	Effluent
<i>Date:</i>		15-12-2011	11-1-2012	26-1-2012
Bisphenol A	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
17-alpha-Ethinylestradiol	µg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01
17-beta-Estradiol	µg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Estrone	µg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Mestranol	µg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Atrazine	µg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Toxaphene	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
alpha-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
beta-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
delta-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
epsilon-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
gamma-HCH (Lindane)	µg/L	< 0.05	< 0.05	< 0.05
BDE-100	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
BDE-138	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
BDE-153	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
BDE-154	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
BDE-28	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
BDE-47	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
BDE-85	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
BDE-99	µg/L	< 0.050	< 0.050	< 0.050
Metformin	µg/L	2.5	2.4	2.3
Guanyl urea	µg/L	59	63	63

Waarden weergegeven als 'kleiner dan' zijn waarden die beneden de 'limiet van kwantificering' vielen en daarom op die limiet zijn afgekapt.

	<i>Sample:</i>	Effluent 4	Effluent 2	average	SH Water	Mix 4	Mix 4
	<i>Date:</i>	28-12-2011	28-12-2011		1-2-2012	15-12-2011	28-12-2011
Di-(2-ethylhexyl)phthalate	µg/L	< 1	< 1		< 1	-	-
Di-n-butylphthalate	µg/L	< 1	< 1		< 1	-	-
Diethylphthalate	µg/L	< 1	< 1		< 1	-	-
Acetylsalicylic acid	µg/L	< 0.1	< 1		< 1	-	-
Salicylic acid	µg/L	< 0.1	< 1		< 1	-	-
Diclofenac	µg/L	0.28	< 0.5	0.28	< 0.5	0.49	0.073
Ibuprofen	µg/L	< 0.05	< 0.5		< 0.5	-	-
Carbamazepine	µg/L	0.69	0.70	0.70	< 0.5	0.46	0.27
Bezafibrate	µg/L	< 0.05	< 0.5		< 0.5	-	-
Gemfibrozil	µg/L	0.38	< 0.5	0.38	< 0.5	-	-
Hydrochlorothiazide	µg/L	2.2	2.1	2.15	< 0.05	0.87	0.17
Irbesartan	µg/L	0.36	0.51	0.44	< 0.5	2.5	0.89
Valsartan	µg/L	0.074	< 0.5	0.07	< 0.5	-	-
Erythromycin A	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Anhydroerythromycin A	µg/L	0.085	0.093	0.09	< 0.05	-	-
Lincomycin	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Azithromycin	µg/L	< 0.05	< 0.05		0.11	-	-
Clarithromycin	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Phenazone	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Sotalol	µg/L	1.8	1.9	1.85	< 0.05	1.4	0.40
Atenolol	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	0.60	0.053
Metoprolol	µg/L	0.50	0.65	0.58	< 0.05	1.4	0.44
Diatrizoic Acid	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Iohexol	µg/L	0.54	0.54	0.54	< 0.05	-	-
Iomeprol	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Iopamidol	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Iopromide	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Iotalamic acid	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Ioxaglic acid	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Ioxithalamic acid	µg/L	0.34	0.36	0.35	< 0.05	-	-
Naproxen	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Ciprofloxacin	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
Sulfamethoxazole	µg/L	0.60	0.64	0.62	< 0.05	-	-
iso-Nonylphenol diethoxylate	µg/L	< 0.13	< 0.5		< 0.5	-	-
iso-Nonylphenol monoethoxylate	µg/L	< 0.13	< 0.5		< 0.5	-	-
Bisphenol A	µg/L	0.074	< 0.05	0.07	< 0.05	-	-

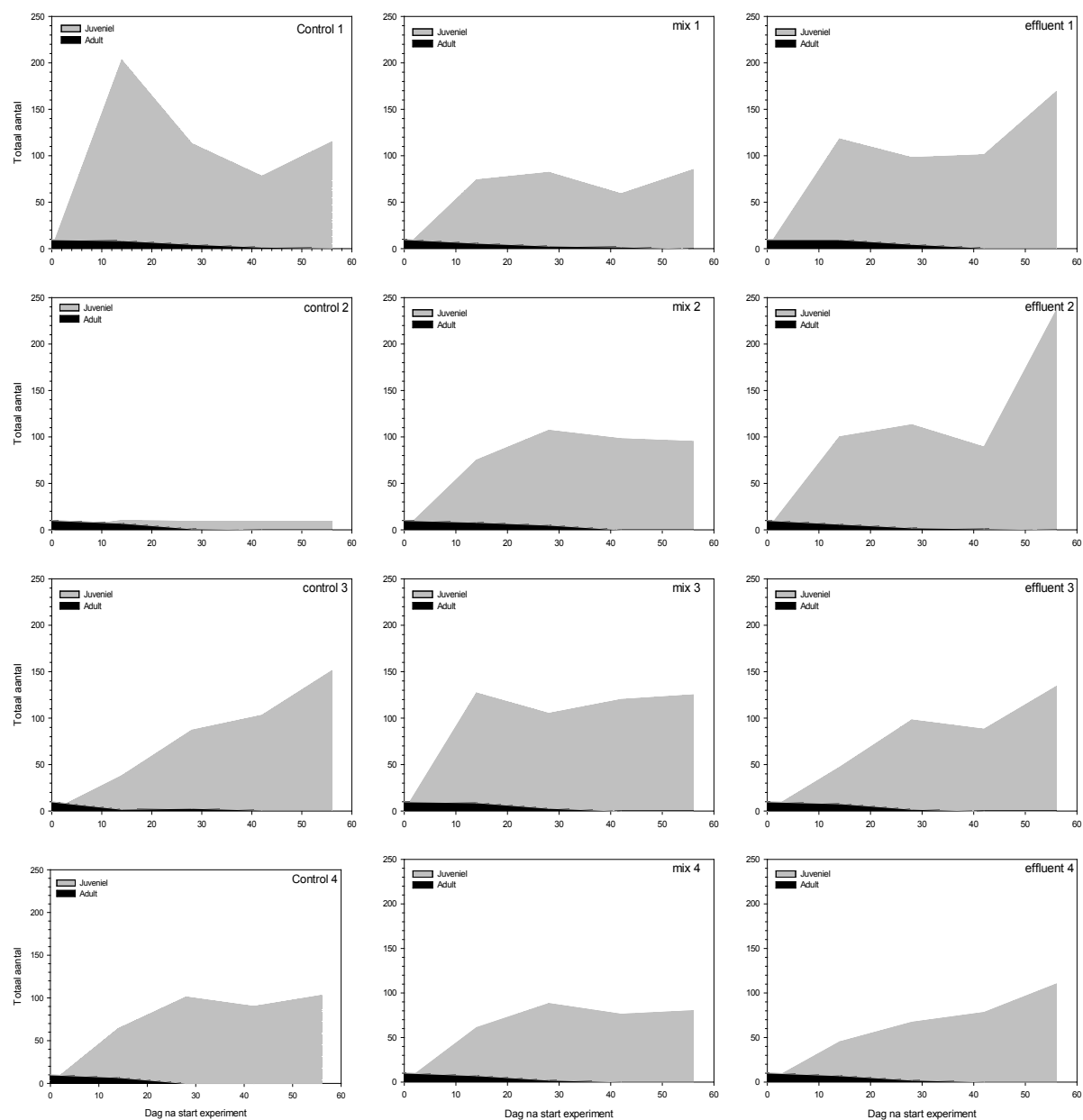
Waarden weergeven als 'kleiner dan' zijn waarden die beneden de 'limiet van kwantificering' vielen en daarom op die limiet zijn afgekapt.

	<i>Sample</i> :	Effluent 4	Effluent 2	average	SH Water	Mix 4	Mix 4
	<i>Date:</i>	28-12-2011	28-12-2011		1-2-2012	15-12-2011	28-12-2011
17-alpha-Ethinylestradiol	µg/L	< 0.005	< 0.01		< 0.01	-	-
17-beta-Estradiol	µg/L	< 0.005	< 0.01		< 0.01	-	-
Estrone	µg/L	< 0.005	< 0.01		< 0.01	-	-
Mestranol	µg/L	< 0.005	< 0.01		< 0.01	-	-
Atrazine	µg/L	< 0.1	< 0.1		< 0.1	-	-
Toxaphene	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
alpha-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
beta-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
delta-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
epsilon-HCH	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
gamma-HCH (Lindane)	µg/L	< 0.05	< 0.05		< 0.05	-	-
BDE-100	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
BDE-138	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
BDE-153	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
BDE-154	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
BDE-28	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
BDE-47	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
BDE-85	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
BDE-99	µg/L	< 0.050	< 0.050		< 0.050	-	-
Metformin	µg/L	1.7	1.7	1.70	< 0.02	4.3	2.1
Guanyl urea	µg/L	39	38	38.50	< 0.02	48	6.5

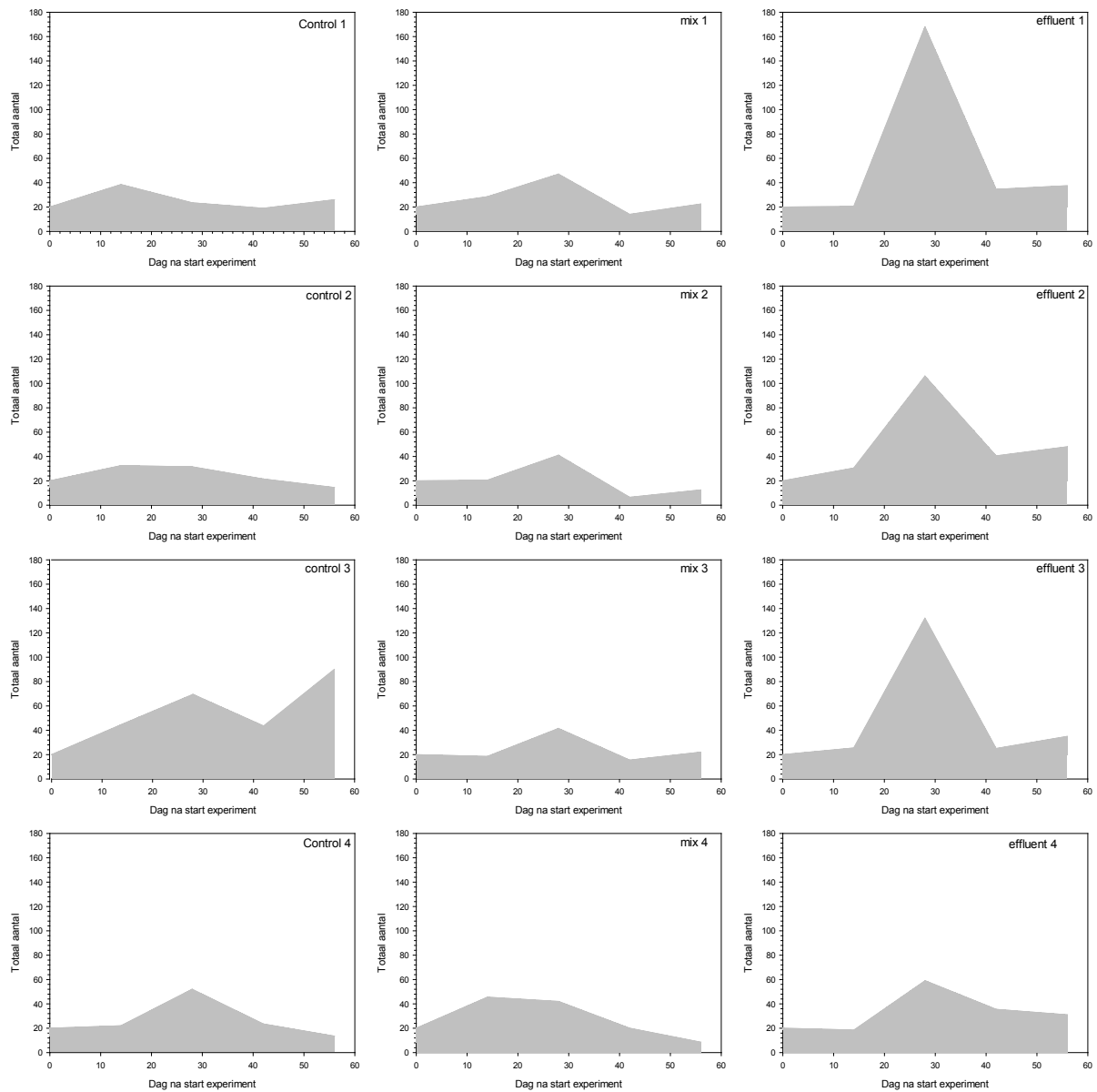
Waarden weergegeven als 'kleiner dan' betroffen waarden die beneden de 'limiet van kwantificering' vielen en zijn daarom op die limiet zijn afgekappt.

Bijlage 2 Testorganismen per testsysteem

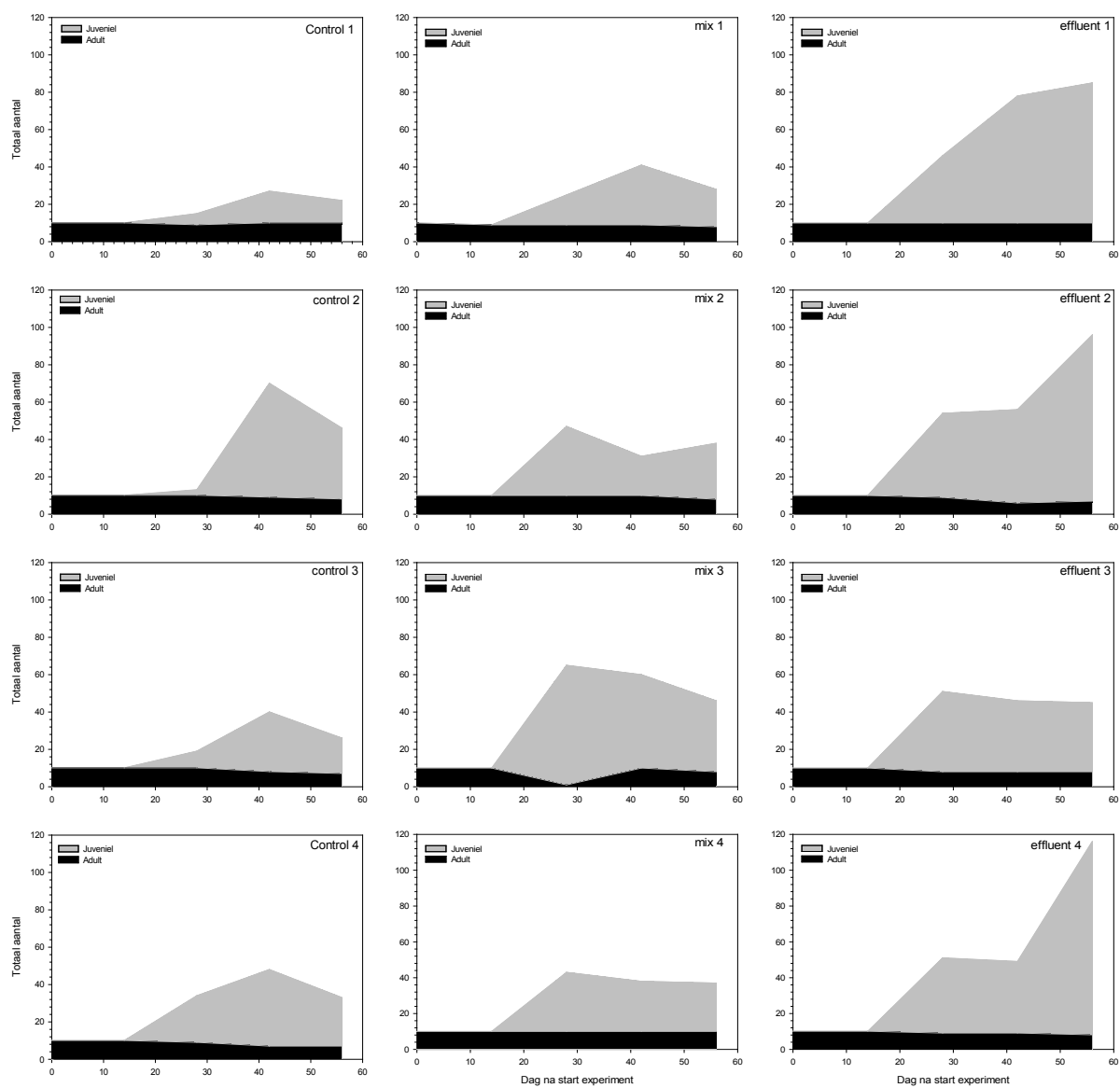
Asellus aquaticus (waterpissebed)



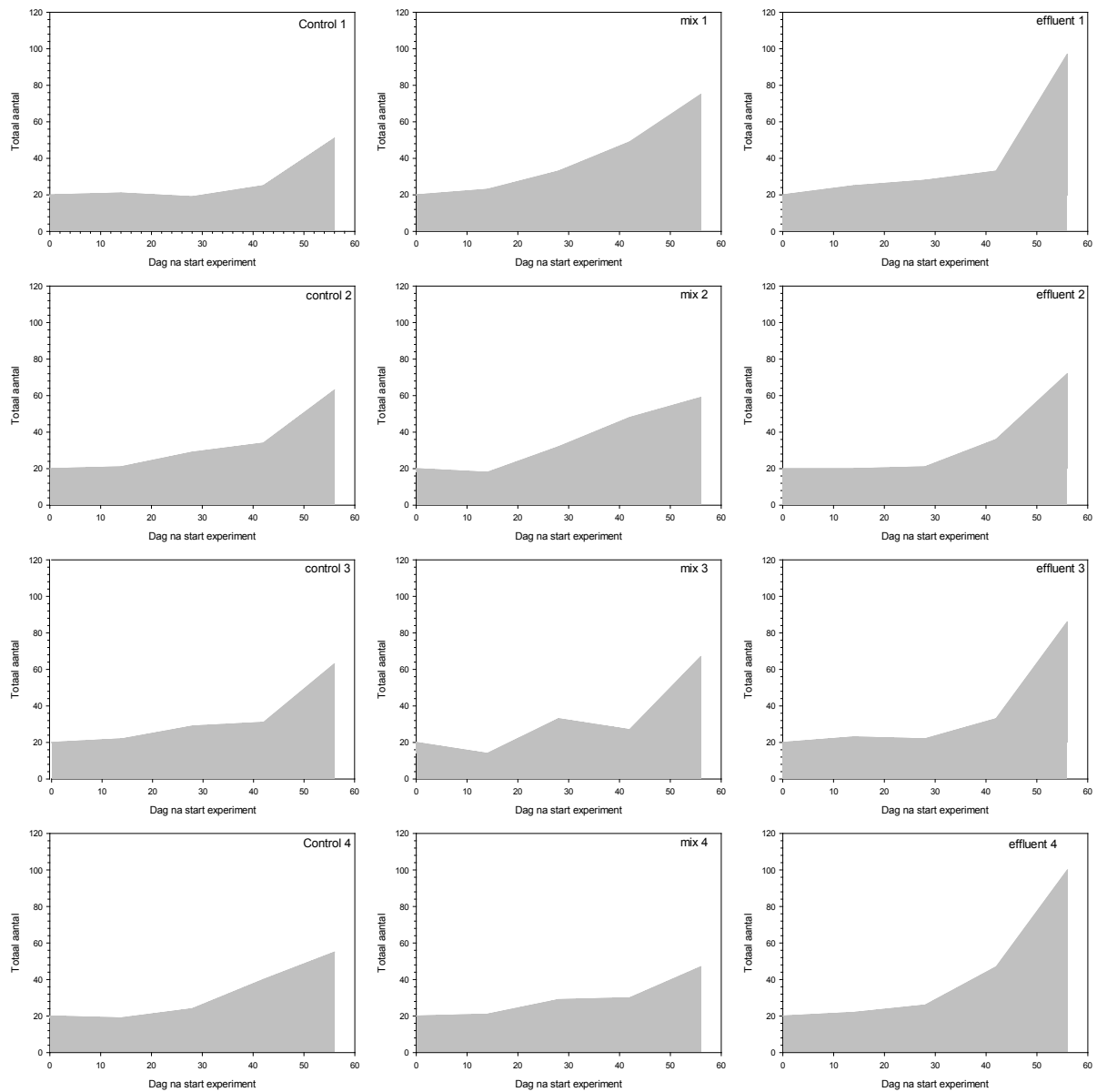
Daphnia magna (watervlo)



Physella sp. (slak)



Lumbricus variegatus (worm)



Bijlage 3 Resultaten statistiek

Statistics per treatment

asellus totaal

date ANOVA

14-12-2011	- F(ANOVA) = 0.016 < Fcrit = 4.260 * non parametric sites (KS-test)
29-12-2011	- F(ANOVA) = 0.439 < Fcrit = 4.260
12-1-2012	- F(ANOVA) = 0.545 < Fcrit = 4.260
25-1-2012	- F(ANOVA) = 2.530 < Fcrit = 4.260

Statistics per treatment

daphnia/L

date ANOVA

14-12-2011	- F(ANOVA) = 1.270 < Fcrit = 4.260
29-12-2011	* F(ANOVA) = 8.334 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 11.619 > X ² crit =
12-1-2012	* F(ANOVA) = 6.109 > Fcrit = 4.260 * non parametric sites (KS-test)
25-1-2012	- F(ANOVA) = 1.190 < Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 8.996 > X ² crit =

Statistics per treatment

slak totaal

date ANOVA

14-12-2011	! No ANOVA, MSSr=0
29-12-2011	* F(ANOVA) = 8.408 > Fcrit = 4.260
12-1-2012	- F(ANOVA) = 1.025 < Fcrit = 4.260
25-1-2012	* F(ANOVA) = 9.912 > Fcrit = 4.260

Statistics per treatment

lumbriculus

date ANOVA

14-12-2011	- F(ANOVA) = 1.729 < Fcrit = 4.260
29-12-2011	* F(ANOVA) = 5.318 > Fcrit = 4.260
12-1-2012	- F(ANOVA) = 0.551 < Fcrit = 4.260
25-1-2012	* F(ANOVA) = 9.878 > Fcrit = 4.260

Velden gemarkeerd met * geven aan dat er een statistisch verschil tussen behandelingen bestaat. Vanuit de bijbehorende grafieken kan worden afgeleid welke behandeling(en) statistisch significant verschillen.

Statistics per treatment	
pH	
date	ANOVA
1-12-2011	- F(ANOVA) = 4.061 < Fcrit = 4.260 * non parametric sites (KS-test)
15-12-2011	* F(ANOVA) = 8.382 > Fcrit = 4.260
28-12-2011	* F(ANOVA) = 9.688 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 18.783 > X ² crit =
4-1-2012	* F(ANOVA) = 8.162 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 9.471 > X ² crit =
11-1-2012	* F(ANOVA) = 39.772 > Fcrit = 4.260
17-1-2012	* F(ANOVA) = 112.149 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 6.521 > X ² crit =
25-1-2012	* F(ANOVA) = 96.481 > Fcrit = 4.260

Statistics per treatment	
EGV (us/cm)	
date	ANOVA
1-12-2011	* F(ANOVA) = > 1 E6 > Fcrit = 4.260
15-12-2011	* F(ANOVA) = 43980 > Fcrit = 4.260
28-12-2011	* F(ANOVA) = 117.287 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 18.618 > X ² crit =
4-1-2012	* F(ANOVA) = 216.889 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 10.801 > X ² crit =
11-1-2012	* F(ANOVA) = 489.783 > Fcrit = 4.260
17-1-2012	* F(ANOVA) = 1376 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 8.566 > X ² crit =
25-1-2012	* F(ANOVA) = 329.355 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 7.356 > X ² crit =

Statistics per treatment	
O2 (mg/l)	
date	ANOVA
1-12-2011	* F(ANOVA) = 27.558 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 8.540 > X ² crit =
15-12-2011	* F(ANOVA) = 18.708 > Fcrit = 4.260
28-12-2011	* F(ANOVA) = 35.181 > Fcrit = 4.260 * X ² (Bart) = 7.896 > X ² crit =
4-1-2012	* F(ANOVA) = 11.739 > Fcrit = 4.260
11-1-2012	* F(ANOVA) = 22.831 > Fcrit = 4.260
17-1-2012	* F(ANOVA) = 102.895 > Fcrit = 4.260
25-1-2012	* F(ANOVA) = 358.278 > Fcrit = 4.260

Velden gemarkeerd met * geven aan dat er een statistisch verschil tussen behandelingen bestaat. Vanuit de bijbehorende grafieken kan worden afgeleid welke behandeling(en) statistisch significant verschillen.

Statistics per treatment	
Chl-a (ug/l)	
date	ANOVA
1-12-2011	! No ANOVA, MSSr=0
15-12-2011	! No ANOVA, MSSr=0
28-12-2011	! No ANOVA, MSSr=0
4-1-2012	! No ANOVA, MSSr=0
11-1-2012	! No ANOVA, MSSr=0
17-1-2012	! No ANOVA, MSSr=0
25-1-2012	! No ANOVA, MSSr=0

Velden gemarkeerd met * geven aan dat er een statistisch verschil tussen behandelingen bestaat. Vanuit de bijbehorende grafieken kan worden afgeleid welke behandeling(en) statistisch significant verschillen.



Alterra is onderdeel van de internationale kennisorganisatie Wageningen UR (University & Research centre). De missie is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen UR bundelen negen gespecialiseerde en meer toegepaste onderzoeksinstituten, Wageningen University en hogeschool Van Hall Larenstein hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 40 vestigingen (in Nederland, Brazilië en China), 6.500 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen UR wereldwijd tot de vooraanstaande kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen natuurwetenschappelijke, technologische en maatschappijwetenschappelijke disciplines vormen het hart van de Wageningen Aanpak.

Alterra Wageningen UR is het kennisinstituut voor de groene leefomgeving en bundelt een grote hoeveelheid expertise op het gebied van de groene ruimte en het duurzaam maatschappelijk gebruik ervan: kennis van water, natuur, bos, milieu, bodem, landschap, klimaat, landgebruik, recreatie etc.

Meer informatie: www.alterra.wur.nl