

De invloed van moerassystemen op de milieukwaliteit van rwzi effluent en aanbevelingen tot optimalisering

Samenvattend rapport



*Waterharmonica Improving Purification Effectiveness
(Moeraszuiver afvalwater)*



Colofon

Projectcoördinatie:	Edwin Foekema,	IMARES
Projectleiders:	Erwin Roex, Edwin Foekema, Tinka Murk, Ron van der Oost,	Deltares IMARES Wageningen Universiteit Waternet
Auteurs:	Erwin Roex Foppe Smedes Alette Langenhoff Jasperien de Weert Habiba Mizab Edwin Foekema Andrea Sneekes Erika Koelemij Maadjieda Tjon Atsoi Gerrit Hoornsman Arnold Bakker Henry Beeltje Ron van der Oost Yolanda Dullemont Tinka Murk Hans van de Berg Bram T.M. Mulling Daan Mes Anne de Valença Tim Williams Kevin Chipman	Deltares Deltares Deltares Deltares Deltares IMARES IMARES IMARES IMARES IMARES IMARES TNO Waternet Waternet Wageningen Universiteit Wageningen Universiteit Universiteit van Amsterdam Universiteit van Amsterdam Universiteit van Amsterdam University of Birmingham University of Birmingham
Betrokken Waterschappen:		
Waterschap de Dommel	Jan-Evert van Veldhoven, Han van Happen	
Waterschap Aa en Maas	Mark Elders, Wim van der Hulst, Dries Jacobs, Maurice Schellekens,	
Wetterskip Fryslân	Sybren Gerbens, Theo Claasen, Rinse van der Kooij	

Refereren als:

Foekema E.M. (Ed). (2012). De invloed van moerassystemen op de milieukwaliteit van rwzi effluent en aanbevelingen tot optimalisering. IMARES rapport C005/12 (rapportage bestaat uit een samenvattend rapport met losse bijlagen A en B)

Samenvatting

Zuiveringsmoerassen hebben een positieve invloed op de milieukwaliteit van effluent uit rioolwaterzuiveringen. Naast reeds bekende effecten als het terugbrengen van nutriënten gehalten en het verhogen van de biodiversiteit, blijken de moerassen ook het risico op het ontstaan van toxische effecten als het effluent tijdelijk van mindere kwaliteit is, te verminderen. Bovendien worden ziekteverwekkende micro-organismen effectief verwijderd.

In het project WIPE (Waterharmonica Improving Purification Effectiveness) is onderzocht wat het effect van een zuiveringsmoeras (waterharmonica) op de kwaliteit van RWZI-effluent is, met als uiteindelijk doel aanbevelingen te formuleren hoe de inrichting van zuiveringsmoerassen geoptimaliseerd kan worden. De focus van het onderzoek lag op risico's van stoffen en pathogenen die in RWZI-effluent aanwezig kunnen zijn en die bij een reguliere RWZI direct in oppervlaktewater geloosd worden. Het project liep tussen april 2009 en oktober 2011 en werd gesubsidieerd vanuit de Innovatieregeling Kaderrichtlijn Water 2008 van het Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Het project werd uitgevoerd door IMARES, Deltares, Waternet en de Universiteit van Wageningen, in samenwerking met Wetterskip Fryslân, Waterschap AA en Maas en Waterschap de Dommel die elk een RWZI met zuiveringsmoeras in beheer hebben die als onderzoekslocatie dienst deden.

Verschillende nieuwe meettechnieken zijn ingezet. Door gebruik te maken van een passieve sampler was het mogelijk om de concentratie van een breed scala aan stoffen met een zeer laag detectieniveau aan te tonen in tijdgeïntegreerde monsters. Met een batterij aan bioassays werd de potentiële toxiciteit geanalyseerd in geconcentreerde watermonsters, waardoor met kortdurende testen een indicatie voor risico bij chronische blootstelling kon worden geschat. Door analyse van de genexpressie van blootgestelde stekelbaarzen werden fysiologische responsen van de vissen in kaart gebracht die indicatief zijn voor blootstelling aan stoffen uit het effluent. Doordat tevens groei en voortplanting van chronisch blootgestelde stekelbaarzen werd bepaald, kon worden vastgesteld dat deze fysiologische responsen niet op deze punten tot problemen leidden.

De effluënten zoals deze door de onderzochte rwzi's geproduceerd worden, zullen doorgaans geen grote milieurisico's opleveren, maar periodiek is wel sprake van risico op effecten bij chronische blootstelling, voor een groot deel samenhangend met de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen. De ziekteverwekkende micro-organismen in het effluent leveren bovendien een risico voor de volksgezondheid bij lozing in de nabijheid van zwemwater. Door het effluent door zuiveringsmoerassen te leiden worden tijdelijke (calamiteuze) pieken in toxiciteit in het moerassysteem afgevlakt. Waarschijnlijk speelt vooral menging een grote rol, mogelijk in combinatie met absorptie aan sediment. Tijdens het doorlopen van het zuiveringsmoeras worden ook de dichtheden ziekteverwekkende bacteriën sterk verlaagd. Voor een belangrijk deel als gevolg van predatie door ongewervelden.

Voor de zuiverende werking van het moerassysteem lijkt vooral voldoende verblijftijd en een goede menging van het effluent van belang. Dit kan worden geoptimaliseerd door de verblijftijd in de rietsloten te verhogen, eventueel ten koste van het volgende compartiment, waarvan de bijdrage minder duidelijk is. Verdere verbetering kan worden bereikt door het bevorderen van de zuurstofuitwisseling door het aanbrengen van cascades en ondiepe delen in het tweede deel van het zuiveringsmoeras. Hierdoor zal de microbiële afbraak van (bijvoorbeeld hormoonverstorende) stoffen en de verwijdering van pathogenen geoptimaliseerd worden. Er zijn geen harde aanwijzingen gevonden dat het effluent na het passeren van de rietvelden risico oplevert voor vissen. Het moet echter zoveel mogelijk worden voorkomen dat vissen dieper het moeras intrekken omdat hierdoor de verwijdering van pathogenen kan worden beperkt doordat de vissen het hiervoor belangrijke zooplankton begrazen. Bovendien kan niet worden uitgesloten dat de vissen hier toch toxicologische effecten ondervinden.

Inhoudsopgave

Samenvatting.....	3
1 Het project WIPE	7
1.1 Inleiding.....	7
1.2 Onderzoekslocaties.....	8
1.3 Projectopzet.....	10
2 Projectresultaten in het kort	13
2.1 Wat is de (meer)waarde van de gebruikte onderzoeksmethoden?	13
2.2 Is er een milieurisico van het rwzi effluent?	16
2.3 Vermindert een zuiveringsmoeras het milieurisico?	18
2.4 Zijn zuiveringsmoerassen te optimaliseren?.....	21
3 Samenvattingen deelonderzoeken	23
3.1 Beoordeling zuiveringsrendement van zuiveringsmoerassen voor organische microverontreinigingen met behulp van passieve sampling (Deltares)	23
3.2 In-vitro bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen (Wageningen Universiteit)	27
3.3 In-vivo bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen (IMARES)	29
3.4 Overleving en reproductie van driedoornige stekelbaarzen in rwzi-zuiveringsmoerassen (IMARES).....	30
3.5 Rol van micro-organismen in rwzi-zuiveringsmoerassen bij de afbraak van estrogenen (Deltares)	32
3.6 Stekelbaars transcriptomics in relatie tot de waterkwaliteit van de rwzi-zuiveringsmoerassen (Waternet).....	35
3.7 Factoren gerelateerd aan de vermindering van pathogenen in de rwzi-zuiveringsmoerassen (Waternet).....	40

1 Het project WIPE

1.1 Inleiding

De Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) verplicht de EU-staten tot het bereiken van een goede ecologische en chemische kwaliteit van het oppervlaktewater in 2015. Ondanks effectieve zuiveringstechnieken vormen rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) nog belangrijke (punt)bronnen van nutriënten en verontreinigingen en zijn daarmee nog steeds een potentiële bedreiging voor de doelen van de KRW. Bovendien vormen rwzi effluenten een potentiële bron voor microbiële verontreiniging van het oppervlaktewater met humane fecale bacteriën, waaronder mogelijk pathogenen.

Bij verschillende rwzi's worden dan ook maatregelen getroffen om het effluent uit de rwzi verder te reinigen voordat het geloosd wordt, bijvoorbeeld door het toepassing van actiefkoolfiltratie (Stowa, 2010).

Een alternatieve nabehandeling van effluent is de toepassing van het zogenaamde 'waterharmonica-concept'; zie: www.waterharmonica.nl), waarbij het effluent door een zuiveringsmoeras gevoerd wordt voordat het op het oppervlaktewater geloosd wordt. Deze '*ecological engineering approach*' kan resulteren in een reductie van gehalten zware metalen, nutriënten, bacteriën en slib in het effluent en heeft bovendien een gunstig effect op zuurstofdynamiek en de biodiversiteit (Knox et al, 2008; Molleda et al, 2008, Reinoso et al 2008). Als gevolg van de relatief lage kosten en de toegevoegde ecologische waarde worden dergelijke moerassystemen in Nederland steeds vaker ingezet voor nabehandeling van rwzi effluent. Hoewel de huidige moerassystemen al een duidelijke toegevoegde waarde hebben, blijven er vragen over het gedrag van toxische stoffen en pathogenen in een dergelijk systeem. Met meer inzicht in de effectiviteit van moerassystemen op dit vlak kan de inrichting van moerassystemen mogelijk worden geoptimaliseerd. Deze vragen zijn temeer interessant vanwege het feit dat moerassystemen in de praktijk gekoppeld worden aan potentiële natuurontwikkeling.

In het project WIPE (Waterharmonica Improving Purification Effectiveness) is daarom onderzocht of zuiveringsmoerassen ook een bijdrage kunnen leveren aan de vermindering van het risico op milieueffecten door rwzi-effluenten.

De hoofddoelen van het project waren:

- het onderzoeken van de invloed van een zuiveringsmoeras op de kwaliteit van het rwzi effluent met name gericht op toxiciteit en het voorkomen van pathogenen;
- het geven van aanbevelingen voor een optimaal ontwerp van moerassystemen voor de nazuivering van rwzi-effluent, bij voorkeur in combinatie met natuurontwikkeling zonder nadelige ecotoxicologische consequenties.

Tevens zou het project inzicht moeten geven in de praktische toepasbaarheid van nieuwe (effect)monitoringstechnieken als passieve samplers, nieuw ontwikkelde effectspecifieke assays en genetische biomarkers.

Het project werd uitgevoerd tussen april 2009 en oktober 2011 door IMARES, Deltares, Waternet en de Wageningen Universiteit. Er werd samengewerkt met Wetterskip Fryslân, Waterschap Aa en Maas en Waterschap de Dommel. WIPE werd gesubsidieerd vanuit de Innovatieregeling Kaderrichtlijn Water 2008 van het Ministerie van Infrastructuur en Milieu (projectnummer KRW0829).

Het voorliggende rapport bevat een samenvatting van de bevindingen van het WIPE project. Voor de volledigheid zijn de samenvattingen van de achterliggende deelrapportages als bijlage in dit samenvattend rapport opgenomen.

Details over de individuele projectonderdelen zijn vastgelegd in twee bijlage rapporten:

Bijlage rapport A bevat de volgende deelrapportages:

1. Beoordeling zuiveringsrendement van zuiveringsmoerassen voor organische micro-verontreinigingen met behulp van passieve sampling
2. In-vitro bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen
3. In-vivo bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen
4. Overleving en reproductie van driedoornige stekelbaarzen in rwzi-zuiveringsmoerassen
5. Rol van micro-organismen in rwzi-zuiveringsmoerassen bij de afbraak van estrogene

Bijlage rapport B bevat de deelrapportages (in Engels met Nederlandse samenvattingen):

6. Stekelbaars transcriptomics in relatie tot de waterkwaliteit van de rwzi-zuiveringsmoerassen
7. Factoren gerelateerd aan de vermindering van pathogenen in de rwzi-zuiveringsmoerassen

1.2 Onderzoekslocaties

Tabel 1 Karakteristieken van de rwzi's met zuiveringsmoerassen die dienst deden als onderzoekslocaties

	Rwzi Grou	Rwzi Hapert	Rwzi Land van Cuijk
Waterschap	Wetterskip Fryslân	Waterschap De Dommel	Waterschap Aa en Maas
Adres	Molesingel 2 9001 ZD Grou	Castersedijk 25 5527 JR Hapert	Beijersbos 4 5443 PL Haps
Type zuivering	Carrousel	Oxidatiesloot	Actief-slibinstallatie
Capaciteit i.e. à 136 gr. TZV/dag	25.000 i.e.	71.000 i.e.	175.000 i.e.
Hydraulische capaciteit DWA		718 m ³ /uur	2.500 m ³ /uur
Hydraulische capaciteit RWA	1.140 m ³ /uur	2.543 m ³ /uur	8.000 m ³ /uur
Ontvangend water	Kromme Grouw	Grote Beerze	Maas
Afvalwater bronnen	Huishoudelijk ca. 75%, Bedrijven (agrarisch, watersport) ca. 25% enkele verzorgingstehuizen	Huishoudelijk en Industrieel afvalwater	Huishoudelijk ca. 50%, industriële ca 50%, ziekenhuis
Zuiveringsmoeras vanaf	2006	2001	1999
Effluentaandeel door moeras	Constant: 1200 m ³ /d	33% van rwzi effluent (zuidelijk moerassysteem)	Variabel 5-50% van rwzi effluent
Oppervlak (totaal)	Ca. 0,8ha	Ca. 2,1 ha (zuidelijk moerassysteem)	Ca. 3 ha
Oppervlakte bezinkvijver	0,1ha	0,6 ha	0,5 ha
Oppervlakte rietvelden	0,4ha	0,9 ha	2,0 ha
Oppervlakte 3 ^e compartiment	0,3 ha	1,6 ha	0,5 ha
Verblijftijd	Ca. 3 dagen	Variabel, gemiddeld ca. 3 dagen	Variabel, gemiddeld ca. 4 dagen

Voor het onderzoek zijn drie rwzi's geselecteerd waar zuiveringmoerassysteem reeds gedurende enige tijd in gebruik zijn. Het betreft rwzi Grou (Figuur 1), rwzi Hapert (Figuur 2) en rwzi Land van Cuijk (Figuur 3). In het moerassysteem van elk van deze rwzi's kunnen drie compartimenten worden onderscheiden waar het effluent vanuit de rwzi successievelijk doorheen geleid wordt voordat het wordt geloosd op het oppervlaktewater. De eerste twee compartimenten worden op elke locatie gevormd door respectievelijk een 'bezinkvijver' en 'rietvelden'. De inrichting van het derde compartiment verschilt per locatie. Bij rwzi Grou bestaat dit uit een lagune ingericht als paaibiotop

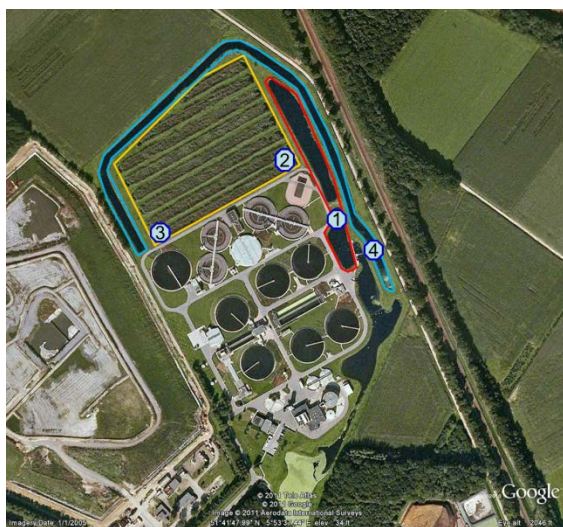
voor vis (men name gericht op snoek) met een open verbinding naar het oppervlaktewater. Bij rwzi Land van Cuijk wordt het derde compartiment gevormd door een afvoersloot, terwijl het bij rwzi Hapert is ingericht als een moerasbos. Enkele karakteristieken van de rwz'si en de bijgelegen zuiveringsmoerassen zijn gegeven in Tabel 1.



Figuur 1 *Rwzi Grou met zuiveringsmoeras bestaande uit een bezinkvijver (Rood omkaderd), rietvelden (geel omkaderd) en lagune (blauw omkaderd). De nummers 1 tot en met 4 geven de bemonsteringsposities weer.*



Figuur 2 *Rwzi Hapert met zuiveringsmoeras bestaande uit een bezinkvijver (Rood omkaderd), rietvelden (geel omkaderd) en moerasbos (blauw omkaderd). De nummers 1 tot en met 4 geven de bemonsteringsposities weer.*



Figuur 3 *Rwzi Land van Cuijk met zuiveringsmoeras bestaande uit een bezinkvijver (Rood omkaderd), rietvelden (geel omkaderd) en afvoersloot (blauw omkaderd). De nummers 1 tot en met 4 geven de bemonsteringsposities weer.*

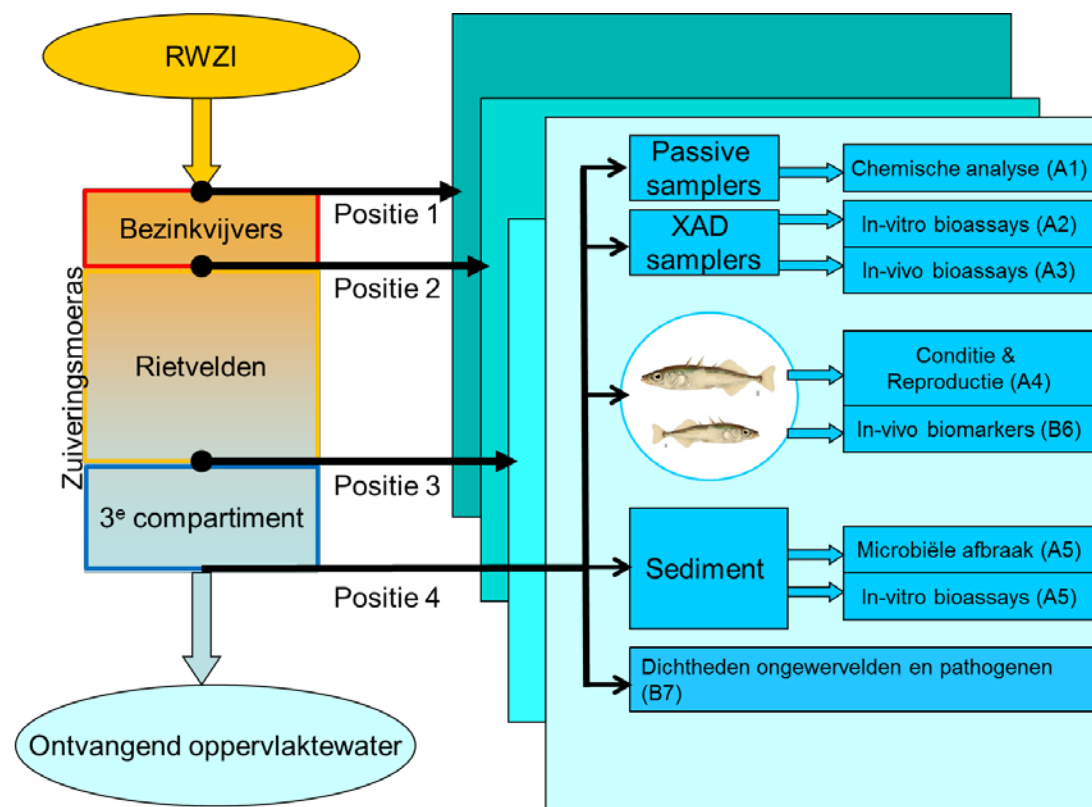
1.3 Projectopzet

1.3.1 Bemonsteringsposities

Alle onderzoekslocaties zijn tussen het voorjaar 2009 en najaar 2010 regelmatig bemonsterd op vier posities (Figuur 4) die representatief zijn voor

- het effluent zoals dat op het moeras geloosd wordt (positie 1),
- na passage van de bezinkvijvers (positie 2),
- na passage van de rietvelden (positie 3) en
- na passage van het 3e compartiment, dus zoals het uiteindelijk op het oppervlaktewater geloosd wordt (positie 4).

In de praktijk bleek het niet mogelijk om de monsterposities exact in de overgangen tussen de compartimenten aan te brengen en werden de ideale posities zoveel mogelijk benaderd (Figuur 1, Figuur 2, Figuur 3).



Figuur 4 Schematische voorstelling van het onderzoeksprogramma van het WIPE-project per onderzoekslocatie (rwzi's) op de 4 bemonsteringsposities. De codes tussen haakjes verwijzen naar de deelrapportages van deze onderwerpen zoals opgenomen in de bijlage rapporten A (deelrapportage 1 t/m 5) en B (deelrapportages 6 en 7). De nummers in de codes verwijzen tevens naar de samenvattingen die zijn opgegeven in hoofdstuk 3 van dit rapport.

1.3.2 Bemonstering

In principe werd op elke positie en op elke locatie hetzelfde chemische en biologische bemonsteringsprogramma uitgevoerd, zoals hieronder beknopt beschreven. Meer uitgebreide beschrijvingen en de resultaten zijn vastgelegd in individuele achtergrond documenten.

Chemische analyses met passieve samplers

Met behulp van passieve samplers van siliconen rubber zijn tijdgeïntegreerde bemonsteringen uitgevoerd. De passieve samplers werden hiertoe gedurende meerdere weken op de bemonsteringsposities uitgehangen en concentreerden in die periode een breed scala aan milieuvreemde stoffen uit het effluent. Door chemische analyse van deze samplers is een beeld verkregen van de aanwezigheid van milieuvreemde stoffen in het effluent op de verschillende posities in de zuiveringsmoerassen, waaruit de invloed van de zuiveringsmoerassen op de aanwezigheid van deze stoffen kon worden bepaald. Bovendien zijn de gehalten gebruikt voor het berekenen van het milieurisico van het effluent op de verschillende posities.

Toxiciteitsonderzoek

Bioassays met bacteriën, algen en watervlooien zijn uitgevoerd op geconcentreerde monsters van de verschillende posities zodat een beeld wordt verkregen van de toxiciteit van het effluent en hoe dit door het moerassysteem wordt beïnvloed. Met dezelfde geconcentreerde watermonsters zijn ook zogenoemde *in-vitro* testen uitgevoerd, waarbij wordt vastgesteld of een monster de potentie heeft om specifieke toxische effecten te veroorzaken, zoals verstoring van de hormoonhuishouding.

Om de eventuele gevolgen van een verstoorde hormoonhuishouding bij vissen te kunnen koppelen aan de resultaten van de *in-vitro* assays, werden op elke positie driedoornige stekelbaarsjes (*Gasterosteus aculeatus*) uitgezet in tanks die doorspoeld werden met effluent uit het zuiveringsmoeras. De conditie en het voortplantingssucces van deze vissen en hun nakomelingen (de F1-generatie) werd gevolgd om effecten van de blootstelling te onderzoeken. Van de F1-generatie werd tevens de expressie van 15000 genen bepaald als mogelijke biomarkers voor de blootstelling aan de effluenten.

Microbiologisch

In de verschillende compartimenten van de zuiveringsmoerassen zijn de levensgemeenschappen van ongewervelden in kaart gebracht en is onderzocht of, en op welke wijze deze gecorreleerd zijn met de verwijdering van fecale bacteriën uit het effluent. Tenslotte zijn sedimentmonsters uit de moerassystemen in het laboratorium geïncubeerd om te onderzoeken of microbiële afbraak van hormoon verstorende stoffen hierin plaatsvindt en hoe deze eventueel kan worden bevorderd.

2 Projectresultaten in het kort

In dit hoofdstuk worden de resultaten van het project samengevat aan de hand van de volgende vier praktijkgerichte vragen:

1. Wat is de (meer)waarde van de gebruikte onderzoeksmethoden?
2. Is er een milieurisico van het rwzi effluent?
3. Vermindert een zuiveringsmoeras het milieurisico?
4. Zijn zuiveringsmoerassen te optimaliseren?

2.1 Wat is de (meer)waarde van de gebruikte onderzoeksmethoden?

In het WIPE onderzoek werden een aantal innovatieve onderzoeksmethoden ingezet, waaronder chemische analyse met behulp van passieve samplers, en biologische risicobeoordeling met behulp van in vitro, in vivo en genomics technieken

Voor de bepaling van het lot van verontreinigende organische stoffen werd gebruik gemaakt van *passive samplers* van siliconen rubber die gedurende meerdere weken in de moerassystemen werden blootgesteld waarbij stoffen die affiniteit voor het siliconenrubber vertonen uit het passerende water werden geabsorbeerd. De kans dat stoffen die in een piek voorbij komen 'gemist' worden is door deze relatief lange blootstellingsperiode kleiner dan wanneer steekmonsters zouden worden geanalyseerd. Doordat de stoffen zich in het siliconen rubber concentreren kunnen zelfs extreem lage concentraties in het water bepaald worden. Dit maakt het mogelijk om stoffen zoals deltamethrin en pirimofos-methyl, die bij klassieke bemonstering vaak niet toetsbaar zijn, nu wel aan de norm getoetst kunnen worden.

Voor ca. 10% van de geanalyseerde stoffen bleek de passieve sampling methodiek nog onvoldoende werkbaar. Op basis van de gemeten gehalten aan in het siliconen rubber geaccumuleerde stoffen en de bekende toxiciteit voor deze stoffen, is per monster een ecotoxicologisch risico coëfficiënt berekend als indicatie voor het milieurisico.

Een vergelijking tussen de resultaten van de bioassays en deze risicocoëfficiënten resulteren in een vergelijkbare ranking aangeven voor het milieurisico van de drie onderzochte rwzi's. In volgorde van oplopend milieurisico is dit: Grou, Land van Cuijk, Hapert. Omdat het risico vooral door insecticiden bepaald wordt, geeft de daphnia bioassay de beste correlatie met de risico-coëfficiënt. Het berekende risico is echter veel hoger dan wat in de in-vivo bioassays werd gevonden. Dit is een logisch gevolg van het feit dat bij de berekening van de coëfficiënt alle risico's zijn gesommeerd, ongeacht mogelijk verschillende werkingsmechanismen van stoffen.

Concluderend kan gesteld worden dat het gebruik van siliconen rubber passieve samplers een duidelijke meerwaarde heeft boven analyse van steekmonsters, omdat een tijdgeïntegreerd beeld ontstaat en stoffen in zeer lage concentraties nog aantoonbaar zijn. De doorvertaling van de concentraties naar een milieurisico is lastig en zal een overschatting van het risico inhouden. De techniek kan wel gebruikt worden om monsters onderling te vergelijken.

Naast siliconen-samplers zouden ook POCIS-samplers worden ingezet waarmee een bredere range van stoffen kan worden geconcentreerd. Na een eerste meetronde werd echter duidelijk dat de gehalten op dit type sampler moeilijk te vertalen zijn naar gehalten in het water. De POCIS samplers bleken wel geschikt om stoffen te concentreren en te detecteren, maar gaven bijvoorbeeld geen uitsluitel of de concentraties in de loop van het moerassysteem veranderden. Om deze reden waren de POCIS samplers in dit project minder geschikt voor het beoogde doel en is besloten de bepaling van de toxiciteit aan de hand van met aan andere techniek, concentratie dmv XAD-hars, uit te voeren. Het nadeel van deze XAD-methode in vergelijking met het gebruik van passieve samplers is dat er

gebruik gemaakt wordt van een steekmonster. Maar door de concentratie van het watermonster zijn ook met deze techniek lagere detectielimieten bereikbaar en kan met een aanvullende acute biologische test toch een indruk wordt verkregen van het milieurisico bij chronische blootstelling.

De toxiciteit van door de XAD extractie verkregen concentraten is bepaald met zowel *in-vivo* (met hele organismen) en *in-vitro* bioassays (met gemodificeerde cellijnen). Effluenten zijn complexe mengsels van zeer veel stoffen die deels onder de detectielimiet van chemische analyse kunnen vallen en mogelijk deels onbekend zijn. Met bioassays wordt de totale toxische potentie gekwantificeerd, waarbij het er niet toe doet of dit veroorzaakt wordt door een gezamenlijk effect van 100 stoffen die in extreem lage concentraties voorkomen of maar door een enkele stof die in een hoge concentratie aanwezig is. Doordat elke bioassay zijn eigen gevoeligheid heeft is juist met een 'batterij' van bioassays een goed beeld te krijgen van de toxiciteit van een effluent.

De algemene toxiciteit werd bepaald met behulp van *in-vivo* bioassays met bacteriën (microtox), zoogdiercellen (MTT), algen en watervlooien.

De potentie tot het veroorzaken van specifieke toxische effecten is getest met de volgende *in-vitro* bioassays:

DR-Luc: test op aanwezigheid van stoffen met een dioxine-achtige toxiciteit

ER-Luc: test op de aanwezigheid van hormoonverstorende stoffen met estrogene werking

AR-Luc: test op de aanwezigheid van hormoonverstorende stoffen met een androgene werking

CEPIA: test op de aanwezigheid van stoffen die de werking van de celpomp verstoren

pharma testen: test op de aanwezigheid van antibiotica

De met *in-vitro* bioassays aangetoonde potentie van een monster hoeft niet altijd tot uiting te komen in blootgestelde organismen. Zo werd met *in-vitro* assays de sterkste estrogene potentie aangetoond in monsters van rwzi Grou, terwijl de genexpressie van de daar blootgestelde stekelbaarzen geen estrogene effecten suggereerden. Dit is te verklaren doordat in de *in-vitro* assays met de geëxtraheerde monsters de blootstelling niet vergelijkbaar is met de blootstelling van een vis in een natuurlijke situatie. Ook kan het zijn dat een organisme de op celniveau waargenomen effecten op hogere aggregatieniveaus weet te reguleren/compenseren en kunnen sommige stoffen de werking van andere stoffen tegenwerken. De vissen zijn aan meer stoffen blootgesteld dan met de steekmonsters verzameld kunnen worden.

De *in-vivo* en *in-vitro* bioassays geven een indruk van de toxiciteit onder gecontroleerde laboratorium condities. Om meer inzicht te krijgen in de effecten van chronische blootstelling onder meer natuurlijke condities (*in-situ*) werden stekelbaarzen vanaf de bevruchting in kunstmatige vijvers blootgesteld aan effluenten op de verschillende posities in de zuiveringsmoerassen. Van deze vissen werd het volgende jaar de conditie en het voorplantingssucces bepaald. Hoewel deze methode niet toepasbaar is voor routinematige monitoring, levert het belangrijke basis informatie op over de mogelijke beïnvloeding van lokaal aanwezige vispopulaties. Dezelfde stekelbaarzen werden gebruikt voor de toepassing van innovatieve 'genomics' technieken, waarbij zeer uitgebreide mechanistische informatie verkregen werd over het de fysiologie van de vissen. Op basis daarvan is onderzocht of/hoe de expressie van 15000 genen als biomarker voor de blootstelling van de vissen en daaraan gekoppelde conditie kan worden ingezet. Biomarkers kunnen al een respons vertonen als nog geen nadelige effecten op de organismen te zien zijn, waardoor ze als vroege waarschuwing voor mogelijke effecten van milieuverontreiniging kunnen worden gebruikt. In de genen van de stekelbaarzen werden aanwijzingen gevonden voor beïnvloeding van werkingsmechanismen, die veroorzaakt kunnen worden door stofgroepen waarvan representanten in de passieve samplers zijn aangetoond bijvoorbeeld pyreen, cafeïne, benzo(a)pyreen, chlorpyrifos, hexachloorbenzeen, carbamazepine, acetaminofen). Ook werden in de genexpressie van individuele stekelbaarzen indicaties gevonden voor een verstoorde hormoonhuishouding, wat overeenkomt met de resultaten van de *in-vitro* bioassays, Deze verstoring in de hormoonhuishouding leidde echter niet tot afwijkingen van het

voortplantingssucces van de groep blootgestelde vissen. De 'genomics' biomarkers leverden een grote hoeveelheid informatie op. Voor specifieke genen, zoals genen die indicatief zijn voor blootstelling van mannelijke vissen aan estrogenen, is interpretatie goed mogelijk en levert de methode waardevolle inzichten op. De interpretatie van alle genomics resultaten is echter nog complex. Omdat genomics methoden zich momenteel razendsnel ontwikkelen kan verwacht worden dat data-interpretatie in de toekomst steeds eenvoudiger en goedkoper zal worden.

Samenvattend: In het WIPE project zijn verschillende nieuwe meettechnieken ingezet. Door gebruik te maken van passieve sampler was het mogelijk om de concentratie van breed scala aan stoffen met een zeer laag directieniveau aan te tonen in tijdgeïntegreerde monsters. Met een batterij aan bioassays werd de potentiële toxiciteit geanalyseerd in geconcentreerde watermonsters, waardoor met kortdurende testen een indicatie voor risico bij chronische blootstelling kon worden geschat. Door analyse van de genexpressie van blootgestelde stekelbaarzen werden fysiologische responsen van de vissen in kaart gebracht die indicatief zijn voor blootstelling aan stoffen uit het effluent.



Figuur 5 Door het gebruik van passieve samplers van siliconen rubber kan een tijdgeïntegreerde waterbemonstering effectief worden uitgevoerd.

2.2 Is er een milieurisico van het rwzi effluent?

De kwaliteit van het effluent zoals dat uit de rwzi komt en, op bemonsteringspositie 1, in de zuiveringsmoerassen wordt geloosd, varieert sterk in de tijd, en hoewel geen van de onderzochte rwzi's constant effluent produceert dat een beleidsmatig onaanvaardbaar milieurisico oplevert, zijn er bij elke rwzi momenten waarop een zeker milieurisico kan worden aangetoond. Dit komt tot uiting in de concentraties van stoffen die in de passieve samplers werden gevonden en in de toxische responsen die werden gevonden in de verschillende bioassays. De resultaten van de in-vivo bioassays met monsters van positie 1 bevatten geen indicaties dat het effluent acute sterfte zal veroorzaken. Echter bij circa 50% van de monsters worden wel indicaties gevonden dat chronische blootstelling tot milieueffecten kan leiden.

De overschrijdingen vonden voornamelijk plaats in het voorjaar (maart – juni) en lijken verband te houden met het gebruik van bestrijdingsmiddelen binnen de aanvoergebieden van de rwzi's. De tussen maart en juni aangetoonde effecten in de algen bioassay met monsters van rwzi's Hapert en land van Cuijk komen overeen met verhoogde gehalten van herbiciden zoals gemeten met passieve samplers, en het op basis daarvan ingeschatte risico in het effluent. Ook de in dezelfde periode aangetroffen effecten in de daphnia testen, vallen samen met de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen, in dit geval insecticiden, in het effluent.

Een sterke indicatie dat er periodiek sprake was van een periodiek slechte effluentkwaliteit werd ook gevonden in de verhoogde sterfte van de stekelbaarzen die onverwacht optrad tussen oktober 2010 en april 2011 op posities 1 tot en met 3 bij rwzi land van Cuijk. Terwijl toen al ruim een jaar, inclusief een strenge winterperiode, stekelbaarzen op alle posities overleefden. Met uitzondering van dit voorval bleken stekelbaarzen bij alle rwzi's goed te kunnen overleven en zich ook succesvol voort te planten in het effluent, dat overigens wel continue belucht werd om zuurstofloosheid te voorkomen. Dit toont aan dat de effluentsamenstelling zoals dat het merendeel van de tijd door de rwzi's geloosd wordt geen grote problemen voor de vissen oplevert.

De genexpressie van de stekelbaarzen bevatte wel tekenen van blootstelling aan een scala van toxische stoffen, waaronder stoffen met een farmaceutische en hormoonverstorende werking. Ook met de in-vitro assays werd een zekere hormonale (m.n. estrogene) activiteit van de geëxtraheerde effluënten aangetoond. Opvallend hierbij was dat de sterkste estrogene activiteit werd aangetoond in monsters van rwzi Grou terwijl in de genexpressie van de stekelbaarzen, de sterkste aanwijzingen voor estrogene hormoonverstoring werden gevonden bij rwzi Land van Cuijk.

Overigens blijken zowel water en sediment van de zuiveringsmoerassen een hoge concentratie aan oestrogene activiteit hebben bij posities 1, direct na het lozingspunt van de RWZI.

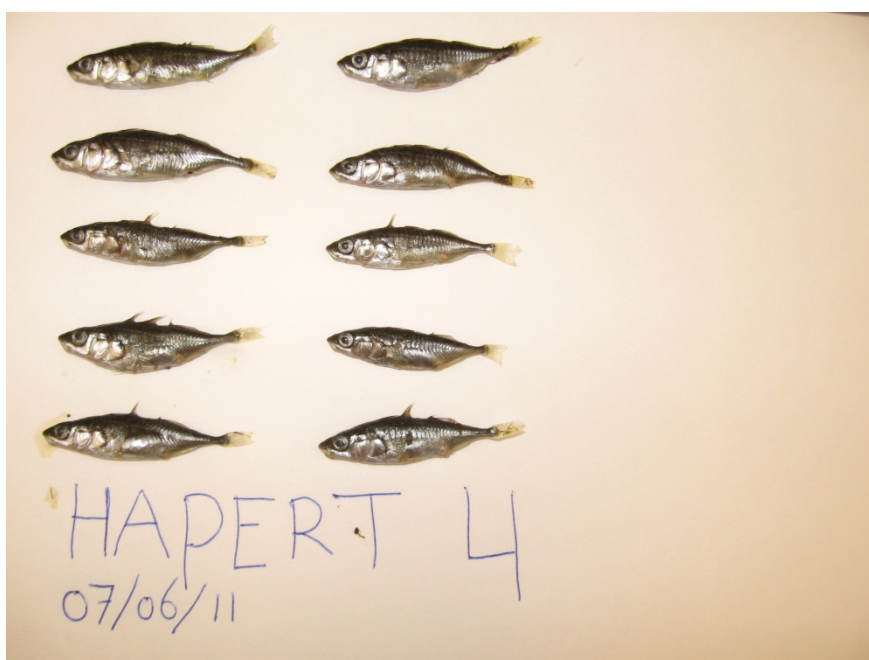
De verzamelde extracten uit de passieve samplers zijn gekoppeld aan bijhorende toxiciteitsgegevens uit de literatuur. Vervolgens is een lijst opgesteld van de 10 stoffen waarvan het hoogste milieurisico wordt verwacht (tabel 1). In deze lijst is het aandeel van bestrijdingsmiddelen groot, mede veroorzaakt door de relatief hoge toxiciteit van deze stoffen. Opvallend is de aanwezigheid van aldicarb en lenacil in het effluent van bij rwzi Grou. Beide stoffen zijn al enkele jaren niet meer toegelaten in Nederland. De middelen DEET en diclofenac hebben een humane toepassing in de privé sfeer. β -oestradiol is een afscheiding van mensen, maar wellicht ook uit veehouderijen.

Tabel 2 Top 10 van gemeten stoffen die de grootste bijdrage leveren aan de gemiddelde risicoquotiënt per locatie. Vetgedrukte stoffen staan in minimaal 2 van de 3 locaties in de top 10 genoteerd.

RWZI Cuijk	RWZI Hapert	RWZI Grou
Pyreen	Deltamethrin	Pyreen
Deltamethrin	Beta-estradiol	Beta-estradiol
Metribuzin	Pyreen	Propoxur
Beta-estradiol	Metribuzin	Tetramethrin (Som)
Methomyl	Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)
Propoxur	Propoxur	Fluoranteen
Diflubenzuron	Methomyl	Pirimiphos-methyl
Fluoranteen	Dimethenamid	DEET
Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)	Aldicarb
DEET	Diclofenac	Lenacil

Naast microverontreinigingen bevatte het effluent van alle drie onderzochte rwzi's ziekteverwekkende micro-organismen als *E. coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* die weliswaar normaal zijn voor rwzi effluenten, maar waarmee zwemwaternormen worden overschreden. Hoewel deze normen niet gelden voor effluent van waterzuiveringen, geeft dit wel aan dat er gezondheidsrisico's kunnen ontstaan als rwzi effluent direct op oppervlaktewater wordt geloosd.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat de effluenten zoals deze door de rwzi's geproduceerd worden doorgaans geen grote milieurisico's zullen opleveren, maar dat periodiek wel sprake is van risico op effecten bij chronische blootstelling. De ziekteverwekkende micro-organismen in het effluent leveren een risico voor de volksgezondheid bij lozing in zwemwater.

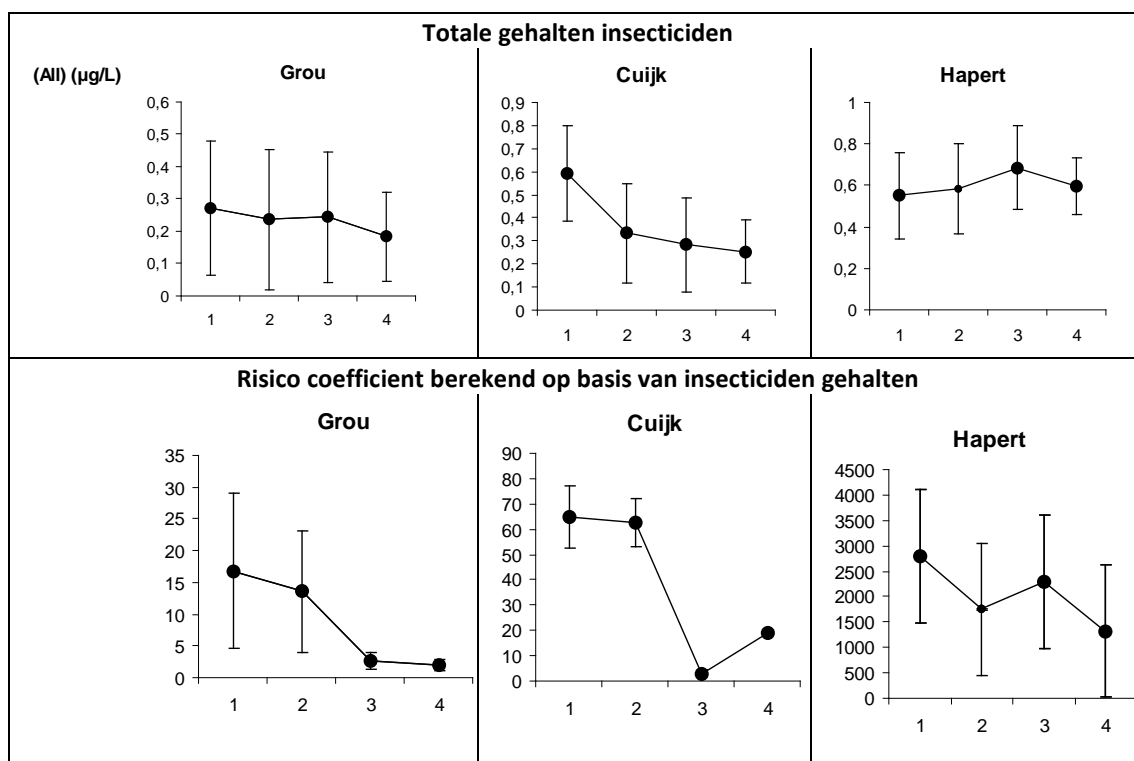


Figuur 6 De stekelbaarzen bleken in het laatste deel van de zuiveringsmoerassen (positie 4) bij alle rwzi's goed te overleven en zich voort te planten, terwijl bij een van de rwzi's wel verhoogde sterfte werd geconstateerd in het eerste deel van het zuiveringsmoeras.

2.3 Vermindert een zuiveringsmoeras het milieurisico?

De concentraties van organische microverontreinigingen in het effluent veranderen over het algemeen weinig tijdens het doorlopen van de zuiveringsmoerassen (Figuur 7 boven). Blijkbaar is verwijderingsrendement van de rwzi al dermate hoog, dat het zuiveringsmoeras hier niet veel meer aan kan bijdragen. Wanneer puur gekeken wordt naar stofconcentraties, dan laat alleen de stofgroep van musken en brandvertragers in alle drie de zuiveringmoerassen een lichte daling zien.

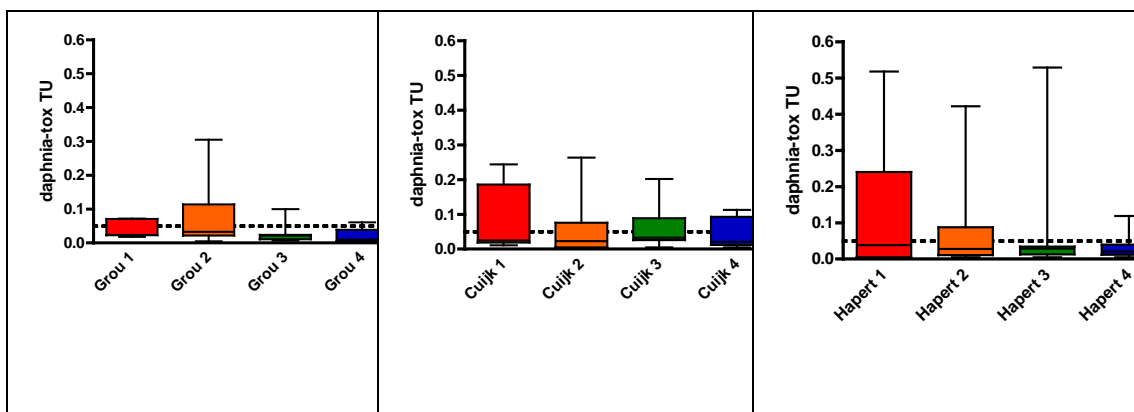
Echter, in tegenstelling tot de concentraties van stoffen neemt het op basis van de stofconcentraties berekende gesommeerde milieurisico wel af van positie 1 naar positie 4 (Figuur 7 onder). Deze daling wordt vooral veroorzaakt door afname van de gehalten aan insecticiden, de groep die van de gemeten stoffen de grootste bijdrage levert aan het milieurisico (risicocoëfficiënt). De totale concentratie aan insecticiden daalt in de loop van het zuiveringsmoeras wel bij rwzi Grou en rwzi Cuijk, maar niet bij rwzi Hapert. Het verloop door het moeras heen verschilt wel per locatie. Zo vindt de afname bij rwzi Grou (afname risico coëfficiënt pesticiden 25%) en Land van Cuijk (afname risico coëfficiënt pesticiden 35%) vooral in de rietvelden plaats, dus tussen monsterposities 2 en 3. Terwijl bij rwzi Hapert (afname risico coëfficiënt pesticiden 45%) het rietveld geen invloed heeft. Opvallend is de hoge risico coëfficiënt van het effluent van rwzi Hapert (Figuur 7 onder)



Figuur 7 Gemiddelde vracht (boven) en berekende risico-coëfficiënt (onder) van de groep van insecticiden per locatie op posities 1 t/m 4 (x-as), inclusief standaarddeviaties. De gegevens laten zien dat de gehalten insecticiden die in het effluent van rwzi's Cuijk en Hapert vergelijkbaar zijn en bij rwzi Grou iets lager, vooral bij rwzi Cuijk afnemen met oplopende monsterposities in het zuiveringsmoeras. Het afnemende risico-coëfficiënt (plaatjes onder) toont aan dat het risico op het ontstaan van milieu effecten wel in alle moerassystemen vermindert.

De *in-vivo* testen met de daphnia's bevestigen het beeld dat de hoogste toxiciteit verwacht kan worden bij rwzi Hapert en laten ook zien dat de toxiciteit van het effluent tijdens de passage van het zuiveringsmoeras afneemt. Dit komt het sterkst tot uiting bij de rwzi's Hapert en Land van Cuijk waar

het effluent het meest toxisch bleek (Figuur 8). Hoewel de respons van de bioassays dezelfde ranking van rwzi's in termen van milieu bezwaarlijkheid oplevert, zijn de verschillen niet zo uitgesproken als de hierboven gepresenteerde berekende risico coëfficiënten suggereren. De toxiciteit overschrijdt de waarde waarboven effecten bij chronische blootstelling verwacht kunnen worden het vaakst bij rwzi Hapert en dat gebeurt nauwelijks meer aan het eind van het moerasysteem (positie 4).



Figuur 8 De gemiddelde toxiciteit per locatie van het effluent extract gemeten met de daphnia test uitgedrukt als toxic units (TU). De horizontale stippellijn geeft de grens aan waarboven milieurisico niet uitgesloten kan worden. De gegevens laten zien dat dit het meeste voorkomt bij rwzi Hapert en dat de deze minder vaak wordt overschreden aan het eind van het moerasysteem (positie 4).

De sterfte onder de stekelbaarzen tussen oktober 2010 en april 2011 vond plaats op posities 1, 2 en 3 van het zuiveringsmoeras, maar niet meer op positie 4. Hoewel er geen directe relatie te leggen is sluit dit beeld aan bij de met in vivo bioassays aangetoonde lagere toxiciteit van het effluent aan het eind van het zuiveringsmoeras.

De in-vitro bioassay resultaten tonen dat incidentele pieken in de estrogene activiteit van het effluent zoals deze vooral werden aangetroffen bij rwzi Grou, bij volledige passage van het zuiveringsmoeras sterk worden verlaagd. De invloed van de estrogenen in het effluent kwam ook duidelijk tot uiting in de genexpressie van de mannelijke stekelbaarsjes die waren blootgesteld bij rwzi Land van Cuijk, die wees op een sterke inductie van het eiwit vitellogenine dat normaal alleen bij vrouwtjes wordt aangetroffen. Het feit dat deze inductie niet werd aangetroffen bij stekelbaarsjes die waren blootgesteld aan het eind van het zuiveringsmoeras, geeft aan dat de estrogene potentie van het effluent hier lager was. In Hapert echter was de estrogene potentie regelmatig hoger op posities 2 en 3 dan op positie 1. Het is de vraag of de toename komt doordat antagonisten uit het afvalwater worden afgebroken, of dat eventueel aanwezige vogels estrogene stoffen via hun ontlasting toevoegen aan het moeraswater. Naar positie 4 nam de estrogene potentie weer af. De stekelbaarzen op deze locatie vertoonden geen aanwijzingen van een verstoorde hormoon huishouding. Dat het zuiveringsmoeras de potentie heeft om stoffen met een estrogene activiteit microbiel af te breken is bevestigd in de laboratorium experimenten met effluent en sediment uit de verschillende moerasystemen. De gemeten oestrogene activiteit in sedimentmonsters uit de zuiveringsmoerassen is ook hoger op positie 1 dan aan het eind van het moeras (positie 4). Dit geeft aan dat het zuiveringsmoeras bijdraagt aan een afname van de oestrogene activiteit van het effluent dat uiteindelijk op het oppervlaktewater wordt geloosd. Dit kan een combinatie zijn van microbiële omzetting en adsorptie aan het sediment.

Uit de hierboven samengevatte observaties kan de conclusie worden getrokken dat de zuiveringsmoerassen in staat zijn om periodiek optredende pieken in toxische potentie af te vlakken.

De intensieve metingen bij rwzi Grou laten zien dat zuiveringsmoerassen een sterke bijdrage kunnen leveren aan de vermindering van gezondheidsrisico's die effluent van waterzuiveringen kan vormen.

Terwijl de Europese zwemwaternorm aan het begin van het moerassysteem werd overschreden voor *E. coli* en *Enterococci*, lagen de waarden het grootste deel van het jaar onder deze norm aan het eind van het zuiveringsmoeras. De verwijdering van ziekte verwekkers is in zowel de bezinkingsvijvers als de rietvelden waargenomen. De verwijdering van *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* is echter sterker in de rietvelden dan in de bezinkingsvijver hetgeen mogelijk verband houdt met de langere verblijftijd in de rietvelden. Het gemiddelde percentage verwijdering van *Ecoli*, *Enterococci* en *C.perfringens* in de rietvelden ligt ruim boven de 70%. Begrazing door ongewervelden ('watervlooien') lijkt een van de belangrijkste factoren voor de afname van de pathogenen.

Er werden ook indicaties gevonden dat watervogels ziekteverwekkers toevoegen aan het effluent in de zuiveringsmoerassen. De mate waarin dit gebeurt was sterk locatie afhankelijk, en sterker bij Hapert en land van Cuijk dan bij Grou. In het moerassysteem van rwzi land van Cuijk werd zelfs een toename van *Enterococci* geconstateerd.

Concluderend kan gesteld worden dat een zuiveringsmoeras het risico vermindert dat rwzi-effluent milieueffecten en gezondheidsrisico's veroorzaakt in het ontvangend oppervlakte water, doordat tijdelijke (calamiteuze) pieken in toxiciteit in het moerassysteem worden afgevlakt en de dichtheden ziekteverwekkende bacteriën sterk worden verlaagd.



Figuur 9 Rietvelden leveren een belangrijke bijdrage aan de zuiverende werking van de moerassystemen.

2.4 Zijn zuiveringsmoerassen te optimaliseren?

Regulier effluent uit de onderzochte rwzi's kennen geen acuut milieurisico, maar de resultaten geven aan dat in 50% van de bioassays effecten bij chronische blootstelling niet zijn uit te sluiten. In het WIPE-project is op verschillende wijze aangetoond dat een zuiveringsmoeras het milieu- en gezondheidsrisico van rwzi effluent verder kan beperken. De effluentkwaliteit verschilt sterk tussen de onderzochte rwzi's en fluctueert bovendien sterk in de tijd. Omdat ook de inrichting/ontwikkeling van de zuiveringsmoerassen per locatie sterk verschillen, bleek het moeilijk om een algemeen geldend effect aan te tonen van de verschillende compartimenten van de zuiveringsmoerassen op de verbetering van de effluentkwaliteit die gevonden werd tussen posities 1 en 4.

Een deel van het uitdempen van de pieken in toxiciteit zou het gevolg kunnen zijn van verdunning/menging van toxisch effluent in het zuiveringsmoeras. Een andere oorzaak kan zijn dat de toxiciteit in de waterfase afneemt door adsorptie van de toxische stoffen aan bezinkend organisch materiaal.

Met betrekking tot verdunning als onderliggende factor speelt de inrichting van het zuiveringsmoeras waarschijnlijk een ondergeschikte rol, en zijn vooral het volume en de verblijftijd van het effluent bepalend.

Het bezinken van deeltjes met geadsorbeerde toxicanten en mogelijke afbraak in het sediment kan gestimuleerd worden door aan te grijpen op de factoren die de bezinken bevorderen, bijvoorbeeld met een slimme inrichting van het rietveld. De positieve bijdrage die het rietveld levert in vrijwel alle eindpunten komt waarschijnlijk mede door de sterke menging van het effluent en het intensieve contact met de vele obstakels (rietstengels).

De rietvelden blijken ook een belangrijke rol te spelen bij de verwijdering van ziekteverwekkende micro-organismen. Dit lijkt gecorreleerd aan de dichtheden van verschillende ongewervelden (watervlooien, radardiertjes etc.) die de micro-organismen als voedselbron benutten. Een rietveld vormt dus om meerdere redenen een belangrijk onderdeel van een zuiveringsmoeras.

De invloed van de voorbezinkvijvers op het toxicologisch risico is minder duidelijk. Hoewel ook hier soms een verbetering van de effluentkwaliteit plaats vindt, lijken zich hier geen processen voor te doen die additioneel zijn aan de rietvelden. Toch lijkt het onverstandig om de voorbezinkvijvers uit het ontwerp te schrappen omdat het risico bestaat dat de rietvelden eerder dichtslibben als voorbezinking van slibdeeltjes niet meer plaatsvindt. Voor zowel het risico op toxische effecten als de aantallen ziekteverwekkende micro-organismen blijkt het maximale zuiveringsresultaat in de meeste gevallen te zijn bereikt na het doorlopen van de rietvelden. De laatste compartimenten in de onderzochte zuiveringsmoerassen (paaivijver, sloot en moerasbos) lijken over het algemeen minder bij te dragen aan de nazuivering van het effluent. Een uitzondering hierop vormde de calamiteit met onbekende oorzaak bij rwzi land van Cuijk waardoor ook na het rietveld nog substantiële sterfte onder de stekelbaarsjes optrad. Hier was passage van het laatste compartiment (sloot) nodig om de effecten te doen verdwijnen. Mogelijk werd dit positieve effect van het 4^e compartiment veroorzaakt door de langere verblijftijd c.q. verdergaande menging van het effluent. Maar het is ook mogelijk dat de in deze sloot aangebrachte beluchters een meer specifieke invloed op de effluentkwaliteit hebben gehad.

Naast bovenstaande beschouwingen over toegevoegde waarde van het zuiveringsmoeras op de afvlakkende werking van toxische piekbelastingen, kunnen uit de onderzoeksresultaten aanbevelingen worden geformuleerd waarmee de zuiveringsefficiëntie verder zou kunnen worden verhoogd.

Zo is het duidelijk dat er in de moerassystemen voldoende bacteriële activiteit aanwezig is om estrogene stoffen af te kunnen breken. Een belangrijke voorwaarde hierbij is dat sediment gebonden estrogene verbindingen in contact komen met zuurstof. De optimale condities hiervoor zijn een

moerascompartiment met een dunne sediment laag wat regelmatig “opgewerveld” wordt waarna estrogene verbindingen worden omgezet in de aerobe waterfase. Om voldoende zuurstof in de waterfase te verkrijgen is een geringe waterdiepte, bij voorkeur voorzien van cascades het gunstigst.

Verhoging van het zuurstofgehalte blijkt ook de eliminatie van ziekteverwekkende micro-organismen te bevorderen, omdat er een beter klimaat voor de ongewervelden wordt gecreëerd die zich met bacteriën voeden. Doordat het verwijderen van stikstof een anaeroob proces is kan het verhogen van de zuurstof concentratie negatieve effecten hebben op de stikstof verwijdering in de rietvelden. Het verhogen van de zuurstofconcentratie zal dus bij voorkeur pas na een eerste passage door rietvelden moeten worden uitgevoerd.

Tenslotte zou het natuurlijke UV in zonlicht mogelijkheden kunnen bieden bij de desinfectie van het effluent en eventueel bij verdere afbraak van toxische stoffen. Het hoge organisch koolstof (DOC) gehalte van het effluent beperkt de mate waarin het UV-licht in het water doordringt, maar door extra ondiepe gedeeltes en/of cascades toe te voegen die op het invallende zonlicht gericht zijn zou het zonlicht toch benut kunnen worden. Omdat UV-straling van de zon een variable factor is, kan deze echter geen constante bijdrage leveren aan de zuiveringsefficiëntie van het moerassysteem.

Samenvattend lijkt vooral voldoende verblijftijd en een goede menging van het effluent in het zuiveringsmoeras van belang voor de reductie van het milieu-risico. Dit kan worden geoptimaliseerd door het oppervlak van de rietsloten te verhogen, eventueel ten koste van het derde compartiment. Door het aanbrengen van cascades en ondiepe delen in het tweede deel van het zuiveringsmoeras, zal de zuurstofuitwisseling verbeteren wat ten goede komt aan de microbiële afbraak van (bijvoorbeeld hormoonverstorende) stoffen en aan de verwijdering van pathogenen.



Figuur 10 Laboratorium experimenten laten zien dat micro-organismen in de sedimenten uit de zuiveringsmoerassen goed in staat zijn hormoon verstorende stoffen af te breken, mits voldoende zuurstof aanwezig is.

3 Samenvattingen deelonderzoeken

Hieronder zijn de samenvattingen gegeven van de verschillende deelonderzoeken van het WIPE-project. In verband met de leesbaarheid en compactheid van dit samenvattend rapport zijn hiervoor in enkele gevallen de originele samenvattingen van de deelrapporten ingekort. Voor de volledige rapportage wordt verwezen naar de bijlage rapporten zoals aangegeven in de inleiding.

3.1 Beoordeling zuiveringsrendement van zuiveringsmoerassen voor organische microverontreinigingen met behulp van passieve sampling (Deltares)

3.1.1 Beschrijving van de metingen

In dit werkpakket zijn de concentraties aan organische microverontreinigingen in de 3 zuiveringsmoerassen bepaald met behulp van passieve samplers en is bestudeerd in hoeverre concentraties van organische microverontreinigingen tijdens het verblijf in een zuiveringsmoeras verminderen. Er zijn gedurende 7 aansluitende bemonsteringperiodes passieve samplers blootgesteld in de 3 zuiveringsmoerassen, waarbij de concentratie van circa 230 verschillende stoffen is bepaald in het effluent van de waterzuivering, het water tussen de bezinkingsvijvers en de rietvelden en het water aan het einde van de rietvelden. Ook zijn eenmalig het influent en het oppervlaktewater bovenstrooms van de 3 locaties bemonsterd. Belangrijkste stofgroepen waren de brandvertragers, weekmakers, insecticiden, herbiciden, fungiciden, musken, personal care products en geneesmiddelen. Uit de chemische analyses is bepaald welke van deze stofgroepen het best worden verwijderd, en in welk compartiment.

De concentraties van de stoffen zijn vervolgens genormaliseerd naar de norm van de betreffende stoffen, uitgedrukt in een risicoquotiënt (RQ). Hiermee wordt een indruk verkregen van welke stoffen het grootste risico vormen in het zuiveringsmoeras. Tevens wordt getracht de belangrijkste processen voor verwijdering van milieuvreemde stoffen in verschillende compartimenten van het zuiveringmoeras te identificeren.

3.1.2 Belang van de metingen

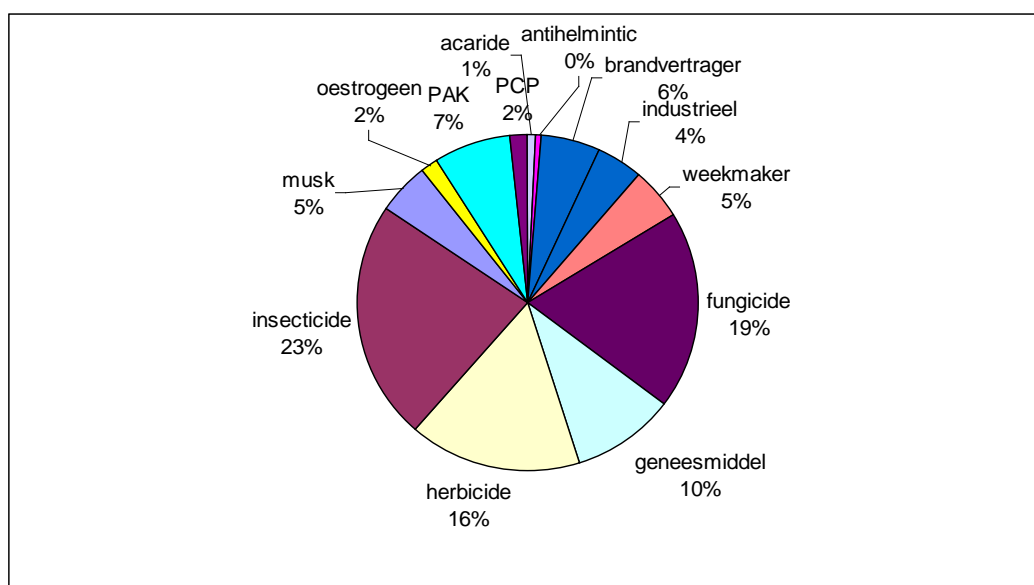
Door de monitoring met behulp van passieve sampling is het mogelijk om gedurende langere tijd een tijdsgéïntegreerd beeld te verkrijgen van de vracht aan milieuvreemde stoffen, zonder dat er stoffen 'gemist' worden die in piekconcentraties voorkomen door incidentele lozing. Tevens wordt door de langere bemonsteringstijd de detectielimiet van stoffen veelal verlaagd, omdat de passieve sampler een groter volume aan water bemonsterd dan bij de klassiek bemonstering met steekmonsters. Zo hebben bestrijdingsmiddelen vanwege hun werking logischerwijs een relatief lage norm, met als gevolg dat de norm van deze stoffen vaak onder de rapportagegrens ligt waardoor deze stoffen vaak niet toetsbaar zijn. In de top 10 van stoffen met een hoog risico in dit onderzoek (zie tabel 3.1) behoren deltamethrin en pirimifos-methyl tot deze stoffen. Deze zijn met passieve sampling goed op normniveau meet- en toetsbaar.

3.1.3 Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten

Uit de resultaten blijkt dat veel stoffen goed waren te analyseren op de passieve samplers. Voor 10% van de onderzochte stoffen bleek de passieve sampling methode (nog) niet goed te werken. Soms is de opwerkingsprocedure nog niet optimaal, zoals bij 17 β -ethinyloestradiol, soms gedragen de stoffen

zich anders ten opzichte van de passieve sampler als verwacht op basis van hun fysisch/chemische eigenschappen. In de nabije toekomst zullen dergelijke problemen binnen een aantal verschillende projecten verder worden uitgewerkt en mogelijk opgelost.

Figuur 11 geeft een totaal overzicht van het aantal aangetroffen stoffen per stofgroep. De verhouding bleek per locatie nogal te verschillen, zo was in Hapert en Cuijk het aandeel aan pesticiden groter dan in Grou, waar de brandvertragers en musken meer prominent aanwezig zijn. Wanneer de totale vracht aan concentraties in beschouwing wordt genomen, dan blijkt dat rwzi Hapert veruit de grootste vracht aan stoffen loost. Deze vracht is bijna 2 keer zo groot als bij rwzi land van Cuijk en Grou, die redelijk vergelijkbaar zijn.



Figuur 11. Een overzicht van de verhouding in stofgroepen aanwezig op passieve samplers.

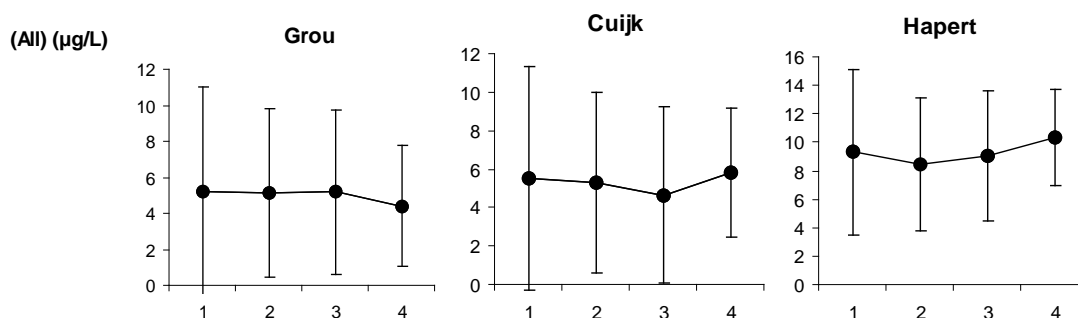
Wanneer naar de risico's wordt gekeken, blijkt dat berekende risicoquotienten van alle geanalyseerde stoffen ver boven de 1 liggen (Figuur 13). Hierbij moet opgemerkt worden dat dit risico waarschijnlijk een overschatting van de werkelijke risico's is, omdat de individuele risico's van alle stoffen gesommeerd zijn, ongeacht het werkingsmechanisme van de stof. Het risicoquotient van Hapert is ongeveer 15 keer zo hoog als van de andere 2 locaties. Dit wordt voornamelijk veroorzaakt door 2 stoffen, namelijk deltamethrin en pyreëne, stoffen met een relatief lage norm.

In Tabel 3 is de top 10 van stoffen met het hoogste gemiddelde risicoquotient van de 3 locaties weergegeven. Hierbij moet opgemerkt worden dat niet alle van deze stoffen in iedere ronde zijn aangetroffen. Al deze stoffen hebben een RQ die groter is dan 1. Hieruit blijkt het aandeel van bestrijdingsmiddelen, en dan voornamelijk insecticiden in het totaal groot is, gedeeltelijk veroorzaakt door de relatief lage norm van deze groep van stoffen. Deze lijst bestaat voornamelijk uit middelen die hoofdzakelijk een biocide toepassingen of toepassingen in opslagplaatsen van agrarische producten hebben. Een aanbeveling is om deze toepassingen, in het licht van dit onderzoek, kritisch nader te bekijken. Gedeeltelijk bestaat de lijst ook uit stoffen die alleen een agrarische toepassing hebben. Tenslotte komen er bij rwzi Grou 2 stoffen voor, die al enkel jaren geen toepassing meer hebben in Nederland, namelijk aldicarb en lenacil.

Tabel 3 Top 10 van stoffen met het hoogste gemiddelde risicoquotiënt op de 3 locaties.

Cuijk	Hapert	Grou
Pyreen	Deltamethrin	Pyreen
Deltamethrin	Beta-estradiol	Beta-estradiol
Metribuzin	Pyreen	Propoxur
Beta-estradiol	Metribuzin	Tetramethrin (Som)
Methomyl	Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)
Propoxur	Propoxur	Fluoranteen
Diflubenzuron	Methomyl	Pirimiphos-methyl
Fluoranteen	Dimethenamid	DEET
Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)	Aldicarb
DEET	Diclofenac	Lenacil

3.1.4 Draagt het zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent



Figuur 12 Gemiddelde somconcentratie gedurende de bemonsteringsperiode van stoffen per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

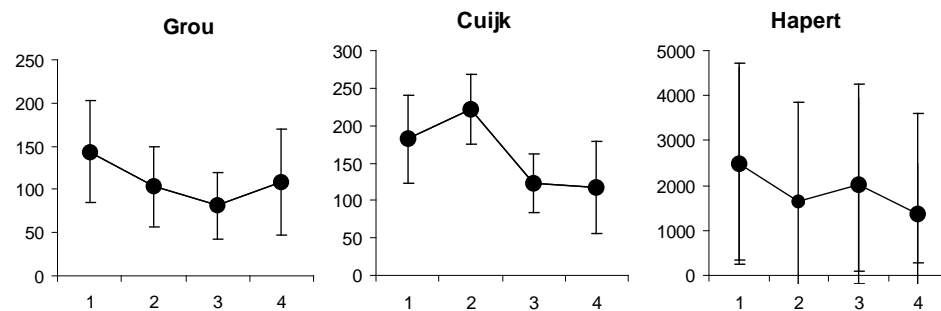
Figuur 12 geeft een overzicht van het verloop van het totaal aan concentraties aan stoffen door het moeras heen, uitgedrukt als gemiddelde somconcentratie van de 7 bemonsteringsrondes.

Uit deze figuren zijn een aantal conclusies te trekken:

1. De drie zuiveringsmoerassen laten nauwelijks tot geen verwijdering van organische microverontreinigingen laten. Rwwi Grou late een lichte verwijdering zien, terwijl de andere 2 locaties een lichte stijging laten zien. Een analyse van de verschillende stofgroepen laat zien dat deze verwijdering wordt veroorzaakt door de groep van musken en brandvertragers.
2. Ten tweede valt op dat de spreiding in de resultaten relatief groot is. Hieruit blijkt dat de vracht aan stoffen in het effluent gedurende het jaar substantieel kan verschillen. Gedeeltelijk is dit te wijten aan seizoensinvloeden van stofgroepen zoals de pesticiden (zie figuur 3.160, ten dele ligt dit gewoon aan de wisselende belasting van het influent van de rwwi.

In Figuur 13 zijn de risicoquotiënten weergegeven gemiddelde voor alle 7 rondes, van alle drie de locaties, op alle vier de posities. Hieruit is duidelijk af te lezen dat de risicoquotiënten voor de afzonderlijke locaties sterk kunnen verschillen. Verder blijkt, in tegenstelling tot de concentraties van stoffen, het risico van de stoffen wel van positie 1 naar positie 4 afnemen. Het verloop door het moeras heen verschilt wel per locatie. Zo draagt in Grou voornamelijk de bezinkvijver en het rietmoeras bij (afname 25%), terwijl het in Cuijk alleen het rietmoeras is (afname 35%), en in Hapert

voornamelijk de bezinkvijver (afname 45%). Een nadere analyse per stofgroep laat zien dat deze daling voornamelijk veroorzaakt wordt door de groep van insecticiden.



Figuur 13 Gemiddelde risico quotiënten gedurende de bemonsteringsperiode van stoffen per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

3.1.5 Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

De conventionele rwzi zorgt al voor een verdergaande verwijdering van organische microverontreinigingen, en het aanvullende verwijderingsrendement in de drie zuiveringsmoerassen blijkt niet erg groot te zijn. Het niet aannemelijk dat door eenvoudige aanpassingen aan het ontwerp van zuiveringsmoerassen het verwijderingsrendement sterk vergroot kan worden

3.2 In-vitro bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen (Wageningen Universiteit)

3.2.1 Beschrijving van de metingen

De extracten van het RWZI effluent in 7 in vitro bioassays getest die specifieke (bijvoorbeeld estrogene) of algemene toxische potentie van de stoffen in het extract kunnen kwantificeren. De volgende toxische potenties zijn bepaald met de celsystemen:

- 1) MTT assay: algemene cel toxiciteit ter karakterisering van de giftigheid van de extracten en om de (hierna genoemde) specifieke assays bij een niet toxische concentratie uit te kunnen voeren;
- 2) ER-Luc assay, een reporter gen assay voor estrogene activiteit;
- 3) AR-Luc assay, een reporter gen assay voor androgene activiteit;
- 4) DR-Luc assay, een reporter gen assay voor dioxine-achtige activiteit (48 uren meting voor stabiele stoffen) en voor PAK-achtige activiteit (6-8 uren voor snel metaboliseerbare stoffen);
- 5) CEPIA ("Cellular Efflux Pump Inhibition Assay") voor het bepalen van de remming van de cellulaire effluxpompjes, een mechanisme dat kan leiden tot hogere concentraties in de cel van andere toxische stoffen;
- 6) Pharma-test 1 en 2 waarin de toxiciteit van de extracten voor een tweetal bacterie-stammen wordt bepaald die gevoelig zijn voor antibiotica uit de groep van respectievelijk β -Lactams, waartoe ook penicilline behoort, en tetracycline-achtige antibiotica.

De meetresultaten voor de extracten in deze testen worden uitgedrukt als equivalenten van de standaardstoffen voor de verschillende testen, meestal als concentratie per liter water of als totale activiteit.

3.2.2 Belang van de metingen

In vitro bioassays kunnen een schakel vormen tussen chemische analyses enerzijds en effecten op organismen anderzijds. Effluenten zijn complexe mengsels van zeer veel stoffen die deel nog onbekend zijn (want bv in het moerassysteem nieuw gevormd) en deels onder de detectielimiet van chemische analyse vallen. Met de in vitro bioassays wordt de totale toxische potentie gekwantificeerd, waarbij het er niet toe doet of dit veroorzaakt wordt door 100 stoffen die in extreem lage concentraties voorkomen of maar door 1 of 2 stoffen. Met in vitro bioassays kan worden vastgesteld in welke monsters, en vervolgens in welke fracties daarvan zich eventueel nog onbekende toxiciteit bevindt wat kan helpen bij de verdere identificatie daarvan. Ook kan de mate van toxiciteit vergeleken worden met beleidsnormen of ecotoxicologisch veilige grenswaarden.

3.2.3 Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De resultaten van het in vitro onderzoek laten een grote variatie in toxiciteit in de tijd zien, hoewel elk moeras toch wel een karakteristiek gemiddeld respons patroon laat zien. Voor vrijwel alle testen neemt de toxische potentie af in de loop van het moeras. Het meest opvallend is het bufferende vermogen in die gevallen waar op posities 1 en 2 een relatief grote toxiciteit optreedt. Hierdoor bereikt de toxiciteit niet het oppervlaktewater. Maar over het algemeen is de acute toxiciteit in de extracten vrij laag.

De meest duidelijke responsen worden gevormd door de estrogene activiteit. De estrogeniteit van het effluent van de conventionele installatie (positie 1) ligt in dezelfde orde van grootte als die van het LOES project (Landelijk Onderzoek Estrogene Stoffen) waar deze in effluent 0,2-9,5 (mediaan 0,9) pmol EEQ/L was.

In Grou is de estrogeniteit soms relatief hoog, maar deze neemt altijd af in de richting van posities 3 en 4. Vooral in augustus 2010 was er extreem hoge estrogene input. Soms is de EEQ op locatie 2 hoger dan op locatie 1. Dit zou kunnen komen door het verdwijnen van antagonisten of door het passeren van een batch effluent met relatief hoge estrogene activiteit, maar wellicht ook door vogels die hormonen in het water inbrengen. In Hapert neemt de estrogeniteit altijd eerst toe na positie 1. Over het algemeen is deze toename weer verdwenen op positie 4, behalve in mei. In Cuyk is de estrogeniteit ook het laagst bij het verlaten van het moeras (positie 4).

De gemiddelde en mediane androgene potenties zijn 3-10 keer lager dan de estrogene activiteit maar wel hoger dan de waarden uit het LOES project. Dit kan samenhangen met een andere extractie methode. De androgene activiteit neemt ook af tijdens de gang door het moeras.

Schildklierhormonequivalenten werden in geen van de geëxtraheerde watermonsters aangetroffen boven de detectiegrens van 0,01 tot 0,16 pmol T3-equivalenten /monster. De extractie methode is niet ontwikkeld of geëvalueerd voor schildklierhormoonreceptor gemedieerde werking, dus er is op dit moment nog geen uitspraak te doen over de aanwezigheid van een dergelijke specifieke endocrien versturende werking.

De DR-Luc responsen voor Benzo-a-pyreen laten geen duidelijk patroon over de moerassen zien. Wel zijn er uitschieters gevonden. In de extracten van de watermonster uit het moeras was geen dioxine-achtige toxische potentie waarneembaar, behalve bij één van de monsters van Grou (signaal dat net boven de waarnemingsgrens van 0,01 tot 0,25 pmol TEQ/monster lag). De verwachting is dat sedimentmonsters een grotere BaPEQ- en TEQ activiteit zullen hebben aangezien dergelijke stoffen een relatief hoge LogKow hebben en dus niet vrij in het water aanwezig zijn. Het is echter ook niet te verwachten dat er in watermonsters dioxine-achtige stoffen aanwezig zijn. In het LOES project werden soms hoge activiteiten van dioxine-achtige stoffen aangetroffen in sedimenten.

Verschillende waterextracten remden de werking van de cellulaire efflux pompjes, maar er was geen duidelijke relatie met de locatie in het moeras of het signaal nam juist toe naar het einde van het moeras. Het is nog niet duidelijk of dit komt door het verdwijnen van antagonisten of het verschijnen van meer gecompliceerde natuurlijke organische stoffen. Binnen het project zijn specifieke in vitro bioassays voor antibiotica ontwikkeld voor 96-wells platen. Er zijn twee bacterie stammen gebruikt (K.rhizophila en B.cereus) die specifiek gevoelig zijn voor blootstelling aan respectievelijk Tetracycline en Penicilline. De antibacteriële activiteit van de moeraswaterextracten waren echter lager dan de detectielimiet.

3.2.4 Draagt het zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

Het zuiveringsmoeras draagt wel bij aan de vermindering van de toxische potentie van de waterextracten van het effluent. De grootste verbetering is te zien in Grou tijdens de episodes met sterk verhoogde estrogene activiteit op positie 1 (in maart en augustus 2010). Na passage van het zuiveringsmoeras (positie 4) was de estrogene activiteit in die gevallen een factor 22 en 15 lager. Bij Grou is de gemiddelde reductie van estrogene potentie 7x. Bij Cuijck en Hapert zijn de resterende estrogene potenties in het effluent vrij consequent relatief laag, maar incidentele pieken worden efficiënt verwijderd. In Hapert valt op dat op posities 2 en 3 regelmatig de estrogene potentie toeneemt om daarna weer af te nemen naar positie 4. Het is de vraag of de toename komt doordat antagonisten uit het afvalwater worden afgebroken, of dat bv eventueel aanwezige vogels estrogene stoffen via hun ontlasting toevoegen aan het moeraswater.

3.3 In-vivo bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen (IMARES)

3.3.1 Beschrijving van de metingen

Vanaf maart 2010 tot en met januari 2011 zijn ca. elke 2 maanden watermonsters van ruim 20 liter verzameld van de 4 posities uit de drie zuiveringsmoerassen. Per monster werd 20 liter gedurende 48 uur geëxtraheerd met behulp van XAD kunsthars. De door hars opgenomen stoffen werden vervolgens overgebracht in 1 ml aceton. Van dit concentraat werd 0,5 ml gebruikt voor de in-vivo assays beschreven in dit rapport. 0,25 ml van concentraat werd gebruikt voor de uitvoering van in-vitro assays en de resterende 0.25 ml werd opgeslagen voor onvoorziene zaken.

De toxiciteit van de extracten werd bepaald met behulp van drie in-vivo testen: een bacterietest (microtox), een algengroeiremmingstest en een daphnia immobiliteitstest. Deze testen werden uitgevoerd met een verdunningsreeks van het concentraat.

3.3.2 Belang van de metingen

De metingen zijn uitgevoerd om een indruk te krijgen van de giftigheid van het bemonsterde effluent. Het voordeel van de concentratie methode, boven het direct testen van het watermonster is tweeledig. Enerzijds worden door deze werkwijze de testresultaten niet beïnvloed door randvoorwaarden van het watermonster (pH, nutriënten gehalten, etc.), anderzijds is het mogelijk om het effect van concentraten te testen waardoor met het gebruik van kortdurende testen toch een indicatie kan worden verkregen van het risico bij chronische blootstelling.

Door de testresultaten van verschillende posities in de zuiveringsmoerassen te vergelijken wordt een indruk verkregen of de toxiciteit van het effluent tijdens het doorlopen van het moerassysteem veranderd.

3.3.3 Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De toxiciteit van het effluent varieert sterk in de tijd, maar geen van de onderzochte monsters was zo toxisch dat er risico bestaat op het ontstaan van acute effecten. Echter, wanneer het criterium van Durand (2009) wordt gehanteerd dat er bij meer dan 0,05 Toxic Units sprake is van een risico bij chronische blootstelling dan laten de testresultaten zien dat deze grens regelmatig wordt overschreden. Bij rwzi Land van Cuijk en rwzi Grou was dit het geval bij 71% van de monsters die bij de ingang van het moeras werden verzameld als zijnde representatief voor het rwzi effluent zoals dat op het moerassysteem geloosd wordt. Bij rwzi Hapert lag dit percentage lager (43%), maar hier werden wel de sterkste overschrijdingen van de grenswaarde waargenomen. Van de gebruikte testorganismen bleek daphnia het meest gevoelig.

3.3.4 Draagt met zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

In de zuiveringsmoerassen worden pieken in toxiciteit gedempt. Bij het verlaten van het zuiveringsmoeras ligt het maximale Toxic Units niveau veelal lager dan bij het begin van het moeras. Bij rwzi land van Cuijk en Grou was de frequentie waarmee effluentmonsters beoordeeld werden als 'potentieel risico voor ontstaan chronische effecten' aan het eind van het zuiveringsmoeras gehalveerd ten opzichte van het begin van het moeras. Dit was niet het geval bij rwzi Hapert. Hoewel ook hier afname van toxiciteit werd waargenomen was dit niet voldoende om de relatief hoge overschrijdingen van de risicogrens volledig teniet te doen.

3.3.5 Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Het mechanisme achter het afvlakken van de toxiciteit die in de zuiveringsmoerassen plaatsvindt is niet duidelijk. Waarschijnlijk is de afname van de toxiciteit voor een belangrijk deel het gevolg van verdunning van batches relatief toxisch effluent tijdens het passeren van het moerassysteem. In dit geval is het van belang dat het moerassysteem voldoende volume heeft en een goede menging mogelijk maakt.

3.4 Overleving en reproductie van driedoornige stekelbaarzen in rwzi-zuiveringsmoerassen (IMARES)

3.4.1 Beschrijving van de metingen

Op alle bemonsteringsposities bij alle rwzi's zijn experimentele vijvers (mesocosms) met een inhoud van ca. 2,5 m geplaatst en voorzien van een continue aanvoer van effluent uit het zuiveringsmoeras. In elke mesocosm zijn 5 mannelijke en 10 vrouwelijke volwassen driedoornige stekelbaarzen (F0-generatie) uitgezet. De nakomelingen van deze vissen (de F1-generatie) bleven in de mesocosms. Het volgende voorjaar zijn van deze F1-groep 5 mannen en 10 vrouwen overgeplaatst naar mesocosms met 'schoon' Markermeer water om het reproductiesucces te bepalen. Op deze manier kon worden vastgesteld of het voortplantingssucces van de F1-generatie is beïnvloed doordat deze vissen tijdens geboorte en opgroeien continue blootgesteld zijn geweest aan effluent uit het zuiveringsmoeras. De resterende F1-vissen werden opgeofferd ten bate van de 'genomics' analyse (zie 3.6) en voor de bepaling van de conditiefactor.

3.4.2 Belang van de metingen

Hormoonverstoring van vissen als gevolg van stoffen uit rwzi-effluenten is ook in Nederland aangetoond. In laboratorium onderzoek is vastgesteld dat vissen vooral gevoelig zijn voor dergelijke verstoring wanneer zij worden blootgesteld gedurende de eerste levensfasen. Dit zou dan kunnen leiden tot lichamelijke en gedragsafwijkingen, met verminderd voortplantingssucces tot gevolg. Omdat in zuiveringsmoerassen intrek van vissen niet per definitie onmogelijk is en soms zelfs gestimuleerd wordt, is het van belang om te weten of dit tot ongewenste effecten kan leiden. Het onderzoek is uitgevoerd met de driedoornige stekelbaars, omdat dit deze soort zeer geschikt is voor onderzoek naar hormoonverstoring, een korte levenscyclus heeft en een natuurlijke bewoner van moerassystemen in Nederland kan zijn.

Met de proefopzet wordt de situatie gesimuleerd waarbij volwassen stekelbaarzen de zuiveringsmoerassen binnen trekken en zich daar op verschillende plaatsten voortplanten. De jongen groeien op dezelfde locaties op en verlaten vlak voor het nieuwe paaiseizoen het moeras om zich elders voort te planten.

3.4.3 Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De resultaten laten zien dat uitgezette stekelbaarzen op alle posities bij alle rwzi's kunnen overleven en tot voortplanting komen. De hoge sterfte echter die tussen oktober 2010 en april 2011 optrad bij rwzi land van Cuijk op posities 1 tot en met 3 suggereert dat periodiek de effluentkwaliteit de overleving van vissen in gevaar kan brengen, zonder dat de oorzaak van de sterfte kon worden vastgesteld.

In rwzi Grou en Hapert op positie 1 opgegroeide stekelbaarzen bleken zich met succes voort te planten. Verschillen die werden gevonden tussen de verschillend blootgestelde populaties waren

voornamelijk terug te voeren op het voedselaanbod en suggereerden geen effect van toxische stoffen in het effluent. Op basis van deze gegevens kan niet worden uitgesloten dat het voortplantingssucces van individuele vissen beïnvloed is door stoffen uit het effluent, echter dit leidde niet tot effecten op de populatie ontwikkeling. Wegens eerder genoemde sterfte bij rwzi land van Cuijk kon hier geen indruk van het reproductiesucces worden verkregen.

3.4.4 Draagt het zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

Het in deze studie vastgestelde milieurisico van het effluent lijkt te worden bepaald door periodiek optredende afwijking van de effluentkwaliteit. Hoewel de oorzaak niet is aangetoond zou dit de sterfte onder de stekelbaarzen bij rwzi Land van Cuijk op posities 1 tot en met 3 kunnen verklaren. Op positie 4 vond in dezelfde periode geen noemenswaardige sterfte plaats. Dit zou erop duiden dat het zuiveringsmoeras een dempende werking heeft op toxische pieken.

3.4.5 Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Het moerassysteem lijkt een bufferende werking te hebben en vermindert de kans dat effluent van mindere kwaliteit, bijvoorbeeld door tijdelijk disfunctioneren van de zuivering, direct op het oppervlaktewater geloosd wordt. Welke processen bij deze buffering een rol spelen is niet duidelijk, maar in elk geval lijkt het belangrijk dat het zuiveringsmoeras een voldoende lange verblijftijd heeft.

3.5 Rol van micro-organismen in rwzi-zuiveringsmoerassen bij de afbraak van oestrogenen (Deltares)

3.5.1 Beschrijving van de experimenten

In afbraakexperimenten op laboratoriumschaal is het belang van de microbiële activiteit bij de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Cuijk onderzocht. De zuiveringsefficiëntie is in dit geval gebaseerd op de afname van de nonylphenol concentratie of de oestrogene activiteit gedurende de experimenten.

De microbiële omzetting van nonylphenol is onderzocht in batchexperimenten met sediment en moeraswater uit het zuiveringsmoeras in Grou (punt 3; okt. 2009). Nonylphenol is toegevoegd in een eindconcentratie van 2,5 mg/l en gedurende de incubatie is op verschillende tijdstippen de nonylphenol concentratie geanalyseerd, afhankelijk van het verloop van de afbraakprocessen.

De afname van de oestrogene activiteit is ook in laboratorium experimenten uitgetest. Hiervoor is in batchflesjes sediment en moeraswater uit de 4 verschillende punten van de drie zuiveringsmoerassen gebruikt en schuddend geïncubeerd bij 20°C. Er zijn zogenaamde opofferingsexperimenten uitgevoerd; dit betekent dat voor elk analysetijdstip de gehele inhoud van een flesje is gebruikt voor de analyse van de slurry in een flesje. Gedurende de incubatie is op verschillende tijdstippen de inhoud van enkele flesjes voor de opwerking voor de analyses. Vervolgens zijn de extracten geanalyseerd op hun oestrogene activiteit mbv de ER-Luc assay.

3.5.2 Belang van de experimenten en metingen

Hoewel (xeno)estrogenen in een RWZI over het algemeen effectief (>90%) worden verwijderd, zijn de stoffen in het effluent doorgaans nog aantoonbaar. Uit onderzoek van Deltares / WUR is gebleken dat onder invloed van microbiële activiteit onder aerobe condities oestrogene verbindingen kunnen worden afgebroken (de Weert et al, 2008). De in dit project uitgevoerde experimenten geven inzicht in de rol van micro organismen bij de omzetting van oestrogene verbindingen in het zuiveringsmoeras.

Het voordeel van het verblijf van het effluent in het moerassysteem is dat het zuurstofgehalte van het effluent in delen van het moerassysteem toeneemt en er een langere verblijftijd is dan in de zuiveringsinstallatie (evt. mede door adsorptie aan sediment). Hierdoor lijken de condities in zuiveringsmoerassen gunstig voor de afbraak van de oestrogene stoffen, waardoor de oestrogene activiteit van het effluent afneemt.

Het doel van dit onderzoek is tweeledig:

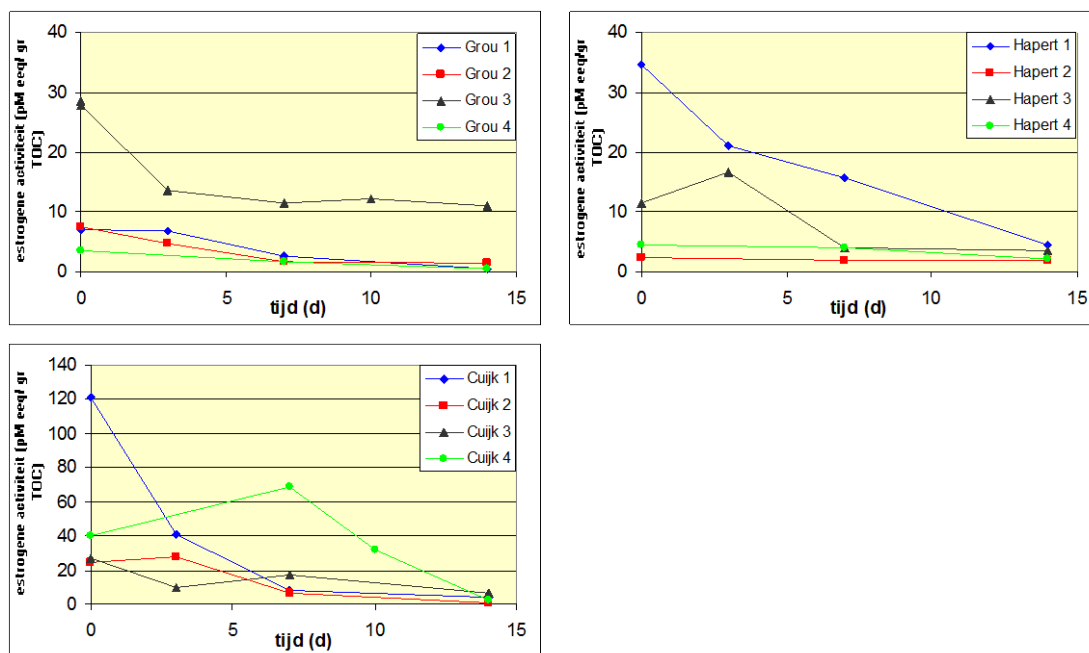
1. Identificeren van het belang van microbiële activiteit bij de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Land van Cuijk;
2. Ontwikkelen van methoden die de microbiële zuivering in moerassystemen stimuleren.

3.5.3 Suggesteren de experimenten een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De resultaten tonen aan dat het water en sediment van de zuiveringsmoerassen een hoge concentratie aan oestrogene activiteit hebben bij punt 1 van het moeras, direct na het lozingspunt van de RWZI. Dit impliceert een zeker risico van het moeras.

3.5.4 Draagt het zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

Het verblijf in een zuiveringsmoeras heeft een positieve invloed op de afname van de oestrogene activiteit, want de gemeten activiteit is in de moerassen n punt 1 hoger dan in punt 4. Dit geeft aan dat het zuiveringsmoeras bijdraagt aan een afname van de oestrogene activiteit van het moeras. Dit kan een combinatie zijn van microbiële omzetting en adsorptie aan het sediment. De omzetting van deze verbindingen door micro organismen speelt hierin een belangrijke rol, zoals is gebleken uit de uitgevoerde experimenten, zie Figuur 14.



Figuur 14 Oestrogene activiteit/g TOC in de tijd in batch experimenten met materiaal van Grou, Hapert en Land van Cuijk.

Uit de uitgevoerde experimenten naar de afbraak van oestrogene activiteit in batches met materiaal uit de verschillende punten van de zuiveringsmoerassen in Grou, Hapert en Cuijk kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Uit de experimenten met nonylphenol volgt dat nonylphenol binnen 2 weken volledig is omgezet en deze afbraaksnelheid is vergelijkbaar met de afname van de oestrogene activiteit in batch experimenten met materiaal van Grou, Hapert en Land van Cuijk.
- De initiële oestrogene activiteit in een mengsel van sediment en moeraswater varieert per zuiveringsmoeras en de hoogste oestrogene activiteit is aangetroffen in een mengsel van sediment en moeraswater uit Cuijk.
- In alle zuiveringsmoerassen is microbiële activiteit aanwezig, en deze afbraakpotentie heeft een positieve invloed op de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Cuijk en kan daardoor het milieurisico's van het effluent verminderen. De omzetting van de oestrogene activiteit vindt vooral plaats gedurende de eerste week van incubatie, in meerdere incubaties met materiaal uit de moerassen is de oestrogene activiteit in 4 tot 7 dagen volledig afgenomen. Daarnaast is de aanwezigheid van voldoende zuurstof van belang voor de omzetting van de oestrogenen verbindingen en de afname van de milieurisico's van het effluent.

3.5.5 Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

In een zuiveringsmoeras is de aanwezigheid van voldoende zuurstof voor de aerobe omzetting van de aanwezige oestrogene verbindingen. Vanwege de omzettingssnelheid is een verblijftijd van 4 tot 7 dagen voldoende voor de omzetting van de grootste concentratie aan aanwezige oestrogene verbindingen.

Omdat de oestrogene verbindingen voor een groot gedeelte in het moerassediment aanwezig zijn, is het belangrijk om te zorgen dat ze daaruit worden vrijgemaakt en vervolgens worden omgezet. De optimale condities hiervoor zijn een moeras met een dunne sedimentlaag wat regelmatig "opgewerveld" wordt, zodat de oestrogene verbindingen vanuit het moerassediment desorberen naar de waterfase. Dit zou in de sedimentatievijver kunnen plaatsvinden, het begin van het zuiveringsmoeras. Vervolgens kunnen de vrijgekomen oestrogene verbindingen worden omgezet in de aerobe waterfase. Om voldoende zuurstof in de waterfase te hebben is een ondiep moeras het gunstigste.

3.6 Stekelbaars transcriptomics in relatie tot de waterkwaliteit van de rwzi-zuiveringsmoerassen (Waternet)

3.6.1 Beschrijving van de biomarker-analyses

Van een deel van de F1 stekelbaarzen die zijn opgegroeid in de mesocosms in de zuiveringsmoerassen (zie hoofdstuk 3.4) zijn de levers uitgeprepareerd en gereed gemaakt voor 'transcriptomics'-onderzoek, waarbij met één analyse de expressie van 15.000 genen werd geanalyseerd. De genexpressie van de stekelbaarzen uit de moerassystemen is vergeleken met die uit een niet blootgestelde controlegroep. Verschillende stressfactoren (zoals giftige stoffen) kunnen de expressie van bepaalde genen remmen of stimuleren, waardoor verschillen tussen blootgestelde en niet blootgestelde vissen een indicator kunnen zijn voor de toxische stress van het RWZI-effluent. De verschillen in genexpressie tussen controles en blootgestelde stekelbaarzen werden met uitgebreide statistische en bioinformatica-pakketten geanalyseerd.

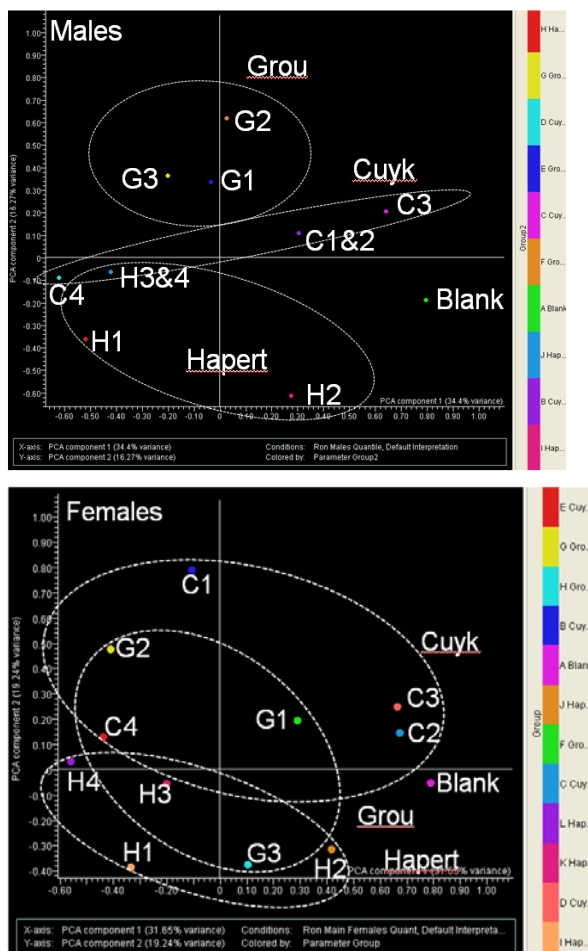
3.6.2 Belang van het biomarker-onderzoek

Het oppervlaktewater kan verontreinigd zijn met naar schatting ruim honderdduizend stoffen die mogelijk giftig zijn (Depledge en Fossi, 1994). Het is onmogelijk om het milieurisico van het complexe mengsel chemische verontreinigingen te schatten, omdat i. het technisch en financieel onmogelijk is om al deze stoffen chemisch te analyseren, ii. van de meerderheid van de stoffen weinig of niets bekend over de toxiciteit, iii. de biologische beschikbaarheid van de stoffen niet bekend is, iv. de mengseffecten (versterking of verzwakking van toxiciteit) onbekend zijn en v. de effecten van giftige omzettingsproducten niet bekend zijn. Om een enigszins betrouwbare schatting te kunnen maken van de milieurisico's van het RWZI-effluent moet dus niet alleen naar stoffen, maar vooral naar toxische effecten worden gekeken.

De biochemische veranderingen in levende waterorganismen die indicatief zijn voor de waterkwaliteit worden biomarkers genoemd. Biomarkers kunnen al een respons vertonen als nog geen nadelige effecten op de organismen te zien zijn, waardoor ze als vroege waarschuwing voor mogelijke effecten van milieuverontreiniging kunnen worden gebruikt. Genexpressie zoals met het transcriptiomics onderzoek voor de stekelbaarzen is bepaald kan worden beschouwd als in-vivo biomarker. De biomarker-analyses zijn toegepast als gevoelige indicator om de milieurisico's van de RWZI effluenten en de mogelijke effecten op het welzijn van in het moeras levende vissen te analyseren. Doordat vissen zijn blootgesteld aan water uit verschillende posities in het moeras kan ook het zuiveringsrendement (de mogelijke vermindering van de milieurisico's) van de systemen worden beoordeeld.

3.6.3 Het (milieu)risico van de RWZI-effluenten

Het hoofdexperiment voor dit werkpakket zou worden uitgevoerd met 20 stekelbaarzen (10 mannetjes en 10 vrouwtjes) per positie. Op enkele posities waren echter onvoldoende vissen aanwezig voor statistisch betrouwbaar onderzoek (♂: C2, C3, G4 en H4; ♀: C3 en G4).

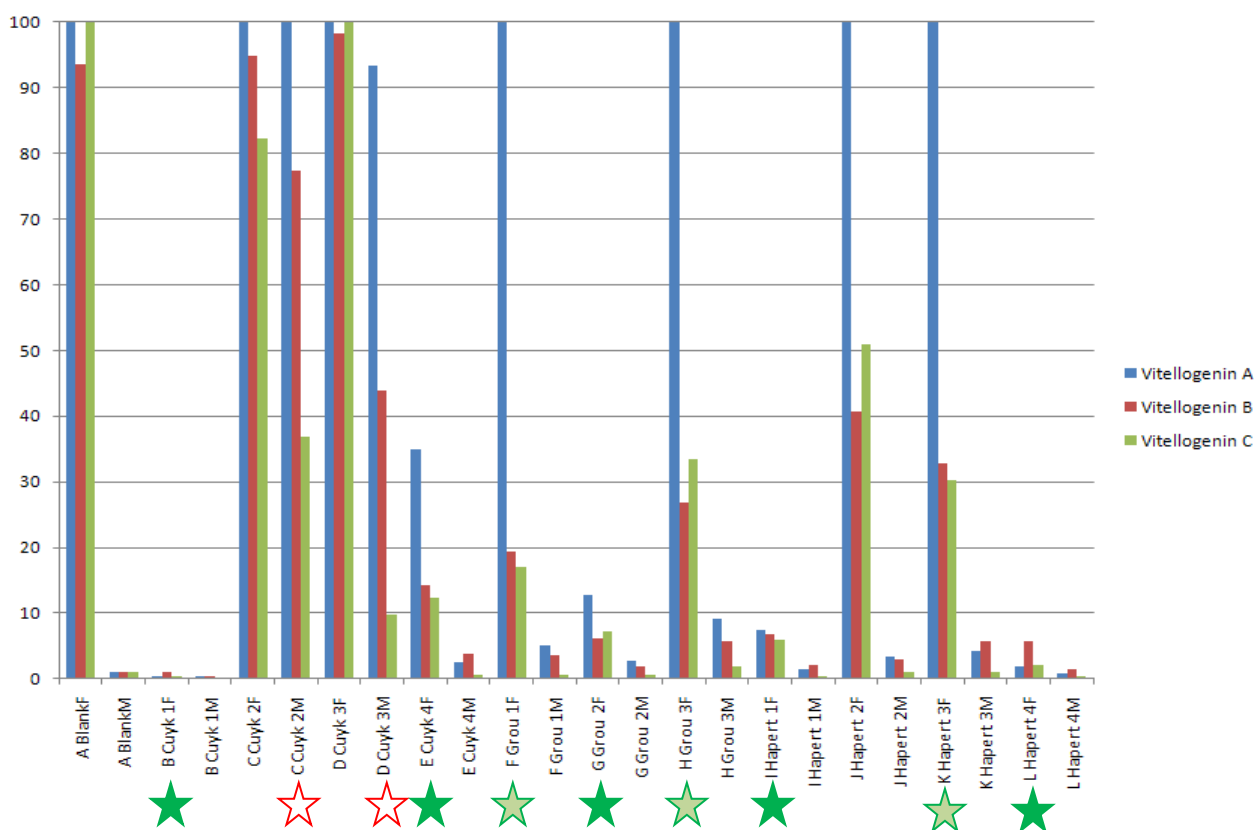


Figuur 15 Principale componentanalyse (PCA) op de genexpressie van mannelijke (Male) en vrouwelijke (Female) stekelbaarzen, gemiddeld van alle onderzochte locaties/posities. Waarop te zien is dat de genexpressie van de niet blootgestelde vissen (Blank)afwijkt van de in de zuiveringsmoerassen blootgestelde exemplaren.

Er werden duidelijke effecten gevonden op de totale genexpressie van vissen uit de zuiveringsmoerassen ten opzichte van de niet blootgestelde blanco vissen (Figuur 8). Ook binnen de zuiveringsmoerassen was het veelal mogelijk om op basis van de genexpressie de verschillende posities te onderscheiden.

Deze gegevens laten zien dat de stekelbaarzen uit de moerassen met RWZI-effluenten aan andere prikkels waren blootgesteld dan de controlevissen. De meeste genexpressie-biomarkers zijn niet alleen gevoelig voor chemische verontreiniging, maar ook voor factoren zoals voedsel, microbiologische verontreiniging (pathogenen), predatie, competitie, etc. Het is daarom belangrijk om bij de beoordeling van de resultaten ook rekening te houden met de mogelijke invloed van deze factoren.

Om de mogelijk nadelige effecten van RWZI-effluent te analyseren is een nader bioinformatica-onderzoek uitgevoerd op individuele genen en clusters van genen die bepaalde processen aansturen. Zo werd de expressie van drie vitellogenines (VTG A, B en C) bepaald om de hormoonhuishouding en eventuele verstoring daarvan te onderzoeken (Figuur 16). VTG's zijn enzymen die betrokken zijn bij de productie van eieren en die normaal dus alleen bij vrouwelijke vis tot expressie komen. Het feit dat dit ook werd aangetroffen bij mannelijke vissen uit rwzi Land van Cuijk (posities 2 en 3) is een aanwijzing dat deze vissen zijn blootgesteld aan hoge gehalten stoffen met estrogene activiteit. De remming van de VTG-expressie bij vrouwtjes die werd aangetroffen op locaties Land van Cuijk (C1, C4), Grou (G1, G2, G3) en Hapert (H1, H3 en H4) is een indicatie voor de blootstelling aan anti-estrogene stoffen.



Figuur 16 Vitellogenine-expressie in stekelbaars, gemiddelden per groep, genormaliseerd naar vrouwelijke blanco's, ★ = significante remming van VTG's in vrouwelijke vis; ★ = stimulatie van VTG-expressie in mannelijke vis (ruim 10x hoger, niet significant door hoge spreiding)

Zoals verwacht is er sprake van hormoonverstoring door RWZI-effluent, maar de effecten van anti-estrogenen lijken sterker dan die van estrogene stoffen. Het is opvallend dat de anti-estrogene effecten (VTG remming ♀) overheersen en dat deze in Cuijk alleen optreden op de posities C1 en C4, waar geen estrogeen effect (VTG stimulatie ♂) wordt waargenomen. De (anti)estrogene effecten kunnen mogelijk invloed hebben op de voortplanting van de vissen, hoewel geen effecten werden gevonden bij de reproductieproef). Hierbij moet worden aangetekend dat de reproductie van vissen uit de locaties C2 en C3 niet kon worden onderzocht door een hoge sterfte in deze mesocosms (alle vis werd gebruikt voor het biomarkeronderzoek).

De expressie van cytochroom P450 (CYP1A), een enzym met een belangrijke rol bij o.a. ontgiftiging, was significant verhoogd in stekelbaars van Grou en Land van Cuijk, terwijl de expressie in Hapert niet veranderde. Omdat CYP1A wordt gestimuleerd na blootstelling aan stoffen met dioxine-achtige activiteit (zoals PCB's en PAK's) is het waarschijnlijk dat de vis uit deze twee moerassen aan dergelijke stoffen werd blootgesteld. In de pilotstudie van 2010 werd in de F0-vis uit het Land van Cuijk een verhoogde expressie gevonden van genen die betrokken zijn bij DNA-reparatie, wat een indicatie kan zijn voor blootstelling aan genotoxische stoffen. In het definitieve experiment van 2011 met de F1-vis werd dit effect niet meer gevonden, maar was er in bepaalde gevallen juist sprake van remming van de expressie.

Met een zogenaamd 'gen ontologie'-onderzoek werd de expressie onderzocht van groepen genen die alle bij een bepaald lichamelijk proces zijn betrokken. Op alle locaties werd een duidelijk verhoogde expressie waargenomen van de genen die betrokken zijn bij de immunologische respons, wat kan duiden op blootstelling aan pathogene micro-organismen of weefselbeschadiging. Daarnaast was de expressie van genen die betrokken zijn bij ontstekingsreacties, insuline-achtige reacties, steroïde

responsen (o.a. glucocorticoiden) en glucosemetabolisme op veel locaties verhoogd, terwijl de expressie van genen die betrokken zijn bij celdeling, DNA-replicatie, mitochondriën (energievoorziening), cholesterol-biosynthese en eiwittransport op veel locaties verlaagd waren.

Er was een sterke overeenkomst in veranderingen in genexpressie na blootstelling aan alle RWZI-effluenten, die alleen op detailniveau verschilden. Ook waren er duidelijke verschillen in respons tussen mannelijke en vrouwelijke vissen. Het effect van een aantal van deze genetische veranderingen ten opzichte van de niet blootgestelde vissen lijkt voor de gezondheid van de vis niet gunstig te zijn.

3.6.4 Vermindering van het milieurisico van het RWZI-effluent door het zuiveringsmoeras

Om de invloed van het zuiveringsmoeras op de stekelbaarzen te bepalen is onderzocht of de gevonden effecten op de totale genexpressie ten opzichte van de niet blootgestelde controle vissen afnamen van positie 1 naar positie 4 in de zuiveringsmoerassen. Het bleek dat zowel voor de gestimuleerde als de geremde genen de expressie niet terugkeerde naar de niveaus van de controles, maar daar juist verder vanaf lag op positie 4. Wanneer gekeken wordt naar de verschillen tussen posities 1 en 3 van de zuiveringsmoerassen, blijken dat zowel de gestimuleerde als de geremde genexpressies in het Land van Cuijk (alleen ♀, te weinig ♂) en Hapert dichter bij de niveaus van de controle vissen lagen, terwijl die in Grou iets verder van het controleniveau waren verwijderd. Dit kan duiden op een licht positief effect van de eerste twee compartimenten (sedimentatievijvers en rietvelden) van de zuiveringsmoerassen.

Omdat niet ieder verschil in genexpressie schadelijk hoeft te zijn kan het zuiverende effect van de moerassen op de toxische stress beter worden bestudeerd met individuele genen of genclusters. Als we de verschillen in expressie van individuele genen vergelijken met de blanco-controles, dan lijkt er voor de hormoonverstoring in het Land van Cuijk een zuiverend effect op te treden, omdat de sterke vitellogenine-inductie in mannetjes verdwenen is op positie 4 (Figuur 3). Voor de overige onderzochte genen en genclusters zijn deze effecten minder duidelijk. Er is echter nog veel werk te doen om alle mogelijke effecten te onderzoeken.

3.6.5 Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Voor de meeste afwijkingen in genexpressie werd trad in de loop van het zuiveringsmoeras geen herstel op. Toch leek een lichte verbetering zichtbaar op de gemiddelde afwijkingen van de controlevis, vooral na de eerste twee compartimenten van de moerassen (sedimentatievijvers en rietvelden). Het is moeilijk hieruit een aanbeveling voor optimalisering van de zuiveringsmoerassen te destilleren; een langere verblijftijd van het water in rietvelden zou een mogelijke aanbeveling kunnen zijn.

3.6.6 Toxicologie: relaties tussen biomarkers, chemie en bioassays

Hoewel de onderzochte F1-vissen sinds hun geboorte in de mesocosms aanwezig waren is niet het effect van alle stoffen waaraan ze in deze periode zijn blootgesteld meetbaar met een transcriptomics-onderzoek. Genexpressie is de eerste reactie van een organisme op een bepaalde chemische stressfactor. Als de stof echter niet meer in relevante concentraties aanwezig is, zal de respons minder sterk worden. Daarom zullen alleen de meest recente blootstellingen, enkele weken voor het doden van de dieren, een meetbaar effect hebben op de genexpressie. De laatste meetcampagnes van de chemie en de bioassays werden echter enkele maanden voor de

bemonstering van de vis uitgevoerd, zodat het lastig is om de toxicologische relaties tussen biomarkers en de overige parameters aan te tonen.

Met een experimentele *CTD-enrichment analysis* zijn veranderingen in genexpressie gerelateerd aan blootstelling aan bepaalde typen stoffen. Hierbij werden overeenkomsten gevonden tussen stoffen die zowel chemisch als genetisch in de zuiveringsmoerassen werden aangetoond (bijvoorbeeld pyreen, cafeïne, benzo(a)pyreen, chlorpyrifos, hexachloorbenzeen, carbamazepine, acetaminofen). De genexpressie van de vissen zou ook kunnen duiden op blootstelling aan medicijnen zoals resveratrol, fluorouracil, irinotecan en cytaribine, die worden toegepast bij de chemotherapie tegen kanker en ethynylestradiol uit de anticonceptiepil. Zeker voor de laatste is het aannemelijk dat deze in rwzi effluent voorkomt, maar deze stof kon niet chemisch worden geanalyseerd.

Met zes in-vitro bioassays zijn de celtoxiciteit, de hormoonverstoring (estrogene, androgene en groeihormoonactiviteit), de dioxine-achtige toxiciteit en het effect op cellulaire uitscheiding van stoffen onderzocht. Over het algemeen was er een grote spreiding in de effecten, zowel in de tijd als per locatie/positie. Het is daarom lastig om duidelijke relaties aan te tonen tussen de responsen van bioassays en biomarkers.

Enkele opmerkingen zijn echter wel mogelijk. Zo was de gemiddelde respons van de DR-Luc om stoffen met dioxine-achtige effecten aan te tonen was op alle locaties gemiddeld even hoog, terwijl de vergelijkbare expressie van cytochroom P4501A in de stekelbaars duidelijk verhoogd was in Cuijk en Grou.

Bij de laatste bemonstering werd met de ER-Luc een verhoogde estrogene activiteit (♀ hormoon) waargenomen op positie Cuijk 2, hetgeen goed overeenkwam met de sterke vitellogenine-inductie in de stekelbaarsen op die positie. Hoewel de ER-Luc-activiteit sterk afnam in de rietvelden verdween de sterke estrogene hormoonverstoring in mannelijke stekelbaars uit Cuijk echter pas in de afvoersloot, na passage door de rietvelden.

Met de TR-Luc-bioassay voor het thyroïde groeihormoon werd vrijwel geen respons gevonden, en ook de genexpressie van dit hormoon in de stekelbaars was slechts weinig verhoogd.

Met de CEPIA-test werd een lichte remming gevonden van de activiteit van de cellulaire uitscheiding van chemicaliën (MXR = *Multi Xenobiotic Resistance*) terwijl in de vis werd juist een licht verhoogde expressie van P-glycoproteïne (P-gp) gevonden, vooral in de vrouwtjes. P-gp is een van de belangrijkste eiwitten die een rol spelen bij dit cellulaire MXR verdedigingsmechanisme.

Een opvallende correlatie was de relatie tussen de cytotoxiciteit (MTT) en de verhoogde expressie van genen die betrokken zijn bij apoptose (geprogrammeerde celdood) in de stekelbaars. Daarnaast werd een interessant verband waargenomen tussen de verhoogde respons in de algentest en de expressie van genen die betrokken zijn bij de energievoorziening van de cellen (bijvoorbeeld ATP-synthese en ademhaling).

3.7 Factoren gerelateerd aan de vermindering van pathogenen in de rwzi-zuiveringsmoerassen (Waternet)

3.7.1 Beschrijving van de metingen

In dit werkpakket is de concentratie ziekteverwekkers in het effluent van een waterzuivering geanalyseerd en is bestudeerd in hoeverre deze tijdens het verblijf in een zuiveringsmoeras verminderd. Tevens wordt getracht de belangrijkste processen voor verwijdering van ziekteverwekkers in verschillende compartimenten van het zuiveringmoeras (vooral bezinkingsvijvers en rietvelden) te identificeren. Hiervoor zijn maandelijkse metingen verricht in het zuiveringsmoeras in Grou, Friesland, waarbij de hoeveelheid van drie verschillende indicatoren van ziekteverwekkers *Escherichia coli*, *Enterococci* en *Clostridium perfringens* is bepaald. Uit de bepalingen van deze bacteriën op cruciale locaties in het zuiveringsmoeras is de potentiële verwijdering van ziekteverwekkers in het RWZI effluent tijdens het verblijf in het zuiveringsmoeras bepaald. Met een innovatieve analyse met bacteroiden en bacteriofagen, die een schatting geeft voor de verhouding tussen bacteriën van humane en de dierlijke herkomst, is gekeken naar mogelijke toevoeging van bacteriën tijdens het verblijf in zuiveringsmoerassen door watervogels en andere dieren.

Om te bekijken of ongewervelden die van nature in de moerassen aanwezig zijn zoals zoöplankton (watervlooien) en aan rietstengels gehecht epifauna een bijdrage leveren aan de verwijdering van ziekteverwekkers zijn de aantallen individuen per geslacht/soort binnen de verschillende compartimenten bepaald. Met behulp van literatuurgegevens is van deze gemeenschappen vervolgens ingeschat hoeveel zwevende deeltjes (inclusief ziekteverwekkers) er per tijdeenheid uit het water kunnen worden opgegeten.

Naast deze monitoring campagne zijn er ook laboratoriumexperimenten uitgevoerd waarbij effluent van de waterzuivering is geïncubeerd onder gecontroleerde condities om de effecten van afzonderlijke factoren op de verwijdering van *E.coli* te bepalen:

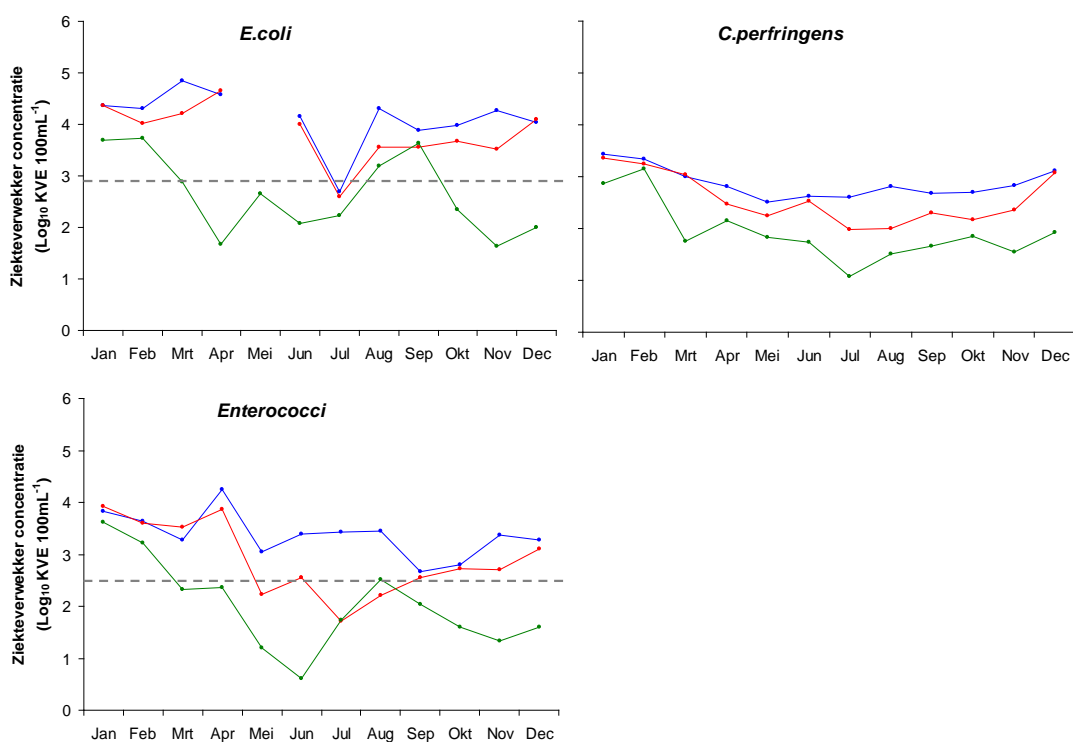
- Klein zoöplankton (tussen de 5 en 25µm groot)
- Groot zoöplankton (groter dan 25µm)
- Natuurlijke sterfte
- Temperatuur
- Zuurstof gehalte
- UV-straling

3.7.2 Belang van de metingen

Door deze monitoring en experimenten moet duidelijk worden of de hoeveelheden ziekteverwekkers die aanwezig zijn in het effluent van rioolwaterzuiveringen een gezondheidsrisico kunnen vormen als dit effluent direct op het oppervlakte water geloosd wordt en of zuiveringsmoerassen deze mogelijke gezondheidsrisico's kunnen verminderen of voorkomen. Indien dit inderdaad het geval blijkt te zijn, is het ook belangrijk dat er in dit onderzoek duidelijk wordt hoe deze desinfectie tot stand komt om eventuele mogelijkheden tot verbetering aan te geven. Om dit te realiseren is gekeken naar de bijdrage van de verschillende compartimenten van het zuiveringsmoeras en welke processen in deze compartimenten de verwijderingsbijdrage bepalen.

3.7.3 Het (milieu)risico van de rwzi-effluenten

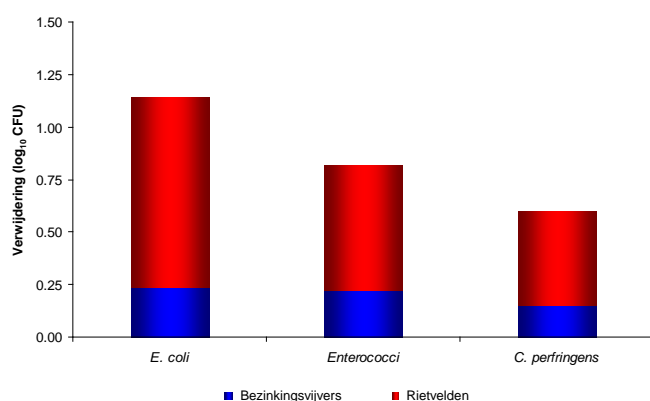
Uit de resultaten blijkt dat de gemiddelde hoeveelheid *E.coli* in het effluent van de waterzuiving in Grou 4,33 log₁₀ kolonie vormende eenheden per 100 milliliter bedroeg, voor *Enterococci* lag dit gemiddelde op 3,57 en voor *C.perfringens* op 2,97 (Figuur 17, blauwe lijnen). Voor alle drie ziekteverwekkers zijn deze waarden normaal voor waterzuiveringseffluent. De waarden voor *E.coli* en *Enterococci* zijn echter wel beide ruim boven de zwemwaternorm (*C.perfringens* is niet opgenomen in de zwemwater norm) (EU 2006). Waterzuiveringen hoeven niet aan deze norm te voldoen tijdens het lozen van effluent, maar dit geeft wel aan dat er mogelijke gezondheidsrisico's zijn als het RWZI effluent direct op oppervlakte water wordt geloosd. In Hapert en Cuijk hebben minder bemonsteringen plaatsgevonden, maar de hoeveelheden bacteriën zijn vergelijkbaar met de waarden in Grou en ook daar liggen de hoeveelheden *E.coli* en *Enterococci* boven de zwemwaternorm.



Figuur 17 De kolonie vormende eenheden (KVE) *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* per 100mL in het effluent van RWZI Grou (blauw), effluent van de sedimentatie vijvers (rood) en effluent van de rietvelden (groen) gedurende 2010. De stippellijnen vertegenwoordigen de zwemwaternorm voor *E.coli* en *Enterococci*.

3.7.4 Vermindering van het milieurisico van het RWZI effluent door het zuiveringsmoeras

De metingen op de andere bemonsteringspunten laten zien dat de hoeveelheid ziekteverwekkers tijdens het verblijf in het zuiveringsmoeras (Grou) afnemen (Figuur 17; verschil tussen de blauwe, rode en groene lijnen). In het effluent van het zuiveringsmoeras waren de *E.coli* concentraties acht van de twaalf maanden lager dan de zwemwaternorm, met overschrijdingen in de winter (januari en februari) en aan het einde van de zomer (augustus en september). Voor *Enterococci* werd de grens twee maal overschreden in het zuiveringsmoeras effluent in januari en februari. Ook bij *Enterococci* was een piek te zien aan het einde van de zomer, maar deze bleef wel onder de norm. De gemiddelde verwijdering van *C.perfringens* was laag in Hapert (0,20 log₁₀ KVE 100mL⁻¹) in vergelijking met Cuijk (0,99) en Grou (1,16). Hapert had een lagere verwijdering van *Enterococci* (0,26 log₁₀ KVE 100mL⁻¹) in vergelijking met Grou in dezelfde periode (0,88), in Cuijk werd zelfs een toename van *Enterococci* (-1,45) waargenomen. Vanwege het lage aantal metingen in zowel Hapert als Cuijk en gelet op de variatie die bij de metingen van Grou is waargenomen, moeten de waarnemingen in Hapert en Cuijk met grote voorzichtigheid worden geïnterpreteerd. Op basis van de metingen in Grou is echter wel duidelijk dat zuiveringsmoerassen een sterke bijdrage kunnen leveren aan de vermindering van gezondheidsrisico's die effluent van waterzuiveringen kunnen vormen.



Figuur 18 Gemiddelde verwijdering van *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* na verblijf in de sedimentatie vijvers (blauw) en de rietvelden (rood) van 12 maandelijkse bemonsteringen in 2010.

De verwijdering van *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* is in zowel de bezinkingsvijvers als de rietvelden waargenomen, maar is sterker in de rietvelden (Figuur 18). Mogelijk (gedeeltelijk) doordat de verblijftijd in de rietvelden langer is dan in de bezinkingsvijvers, of doordat er andere processen in de rietvelden plaats vinden ten opzicht van de bezinkingsvijvers. Sedimentatie in de bezinkingsvijvers lijkt weinig bij te dragen aan de verwijdering. De begrazing door ongewervelden lijkt een belangrijkere factor te spelen in de bezinkingsvijvers, en dan vooral de aanwezigheid van kleine (<30µm) trilhaardiertjes en amoeben. Ook in de laboratoriumexperimenten bleek de verwijdering van *E.coli* voornamelijk te worden veroorzaakt door kleine zooplankton soorten (<25µm). In de rietvelden is de invloed van het zooplankton minder duidelijk. Dit kan worden veroorzaakt doordat andere processen zoals sedimentatie en het invangen door biofilm mogelijk invloed hebben op de verwijdering van ziekteverwekkers.

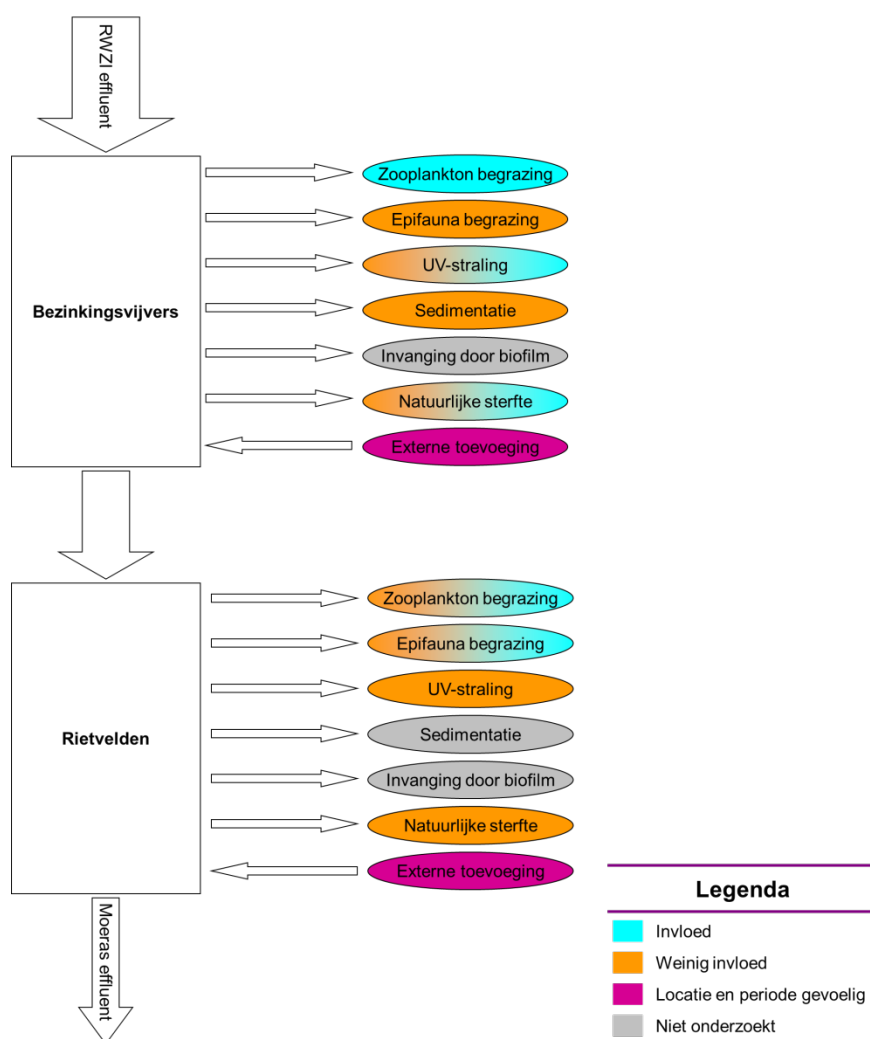
Onder laboratorium omstandigheden is UV-straling met een lagere intensiteit dan de zon reeds erg effectief bij verwijderen van *E.coli*. Door de hoge hoeveelheden opgelost organische koolstof (DOC) van rwzi effluent zal UV-straling maximaal 20 cm diep doordringen. Doordat de bezinkingsvijvers veel

dieper zijn en zonlicht in de rietvelden nauwelijks het wateroppervlak zal bereiken is in de onderzochte zuiveringsmoerassen, het effect van UV straling uit zonlicht waarschijnlijk gering.

De laboratoriumexperimenten suggereerden dat het verhogen van de zuurstof concentratie positieve effecten heeft op de verwijdering van ziekteverwekkers, wat in overeenstemming is met de wetenschappelijke literatuur. Dit kan komen door de directe (toxische) effecten van zuurstof op bacteriën of door het verhogen van de activiteit van zooplankton. Het zuurstofgehalte in Grou was erg laag door het gehele zuiveringsmoeras heen, waardoor de bijdrage van zuurstof op de verwijdering van ziekteverwekkers waarschijnlijk klein is geweest.

Tenslotte bleek dat watervogels waarschijnlijk ook ziekteverwekkers toevoegen aan de zuiveringsmoerassen. De sterkte van deze mogelijke toevoeging leek sterk locatie afhankelijk, waarbij Hapert en Cuijk een veel sterkere toevoeging leken te krijgen dan Grou. Deze waarnemingen zijn echter gebaseerd op een klein aantal metingen.

In Figuur 19 is een schematisch overzicht gegeven van de processen die vanuit dit onderzoek mogelijk belangrijk zijn bij de verwijdering van ziekteverwekkers in zuiveringsmoerassen.



Figuur 19 De bijdrage van verschillende factoren op de verwijdering van ziekteverwekkers in de bezinkingsvijvers en de rietvelden, waarbij factoren met invloed (blauw), factoren met weinig invloed (oranje) op de verwijdering van ziekteverwekkers, factoren die erg variabel zijn in tijd en locatie (paars) en factoren waarvan de bijdrage niet onderzocht is (grijs).

3.7.5 Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

De zuiveringsmoerassen hebben een duidelijk positief effect op de hygiënische waterkwaliteit van RWZI-effluent. Om de verwijdering van ziekteverwekkers verder te verbeteren kunnen uit dit onderzoek een aantal aanbevelingen worden gedaan.

Door de verblijftijd te verhogen in voornamelijk de rietvelden kunnen factoren die bijdragen aan de verwijdering van ziekteverwekkers langer invloed uitoefenen. Door vergroting van de rietvelden wordt tevens de volume:oppervlakte verhouding in het zuiveringsmoeras vergroot waardoor de interactie tussen effluent en biofilm en epifauna wordt bevorderd. Dit kan ook bereikt worden door het inbouwen van kunstmatige honingraat-achtige constructies loodrecht op de stroomrichting, bijvoorbeeld met borstelmetaal.

De eliminatie van ziekteverwekkers kan worden bevorderd door de zuurstofconcentratie van het effluent te verhogen. Dit kan op energiezuinige wijze worden gerealiseerd door het inbouwen van ondiepe delen en cascades in de zuiveringsmoerassen en/of door het toevoegen van een compartiment met ondergedoken waterplanten, hoewel dit laatste gedurende de nacht weer tot extra zuurstof consumptie zal leiden. Doordat het verwijderen van stikstof een anaeroob proces is kan het verhogen van de zuurstof concentratie negatieve effecten hebben op de stikstof verwijdering in de rietvelden. Het verhogen van de zuurstofconcentratie zal dus pas na een eerste passage van rietvelden moeten worden uitgevoerd.

Ondiepe delen en cascades die op het invallende zonlicht gericht zijn kunnen ook worden ingezet om de invloed van van UV-straling uit zonlicht te verhogen. Omdat UV-straling van de zon een niet te reguleren externe factor is, kan deze echter geen constante bijdrage leveren aan verwijdering van ziekteverwekkers.

De invloed van moerassystemen op de milieukwaliteit van rwzi effluent en aanbevelingen tot optimalisering

Bijlagerapport A



*Waterharmonica Improving Purification Effectiveness
(Moeraszuiver afvalwater)*



Inhoudsopgave

Het project WIPE.....	5
Onderzoeklocaties	6
Projectopzet	8
Leeswijzer	10
1 Beoordeling zuiveringsrendement van zuiveringsmoerassen voor organische microverontreinigingen met behulp van passieve sampling.....	11
1.1 Samenvatting	12
1.2 Materiaal en methoden	14
1.3 Resultaten	19
1.4 Discussie en conclusies.....	28
1.5 Referenties	30
1.6 Bijlagen	32
2 In-vitro bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen	49
2.1 Samenvatting	50
2.2 Principe van de toegepaste meettechnieken.....	51
2.3 Materiaal en methoden	53
2.4 Resultaten	54
2.5 Discussie	66
2.6 Conclusies en aanbevelingen	67
2.7 Referenties	67
3 In-vivo bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen	71
3.1 Samenvatting	72
3.2 Materiaal & Methoden.....	73
3.3 Resultaten	75
3.4 Discussie	86
4 Overleving en reproductie van driedoornige stekelbaarzen in rwzi-zuiveringsmoerassen ...	97
4.1 Samenvatting	98
4.2 Achtergrond van de toegepaste meettechnieken.....	99
4.3 Materiaal en methoden	100
4.4 Seizoen 2010-2011	101
4.5 Resultaten	104

4.6	Discussie	111
4.7	Conclusies en aanbevelingen	114
4.8	Referenties	115
5	Rol van micro-organismen in rwzi-zuiveringsmoerassen bij de afbraak van estrogenen	125
5.1	Samenvatting	126
5.2	Principe van de toegepaste experimenten en meettechnieken	129
5.3	Material en methoden	129
5.4	Resultaten en Discussie	131
5.5	Conclusies en aanbevelingen	135
5.6	Referenties	136

Het project WIPE

Inleiding

De Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) verplicht de EU-staten tot het bereiken van een goede ecologische en chemische kwaliteit van het oppervlaktewater in 2015. Ondanks effectieve zuiveringstechnieken vormen rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) nog belangrijke (punt)bronnen van nutriënten en verontreinigingen en zijn daarmee nog steeds een potentiële bedreiging voor de doelen van de KRW. Bovendien vormen rwzi effluenten een potentiële bron voor microbiële verontreiniging van het oppervlaktewater met humane fecale bacteriën, waaronder mogelijk pathogenen.

Bij verschillende rwzi's worden dan ook maatregelen getroffen om het effluent uit de rwzi verder te reinigen voordat het geloosd wordt, bijvoorbeeld door het toepassing van actiefkoolfiltratie (Stowa, 2010).

Een alternatieve nabehandeling van effluent is de toepassing van het zogenaamde 'waterharmonica-concept'; zie: www.waterharmonica.nl), waarbij het effluent door een zuiveringsmoeras gevoerd wordt voordat het op het oppervlaktewater geloosd wordt. Deze 'ecological engineering approach' kan resulteren in een reductie van gehalten zware metalen, nutriënten, bacteriën en slib in het effluent en heeft bovendien een gunstig effect op zuurstofdynamiek en de biodiversiteit (Knox et al, 2008; Molleda et al, 2008, Reinoso et al 2008). Als gevolg van de relatief lage kosten en de toegevoegde ecologische waarde worden dergelijke moerassystemen in Nederland steeds vaker ingezet voor nabehandeling van rwzi effluent. Hoewel de huidige moerassystemen al een duidelijke toegevoegde waarde hebben, blijven er vragen over het gedrag van toxische stoffen en pathogenen in een dergelijk systeem. Met meer inzicht in de effectiviteit van moerassystemen op dit vlak kan de inrichting van moerassystemen mogelijk worden geoptimaliseerd. Deze vragen zijn temeer interessant vanwege het feit dat moerassystemen in de praktijk gekoppeld worden aan potentiële natuurontwikkeling.

In het project WIPE (Waterharmonica Improving Purification Effectiveness) is daarom onderzocht of zuiveringsmoerassen ook een bijdrage kunnen leveren aan de vermindering van het risico op milieueffecten door rwzi-effluenten.

De hoofddoelen van het project waren:

- het onderzoeken van de invloed van een zuiveringsmoeras op de kwaliteit van het rwzi effluent met name gericht op toxiciteit en het voorkomen van pathogenen;
- het geven van aanbevelingen voor een optimaal ontwerp van moerassystemen voor de nazuivering van rwzi-effluent, bij voorkeur in combinatie met natuurontwikkeling zonder nadelige ecotoxicologische consequenties.

Tevens zou het project inzicht moeten geven in de praktische toepasbaarheid van nieuwe (effect)monitoringstechnieken als passieve samplers, nieuw ontwikkelde effectspecifieke assays en genetische biomarkers.

Het project werd uitgevoerd tussen april 2009 en oktober 2011 door IMARES, Deltares, Waternet en de Wageningen Universiteit. Er werd samengewerkt met Wetterskip Fryslân, Waterschap Aa en Maas en Waterschap de Dommel. WIPE werd gesubsidieerd vanuit de Innovatieregeling Kaderrichtlijn Water 2008 van het Ministerie van Infrastructuur en Milieu (projectnummer KRW0829).

Het voorliggende rapport bevat een samenvatting van de bevindingen van het WIPE project. Voor de volledigheid zijn de samenvattingen van de achterliggende deelrapportages als bijlage in dit samenvattend rapport opgenomen.

Onderzoekslocaties

Tabel 1 Karakteristieken van de rwzi's met zuiveringsmoerassen die dienst deden als onderzoekslocaties

	Rwzi Grou	Rwzi Hapert	Rwzi Land van Cuijk
Waterschap	Wetterskip Fryslân	Waterschap De Dommel	Waterschap Aa en Maas
Adres	Molesingel 2 9001 ZD Grou	Castersedijk 25 5527 JR Hapert	Beijersbos 4 5443 PL Haps
Type zuivering	Carrousel	Oxidatiesloot	Actief-slibinstallatie
Capaciteit i.e. à 136 gr. TZV/dag	25.000 i.e.	71.000 i.e.	175.000 i.e.
Hydraulische capaciteit DWA		718 m ³ /uur	2.500 m ³ /uur
Hydraulische capaciteit RWA	1.140 m ³ /uur	2.543 m ³ /uur	8.000 m ³ /uur
Ontvangend water	Kromme Grouw	Grote Beerze	Maas
Afvalwater bronnen	Huishoudelijk ca. 75%, Bedrijven (agrarisch, watersport) ca. 25% enkele verzorgingstehuizen	Huishoudelijk en Industrieel afvalwater	Huishoudelijk ca. 50%, industrieel ca 50%, ziekenhuis
Zuiveringsmoeras vanaf	2006	2001	1999
Effluentaandeel door moeras	Constant: 1000 m ³ /d	33% van rwzi effluent (zuidelijk moerassysteem)	Variabel 5-50% van rwzi effluent
Oppervlak (totaal)	Ca. 0,7ha	Ca. 2,1 ha (zuidelijk moerassysteem)	Ca. 3 ha
Oppervlakte bezinkvijver	0,1ha	0,6 ha	0,5 ha
Oppervlakte rietvelden	0,5ha	0,9 ha	2,0 ha
Oppervlakte 3 ^e compartiment	-	1,6 ha	0,5 ha
Verblijftijd	Ca. 3 dagen	Variabel, gemiddeld ca. 3 dagen	Variabel, gemiddeld ca. 4 dagen

Voor het onderzoek zijn drie rwzi's geselecteerd waar zuiveringmoerassysteem reeds gedurende enige tijd in gebruik zijn. Het betreft rwzi Grou (Figuur 1), rwzi Hapert (Figuur 2) en rwzi Land van Cuijk (Figuur 3). In het moerassysteem van elk van deze rwzi's kunnen drie compartimenten worden onderscheiden waar het effluent vanuit de rwzi successievelijk doorheen geleid wordt voordat het wordt geloosd op het oppervlaktewater. De eerste twee compartimenten worden op elke locatie gevormd door respectievelijk een 'bezinkvijver' en 'rietvelden'. De inrichting van het derde compartiment verschilt per locatie. Bij rwzi Grou bestaat dit uit een lagune ingericht als paabiotoop voor vis (men name gericht op snoek) met een open verbinding naar het oppervlaktewater. Bij rwzi Land van Cuijk wordt het derde compartiment gevormd door een afvoersloot, terwijl het bij rwzi Hapert is ingericht als een moerasbos. Enkele karakteristieken van de rwz's en de bijgelegen zuiveringsmoerassen zijn gegeven in Tabel 1.



Figuur 1 **Rwzi Grou met zuiveringsmoeras bestaande uit een bezinkvijver (Rood omkaderd), rietvelden (geel omkaderd) en lagune (blauw omkaderd). De nummers 1 tot en met 4 geven de bemonsteringsposities weer.**



Figuur 2 **Rwzi Hapert met zuiveringsmoeras bestaande uit een bezinkvijver (Rood omkaderd), rietvelden (geel omkaderd) en moerasbos (blauw omkaderd). De nummers 1 tot en met 4 geven de bemonsteringsposities weer.**



Figuur 3 **Rwzi Land van Cuijk met zuiveringsmoeras bestaande uit een bezinkvijver (Rood omkaderd), rietvelden (geel omkaderd) en afvoersloot (blauw omkaderd). De nummers 1 tot en met 4 geven de bemonsteringsposities weer.**

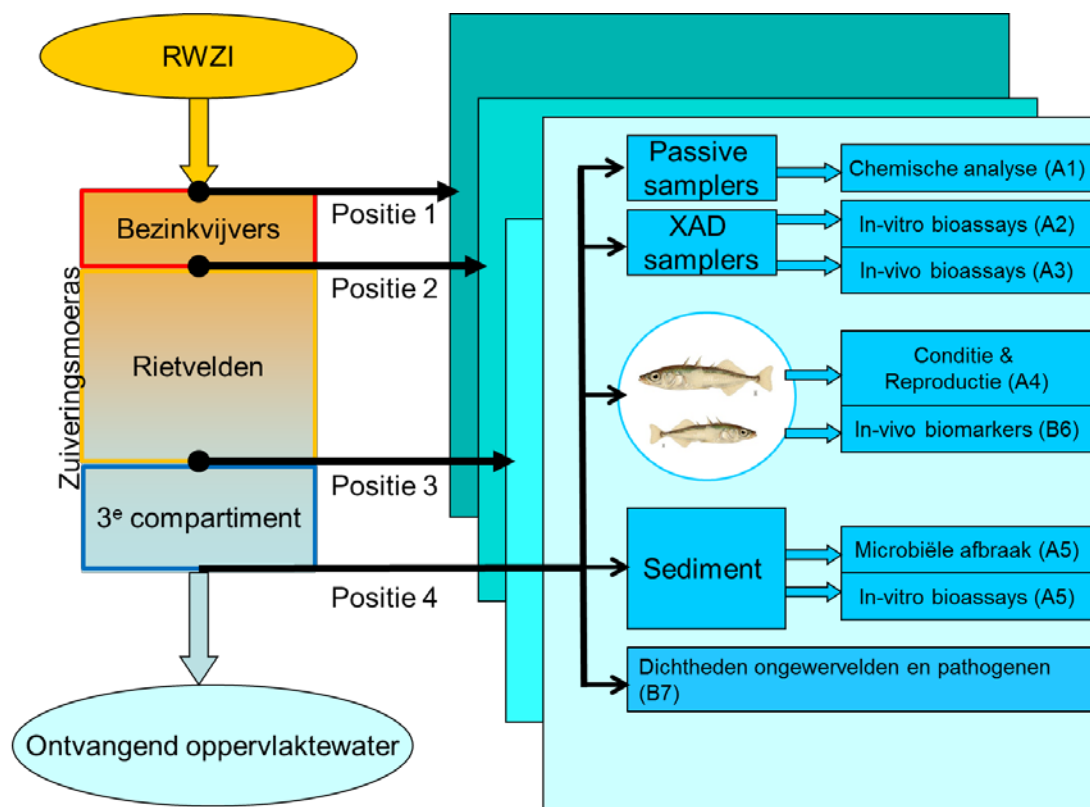
Projectopzet

Bemonsteringsposities

Alle onderzoekslocaties zijn tussen het voorjaar 2009 en najaar 2010 regelmatig bemonsterd op vier posities (Figuur 4) die representatief zijn voor

- het effluent zoals dat op het moeras geloosd wordt (positie 1),
- na passage van de bezinkvijvers (positie 2),
- na passage van de rietvelden (positie 3) en
- na passage van het 3e compartiment, dus zoals het uiteindelijk op het oppervlaktewater geloosd wordt (positie 4).

In de praktijk bleek het niet mogelijk om de monsterposities exact in de overgangen tussen de compartimenten aan te brengen en werden de ideale posities zoveel mogelijk benaderd (Figuur 1, Figuur 2, Figuur 3).



Figuur 4 Schematische voorstelling van het onderzoeksprogramma van het WIPE-project per onderzoekslocatie (rwzi's) op de 4 bemonsteringsposities. De codes tussen haakjes verwijzen naar de deelrapportages van deze onderwerpen zoals opgenomen in de bijlage rapporten A (deelrapportage 1 t/m 5) en B (deelrapportages 6 en 7). De nummers in de codes verwijzen tevens naar de samenvattingen die zijn opgegeven in hoofdstuk 3 van dit rapport.

Bemonstering

In principe werd op elke positie en op elke locatie hetzelfde chemische en biologische bemonsteringprogramma uitgevoerd, zoals hieronder beknopt beschreven. Meer uitgebreide beschrijvingen en de resultaten zijn vastgelegd in individuele achtergrond documenten.

Chemische analyses met passieve samplers

Met behulp van passieve samplers van siliconen rubber zijn tijdgeïntegreerde bemonsteringen uitgevoerd. De passieve samplers werden hiertoe gedurende meerdere weken op de bemonsteringsposities uitgehangen en concentreerden in die periode een breed scala aan milieuvreemde stoffen uit het effluent. Door chemische analyse van deze samplers is een beeld verkregen van de aanwezigheid van milieuvreemde stoffen in het effluent op de verschillende posities in de zuiveringsmoerassen, waaruit de invloed van de zuiveringsmoerassen op de aanwezigheid van deze stoffen kon worden bepaald. Bovendien zijn de gehalten gebruikt voor het berekenen van het milieurisico van het effluent op de verschillende posities.

Toxiciteitsonderzoek

Bioassays met bacteriën, algen en watervlooien zijn uitgevoerd op geconcentreerde monsters van de verschillende posities zodat een beeld wordt verkregen van de toxiciteit van het effluent en hoe dit door het moerassysteem wordt beïnvloed. Met dezelfde geconcentreerde watermonsters zijn ook zogenoemde *in-vitro* testen uitgevoerd, waarbij wordt vastgesteld of een monster de potentie heeft om specifieke toxische effecten te veroorzaken, zoals verstoring van de hormoonhuishouding.

Om de eventuele gevolgen van een verstoorde hormoonhuishouding bij vissen te kunnen koppelen aan de resultaten van de *in-vitro* assays, werden op elke positie driedoornige stekelbaarsjes (*Gasterosteus aculeatus*) uitgezet in tanks die doorspoeld werden met effluent uit het zuiveringsmoeras. De conditie en het voortplantingssucces van deze vissen en hun nakomelingen (de F1-generatie) werd gevolgd om effecten van de blootstelling te onderzoeken. Van de F1-generatie werd tevens de expressie van 15000 genen bepaald als mogelijke biomarkers voor de blootstelling aan de effluenten.

Microbiologisch

In de verschillende compartimenten van de zuiveringsmoerassen zijn de levensgemeenschappen van ongewervelden in kaart gebracht en is onderzocht of, en op welke wijze deze gecorreleerd zijn met de verwijdering van fecale bacteriën uit het effluent. Tenslotte zijn sedimentmonsters uit de moerassystemen in het laboratorium geïncubeerd om te onderzoeken of microbiële afbraak van hormoon verstorende stoffen hierin plaatsvindt en hoe deze eventueel kan worden bevorderd.

Leeswijzer

In rapport C005/12 met de titel “De invloed van moerassystemen op de milieukwaliteit van rwzi effluent en aanbevelingen tot optimalisering” zijn de opzet, de resultaten en de daaruit voortvloeiende aanbevelingen van het WIPE project samengevat. De individuele rapportages van de projectonderdelen zijn samengevoegd in twee bijlage rapporten zoals hieronder weergegeven:

Bijlage rapport A bevat de volgende deelrapportages:

1. Beoordeling zuiveringsrendement van zuiveringsmoerassen voor organische micro-verontreinigingen met behulp van passive sampling
2. In-vitro bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen
3. In-vivo bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen
4. Overleving en reproductie van driedoornige stekelbaarzen in rwzi-zuiveringsmoerassen
5. Rol van micro-organismen in rwzi-zuiveringsmoerassen bij de afbraak van estrogenen

Bijlage rapport B bevat de deelrapportages (in Engels met Nederlandse samenvattingen):

6. Stekelbaars transcriptomics in relatie tot de waterkwaliteit van de rwzi-zuiveringsmoerassen
7. Factoren gerelateerd aan de vermindering van pathogenen in de rwzi-zuiveringsmoerassen

1 Beoordeling zuiveringsrendement van zuiveringsmoerassen voor organische microverontreinigingen met behulp van passive sampling

Foppe Smedes Deltares
Henry Beeltje TNO
Erwin Roex Deltares



1.1 Samenvatting

1. Beschrijving van de metingen

In dit werkpakket zijn de concentraties aan organische microverontreinigingen in de 3 zuiveringsmoerassen geanalyseerd met behulp van passieve samplers en is bestudeerd in hoeverre organische microverontreinigingen tijdens het verblijf in een zuiveringsmoeras verminderen, in termen van concentratie en risico. Tevens wordt getracht de belangrijkste processen voor verwijdering van milieuvreemde stoffen in verschillende compartimenten van het zuiveringmoeras te identificeren.

Hiervoor zijn er 7 aansluitende bemonsteringsperiodes verricht in de 3 zuiveringsmoerassen, waarbij de concentratie van circa 230 verschillende stoffen is bepaald in het effluent van de waterzuivering, het water tussen de bezinkingsvijvers en de rietvelden en het water aan het einde van de rietvelden. Ook zijn eenmalig het influent en het oppervlaktewater bovenstreams van de 3 locaties bemonsterd. belangrijkste stofgroepen waren de brandvertragers, weekmakers, insecticiden, herbiciden, fungiciden, musken, personal care products en geneesmiddelen. Uit de chemische analyses is bepaald welke van deze stofgroepen het best worden verwijderd, en in welk compartiment.

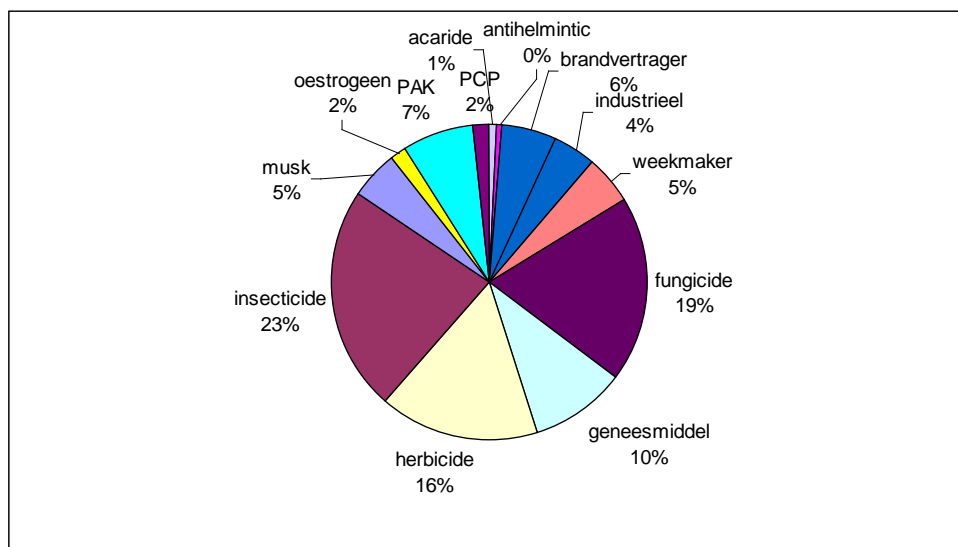
2. Belang van de metingen

Door de monitoring met behulp van passieve sampling is het mogelijk om gedurende langere tijd een tijdsgeïntegreerd beeld te verkrijgen van de vracht aan milieuvreemde stoffen, zonder dat er stoffen 'gemist' worden die in piekconcentraties worden geloosd. Tevens wordt door de langere bemonsteringstijd de detectielimiet van stoffen verlaagd, omdat de passieve sampler een groter volume aan water bemonsterd dan bij de klassiek bemonstering met steekmonsters.

Omdat de concentraties van de stoffen genormaliseerd zijn naar de norm van de betreffende stoffen, uitgedrukt in een risicoquotiënt (RQ), wordt een indruk verkregen van welke stoffen het grootste risico vormen in het zuiveringsmoeras.

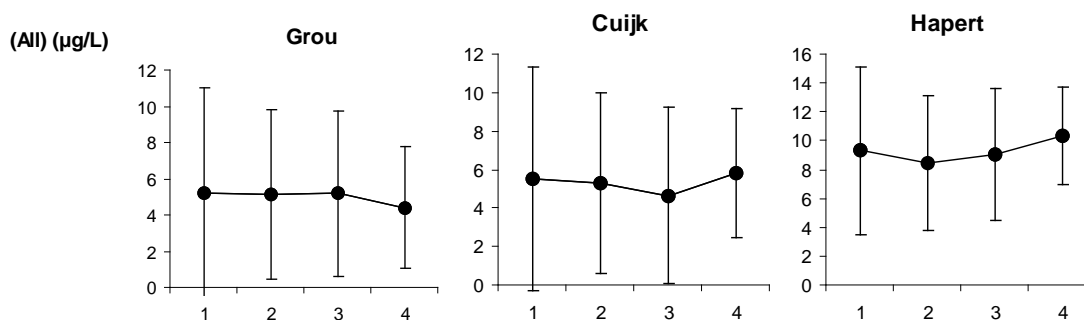
4. Draagt het zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

Uit de resultaten blijkt dat de meeste stoffen goed waren te analyseren op de passieve samplers. Voor 10% van de stoffen bleek de analyse met behulp van passieve samplers niet goed te werken. Hiervoor waren verschillende oorzaken aan te wijzen. Figuur 1-1 geeft een totaal overzicht van het aantal aangetroffen stoffen per stofgroep. De verhouding bleek per locatie nogal te verschillen, zo was in Hapert en Cuijk het aandeel aan pesticiden groter dan in Grou, waar de brandvertragers en musken meer prominent aanwezig zijn.



Figuur 1-1 Een overzicht van de verhouding in stofgroepen aanwezig op passieve samplers.

Figuur 1-2 geeft een overzicht van het verloop van het totaal aan concentraties aan stoffen door het moeras heen, uitgedrukt als gemiddelde concentratie van de 7 bemonsteringsrondes.



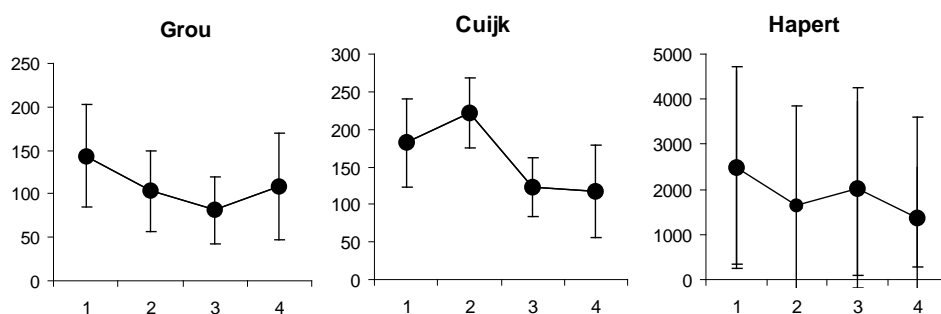
Figuur 1-2 Gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode van stoffen per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

Uit deze figuren zijn een aantal conclusies te trekken:

1. Wanneer de totale vracht aan concentraties in beschouwing wordt genomen, dan blijkt dat rwzi Hapert veruit de grootste vracht aan stoffen loost. Deze vracht is bijna 2 keer zo groot als bij rwzi Cuijk en Grou, die vergelijkbaar zijn.
2. Verder is te zien dat de drie zuiveringsmoerassen nauwelijks tot geen verwijdering van organische microverontreinigingen laten. Rwzi Grou laat een lichte verwijdering zien, terwijl de andere 2 locaties een lichte stijging laten zien. Een analyse van de verschillende stofgroepen laat zien dat deze verwijdering wordt veroorzaakt door de groep van musken en brandvertragers.
3. Ten derde valt op dat de spreiding in de resultaten relatief groot is. Hieruit blijkt dat de vracht aan stoffen in het effluent gedurende het jaar substantieel kan verschillen.

In Figuur 1-3 zijn de gemiddelde risicoquotiënten weergegeven voor alle 7 rondes, van alle drie de locaties, op alle vier de posities. Hieruit is duidelijk af te lezen dat de risicoquotiënten per locatie voor de afzonderlijke locaties sterk kunnen verschillen. Het risicoquotiënt van Hapert is ongeveer 15 keer zo hoog als van de andere 2 locaties. Hierbij moet opgemerkt worden dat de risico's voornamelijk door 2 stoffen veroorzaakt wordt, namelijk deltamethrin en pyreëne, stoffen met een enorm lage norm.

Verder blijkt, in tegenstelling tot de concentraties van stoffen, het risico van de stoffen wel van positie 1 naar positie 4 afnemen. Het verloop door het moeras heen verschilt wel per locatie. Zo draagt in Grou voornamelijk de bezinkvijver en het rietmoeras bij (afname 25%), terwijl het in Cuijk alleen het rietmoeras is (afname 35%), en in Hapert voornamelijk de bezinkvijver (afname 45%). Een nadere analyse per stofgroep laat zien dat deze daling voornamelijk veroorzaakt wordt door de groep van insecticiden.



Figuur 1-3 Gemiddelde risicoquotienten gedurende de bemonsteringsperiode van stoffen per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

In Tabel 1-1 is de top 10 van stoffen met het hoogste gemiddelde risicoquotiënt van de 3 locaties weergegeven. Hierbij moet opgemerkt worden dat niet alle van deze stoffen in iedere ronde zijn aangetroffen. Al deze stoffen hebben een RQ die groter is dan 1. Hieruit blijkt het aandeel van bestrijdingsmiddelen, en dan voornamelijk insecticiden in het totaal groot is, gedeeltelijk veroorzaakt door de relatief lage norm van deze groep van stoffen. Deze lijst bestaat voornamelijk uit middelen die hoofdzakelijk een biocide toepassingen of toepassingen in opslagplaatsen van agrarische produkten hebben. Een aanbeveling is om deze toepassingen, in het licht van dit onderzoek, kritisch nader te bekijken. Gedeeltelijk bestaat de lijst ook uit stoffen die alleen een agrarische toepassing hebben. Tenslotte komen er bij rwzi Grou 2 stoffen voor, die al enkel jaren geen toepassing meer hebben in Nederland.

Tabel 1-1 Top 10 van stoffen met het hoogste gemiddelde risicoquotiënt op de 3 locaties. Vetgedrukte stoffen staan in minimaal 2 van de 3 locaties in de top10 genoteerd.

Cuijk	Hapert	Grou
Pyreen	Deltamethrin	Pyreen
Deltamethrin	Beta-estradiol	Beta-estradiol
Metribuzin	Pyreen	Propoxur
Beta-estradiol	Metribuzin	Tetramethrin (Som)
Methomyl	Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)
Propoxur	Propoxur	Fluoranteen
Diflubenzuron	Methomyl	Pirimiphos-methyl
Fluoranteen	Dimethenamid	DEET
Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)	Aldicarb
DEET	Diclofenac	Lenacil

Bestrijdingsmiddelen hebben vanwege hun werking logischerwijs een lage norm, met als gevolg dat de norm van deze stoffen vaak onder de rapportagegrens ligt. Hierdoor zijn metingen van deze stoffen vaak niet toetsbaar, omdat de metingen niet bepalen of een concentratie boven of onder de grens ligt. In de top 10 van Tabel 1-1 behoren deltamethrin en pirimifos-methyl tot deze stoffen. Deze zijn met passieve sampling goed meet- en toetsbaar.

5. Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Omdat de conventionele rwzi al voor een verdergaande verwijdering van organische microverontreinigingen zorgt, en gezien het feit dat het aanvullende verwijderingsrendement in de drie zuiveringsmoerassen niet erg groot blijkt te zijn, is het niet aannemelijk om het ontwerp van zuiveringsmoerassen hierop aan te passen.

1.2 Materiaal en methoden

1.2.1 Aanleiding

Er is weinig bekend over de verwijdering van organische microverontreinigingen in zuiveringsmoerassen. In een studie bleek geen verdere verwijdering van hormoonverstorende stoffen in een zuiveringsmoeras plaats te vinden (van Mill et al., 2005). In een andere studie namen zowel de gehalten aan hormoonverstorende stoffen als de oestrogene activiteit toe na het doorlopen van het zuiveringsmoeras (STOWA, 2005). Metingen aan effluenten worden meestal gedaan op steekmonsters of debietproportionele monsters. Het nadeel van een steekmonster is dat het slecht een momentopname betreft, pieklozingen worden hierdoor gemist. Met behulp van passieve sampling kan langere tijd in situ bemonsterd worden, waardoor een beter beeld verkregen wordt van de vracht aan microverontreinigingen die zich door het zuiveringsmoeras beweegt. Ook debietproportionele monsters geven een geïntegreerd beeld van de verontreiniging, maar hierbij is geen sprake van een continue bemonstering zoals bij passieve sampling. Door deze continue

bemonstering wordt bij passieve sampling een lagere detectielimiet bereikt. Het principe van passieve sampling wordt in de volgende paragraaf verder uitgewerkt

De aanwezigheid van toxische stoffen in het effluent kan verschillende gevolgen hebben. Enerzijds is het mogelijk dat de activiteit van organismen in het zuiveringsmoeras (watervlooien, bacteriën en algen) wordt aangetast, waardoor het zuiveringsmoeras in zijn functioneren wordt belemmerd. Anderzijds kunnen milieurisico's ontstaan als de geconcentreerde biomassa in het zuiveringsmoeras wordt opgenomen in de natuurlijke voedselketen. Hierbij spelen voornamelijk de risico's van bioaccumulerende stoffen een rol. Dit onderzoek heeft als doel om het potentieel aan bioaccumulerende stoffen in effluenten op verschillende locaties in 3 verschillende zuiveringsmoerassen vast te stellen.

1.2.2 Passive sampling

De bioaccumulerende stoffen in effluenten zijn gemeten met behulp van siliconenrubber passieve samplers. De opname van deze passieve samplers en organismen wordt gedreven door dezelfde stoffeigenschappen. Resultaten van passieve sampling blijken dan ook sterk te correleren aan gehalten in mosselen (Smedes, 2007) maar ook met die in andere en zelfs hogere organismen (Smedes, 2010).

Net zoals bioaccumulatie tot gevolg heeft dat concentraties in organismen hoger worden dan die in het water waarin de organismen leven, geldt ook voor passieve samplers dat deze stoffen uit een grote hoeveelheid water kunnen concentreren. De sterke concentratie via passieve sampling maakt het mogelijk veel lagere concentraties in water te meten dan met klassieke methodes waarbij een steekmonster van het water wordt genomen. De hoeveelheid "liters water" die de passieve sampler maximaal kan concentreren hangt af van de sampler-water verdelingscoëfficiënt (K_{pw}). Hoe hydrofober een stof (hogere octanol-water verdelingscoëfficiënt, K_{ow} en vaak ook een hogere K_{pw}), hoe groter de capaciteit van de sampler om die stof te concentreren. De snelheid waarmee de stoffen worden opgenomen hangt voornamelijk af van het oppervlak van de sampler, de waterbeweging rond de sampler die de dikte van de waterige grenslaag bevordert, en de diffusiesnelheid in de sampler. Bij stilstaand water is de waterige grenslaag over het algemeen dik. Hierdoor is de opname traag en is er dus sprake van een lage opnamesnelheid. Bij meer waterbeweging rond de sampler zal de dikte van de grenslaag afnemen en zal de opnamesnelheid toenemen. Als de diffusiesnelheid in de sampler zelf laag is, zullen de opgenomen stoffen aan het oppervlak van de sampler ophopen en zal de opnamesnelheid worden afgeremd tot de snelheid waarmee de stoffen dieper de sampler in diffunderen.

Als opnamesnelheid wordt meestal de sampling rate gebruikt, uitgedrukt in liters die per dag worden geconcentreerd. Daarmee wordt ook duidelijk dat voor een stof waarvan de K_{pw} laag is, en de sampler dus weinig capaciteit heeft, al na relatief weinig liters water het maximum volume heeft bereikt en de concentratie in water en sampler met elkaar in evenwicht zijn. Voor de berekening van de concentratie in de waterfase is dan alleen de K_{pw} nodig. Opname van stoffen waarvan de capaciteit van de sampler heel erg groot is zal het vele malen langer duren tot evenwicht is bereikt, en zal de hele sampling periode lineair met de tijd opnemen. Een voordeel daarbij is dat de berekende concentratie een tijdsgemiddelde waarde voor de waterfase weergeeft. Een nadeel is dat de voor de berekening benodigde sampling rate per situatie verschilt en dus bepaald moet worden. Omdat de sampling rate voor afgifte en opname hetzelfde is kan de sampling rate goed worden bepaald door de afgifte te meten van stoffen die vooraf in minieme hoeveelheden op de sampler zijn gedoseerd, zogenaamde Performance Reference Compounds (PRC's).

Voor de verwerking van passieve sampling data tot concentraties in de waterfase zijn "state of the art" methoden beschikbaar. Echter nog niet voor alle stoffen zijn K_{pw} waarden beschikbaar en moet vaak gewerkt worden met een schatting op basis van de K_{ow} . Meer uitleg over het mechanisme en mogelijkheden van passieve sampling met siliconen rubber is te vinden in Smedes et al (2010).

Het resultaat van passieve sampling is dus een vrij opgeloste concentratie. Dat is een goede maat om het niveau weer te geven wat organismen ervaren en mogelijk zelfs een betere maat voor het risico dan

metingen in het organisme zelf omdat door metabolisatie deze stoffen daarin slechts in lage concentraties aanwezig zijn of zelfs afwezig kunnen zijn. Hierbij moet opgemerkt worden dat deze vergelijking voornamelijk voor lagere organismen geldt. Voor hogere organismen gaat actieve opname via voedsel een belangrijkere rol spelen. Passive sampling resultaten zijn niet geschikt om totaalvrachten te bepalen omdat van hydrofobe stoffen vaak voor het merendeel aan zwevend stof en opgelost organisch materiaal is gebonden en met passive sampling alleen de vrij opgeloste concentratie wordt gemeten. Ook zijn concentraties bepaald met passive sampling vaak niet bruikbaar voor toetsing aan KRW normen omdat de normen gelden voor totaal water. In die gevallen dat een concentratie van een stof bepaald met een passive sampler echter een normoverschrijding laat zien, is er dus sprake van een behoorlijk risico.

De passive samplers zijn steeds na een periode tussen 6 weken en drie maanden vervangen. Op deze manier werd een tijdsgéïntegreerd beeld verkregen van de blootstelling aan stoffen gedurende een bepaalde periode. Hierdoor kan eventuele seizoensinvloed onderzocht worden. In totaal zijn er 7 bemonsteringsrondes geweest. Om de resultaten uit de zuiveringsmoerassen in beter perspectief te plaatsen zijn van alle drie de rwzi's gedurende ronde 4 éénmalig ook het influent en het ontvangende oppervlaktewater bovenstrooms bemonsterd. In Tabel 1-2 zijn de start- en einddata van de verschillende rondes gegeven.

Tabel 1-2 Start en einddata van de verschillende passive sampling rondes.

Locatie	Ronde	Start datum	Einddatum
Grou	1	28 mei 2009	17 juli 2009
Grou	2	16 juli 2009	3 september 2009
Grou	3	3 september 2009	19 november 2009
Grou	4	11 december 2009	22 maart 2010
Grou	5	22 maart 2010	21 mei 2010
Grou	6	21 mei 2010	13 augustus 2010
Grou	7	3 september 2010	23 december 2010
Hapert en Cuijk	1	18 juni 2009	6 augustus 2009
Hapert en Cuijk	2	6 augustus 2009	24 september 2009
Hapert en Cuijk	3	24 september 2009	10 december 2009
Hapert en Cuijk	4	10 december 2009	24 maart 2010
Hapert en Cuijk	5	24 maart 2010	28 mei 2010
Hapert en Cuijk	6	28 mei 2010	16 augustus 2010
Hapert en Cuijk	7	16 augustus 2010	22 december 2010

De toegepaste passive sampling techniek is hieronder beknopt beschreven en meer uitgebreid in Bijlage C. Voor de bemonstering zijn passive samplers gebruikt bestaande uit 6 vellen siliconen rubber met een totaal opname oppervlak van 600 cm². In de vellen zijn 2 gaatjes geponst voor de bevestiging aan een samplerhouder. De vellen zijn 0.05 x 5.5 x 9.5 cm groot en gefabriceerd uit grotere vellen translucet Altesil siliconenrubber (www.altecweb.com). Een langdurige soxhlet extractie (7 dagen) met ethylacetaat zorgt ervoor dat storende stoffen uit de siliconen rubber zijn verwijderd. Omdat bij de blootstelling de opname snelheid van de samplers afhangt van de waterbeweging rond de sampler is het van belang de sampling rate (liters per dag opname) te kennen. Deze wordt bepaald uit de afgifte van een aantal milieuvreemde stoffen die in het laboratorium vooraf op de sampler zijn gedoseerd. Omdat het afgifte- en opnameproces elkaars spiegelbeeld zijn kan het opname proces daarmee worden geïkht. Op de monsterlocatie zijn de geprepareerde samplers in frames gemonteerd en in het water gehangen of, als de waterdiepte erg gering was, zijn de frames op de bodem geplaatst (zie Figuur 1-4).



Figuur 1-4 Passive sampler in rietmoeras, op bodem geplaatst (rechts), of in frame opgehangen (links)

Na de bemonstering zijn de samplers gereinigd met lokaal water en een schuurpad om eventuele begroeiing of andere aanslag te verwijderen. De schoongemaakte samplers worden in een amber diffusiedicht glazen potje naar het laboratorium getransporteerd en daar voorafgaande aan de analyse in de vriezer bewaard.

1.2.3 Extractie en analyse

Na de monsternamen worden de samplers in een Soxhlet geëxtraheerd. Waar beschikbaar zijn interne standaarden aan de sampler toegevoegd om de analyse te toetsen op verliezen en zo nodig daarvoor te corrigeren. Voor de eerste twee bemonsteringsrondes is de extractie uitgevoerd met methanol/acetonitril (1/2) in een hete Soxhlet op een waterbad (16 uur). Na de extractie is het extract ingedampt tot 2-5 mL. Daarna is voor elke mL methanol of acetonitril 10 mL hexaan toegevoegd en opnieuw ingedampt. Op deze wijze is de acetonitril of methanol op azeotropische wijze verwijderd. Dit extract is op een kolom met Florisil gebracht en geëluëerd met hexaan en 10% diethylether en het eluaat is ingedampt tot 1 mL.

Vanaf de derde bemonsteringsronde en verder is gebruik gemaakt van een Büchi Soxhlet met alleen acetonitril als extractiemiddel. Verder is na indampen van de acetonitril het extract gesplitst. Hierbij is een deel van het acetonitril extract bewaard voor analyse met LCMS methodes. Het andere deel van het extract is over een kolom met Florisil geëluëerd. De eluaten zijn daarna ingedampt tot 1 mL hexaan.

In de naar hexaan opgewerkte extracten zijn met behulp van verschillende analyses met GC-MS (gaschromatografie- massaspectrometrie) analyse concentraties van apolaire stoffen zoals PCBs, HCB, PAKs, BDEs, OCBs, musks, alkylfosfaten en een groot aantal pesticiden bepaald. Ook de restconcentraties van de stoffen, die vooraf aan de sampler waren gedoseerd, zijn in dit extract bepaald met GC-MS analyse. Als referentie zijn in dezelfde analysegang ook extracten geanalyseerd van samplers die niet waren blootgesteld om zo precies mogelijk de afgifte van de gedoseerde stoffen vast te stellen.

In het acetonitril extract zijn vanaf ronde 3 met LC-MS (liquid Chromografie-Massaspectrometrie) analyse voor verschillende stofgroepen analyses uitgevoerd. Dit betreft een aantal pesticiden, oestrogenen en geneesmiddelen. Het signaal van LCMS methodes wordt sterk beïnvloed door de matrix en de resultaten zijn minder betrouwbaar dan die afkomstig van GC-MS methodes. De geschatte onzekerheid voor de verschillende analysemethoden zijn meegenomen in de onzekerheidsanalyse in sectie 1.2.6.

1.2.4 Stofkeuze

Op de passieve samplers is een grote hoeveelheid aan verschillende organische stoffen geanalyseerd. Begonnen is in de eerste 2 bemonsteringsronden met de klassieke verontreinigingen zoals PCBs, OCBs en PAKs. Tevens zijn ook musken geanalyseerd en in de 3^e bemonsteringsronde zijn alkylfosfaten, pesticiden, personal care products (PCP's) en geneesmiddelen toegevoegd. De lijst is onder andere gebaseerd op een aantal recente studies naar de chemische samenstelling van effluënten (van Mill, 2005; STOWA, 2007; STOWA, 2009) en aangepast aan de analytische mogelijkheden binnen dit project. Om de grenzen van passieve sampling te onderzoeken zijn ook stoffen geanalyseerd die op basis van hun K_{ow} niet op de passieve sampler verwacht werden. Omdat de huidige passieve sampling methodes niet geschikt zijn voor anorganische stoffen (metalen), worden deze verder buiten beschouwing gehouden. De uiteindelijke lijst met stoffen is weergegeven in Bijlage C.

1.2.5 Van passieve sampling data naar vrij opgeloste concentraties

Uit de achtergebleven hoeveelheden PRCs op de sampler zijn de flow-factoren voor de correctie van lokale waterbeweging berekend. Hiervoor is het model van Rusina et al (2010a) gevolgd waarin de invloed van de diffusie coëfficiënt proportioneel wordt gesteld aan $M^{-0.47}$. De flowfactor (F), inclusief een maat voor de onzekerheid (cv_F), is bepaald uit non-lineaire regressie van de gemodelleerde waarden met de gemeten waarden met F als aanpasbare parameter (Booij en Smedes, 2010). Voor de uiteindelijke berekening van de vrij opgeloste concentratie in de waterfase zijn de verdelingscoëfficiënten betrokken van Smedes et al (2009) en Smedes en Beeltje (2010).

Als de K_{pw} waarden niet bekend waren zijn K_{ow} waarden gebruikt afkomstig uit het programma Episuite (<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>). Deze log K_{ow} waarden staan ook vermeld in bijlage C. Hierdoor wordt een bepaalde onzekerheid geïntroduceerd.

1.2.6 Onzekerheden

In de berekening van concentratie op de sampler naar waterconcentratie toe zitten een aantal stappen, met een aantal onzekerheden. Deze onzekerheden verschillen per analyse, per stof, maar ook per ronde en per locatie, veroorzaakt door verschillen in sampling rate. De onzekerheid in de berekende concentratie in de waterfase is geschat door de spreiding en onzekerheid van alle verschillende factoren te sommeren.

Voor de onzekerheid in de analyse is per methode en stof een relatieve spreiding geschat en een absolute dicht bij de detectiegrens.

Bij de berekening van de sampling rates wordt een standaardafwijking mee berekend.

Voor de gebruikt K_{pws} is een spreiding van 0.2 logeenheid aangehouden als deze experimenteel zijn bepaald. De voorspelling van een K_{pw} uit de K_{ow} is rekening gehouden met een variatie van 0.46 logeenheid (Smedes en Beeltje, 2010) wat overeenkomt met een factor ~3.

Een sommatie van als deze onzekerheden is gebruikt als de onzekerheid in de uiteindelijk vrij opgeloste concentratie. In Bijlage 0 is de schatting van de onzekerheid in meer detail beschreven.

1.2.7 Van vrij op geloste concentratie naar risico

Aangezien concentraties van stoffen uiteindelijk weinig zeggen over het risico van stoffen, zijn voor alle stoffen risicoquotiënten (RQ) uitgerekend. Hierbij wordt de concentratie van de stof (EC=Environmental Concentration) gerelateerd aan de betreffende norm voor deze stof (PNEC=Predicted No Effect Concentration). Dit wordt weergegeven in de volgende formule:

$$RQ = \frac{EC}{PNEC}$$

Wanneer het RQ groter is dan 1, betekent dit dan de concentratie groter is dan de norm, en er een onacceptabel risico optreedt voor de betreffende stof.

Voor de berekening van deze risicoquotiënten is zoveel mogelijk gebruik gemaakt van de officiële normen van de stoffen. Voor de prioritairere stoffen is gebruik gemaakt van de communautaire normen, zoals die in de dochterrichtlijn Prioritaire stoffen staan (EC, 2008). Voor de overige relevante stoffen zijn de normen afkomstig uit de Regeling Monitoring KRW (Staatscourant, 2009).

Voor de potentiële prioritairere stoffen zijn nog geen officiële normen beschikbaar, maar is gebruik gemaakt van de meest recente informatie afkomstig van de Europese Commissie (http://circa.europa.eu/Public/irc/env/wfd/library?l=/framework_directive/thematic_documents/priority_substances/supporting_substances).

Voor overige stoffen is informatie afkomstig van de normendatabase van de Waterdienst (http://apps.helpdeskwater.nl/normen_zoeksysteem/normen.php). Hierbij moet opgemerkt worden dat veel van de normen uit de database van de Waterdienst geen officiële normen, maar vaak ad hoc normen zijn. Deze ad hoc normen zijn over het algemeen met veel onzekerheid afgeleid, en kunnen daardoor relatief laag uitvallen vanwege het gebruik van hoge extrapolatiefactoren in de normafleiding.

Voor enkele stoffen waarvoor geen norm aanwezig is in de normendatabase is naar een norm of effectstudies gezocht in de literatuur. Dit geldt voornamelijk voor de groep van geneesmiddelen. De stoffen met bijbehorende normen en referenties zijn te vinden in appendix A.

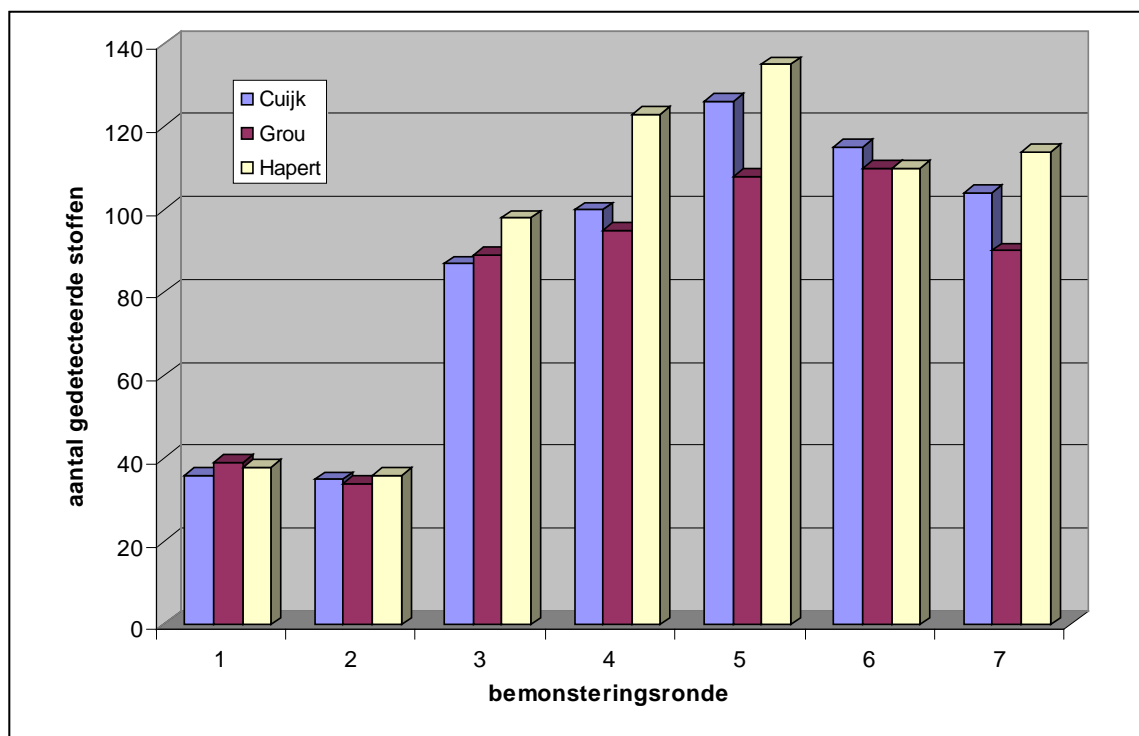
Om tot één risicofactor voor het effluent te komen zijn alle afzonderlijke risicoquotiënten gesommeerd tot een risicoquotiënt per effluent. Hierbij wordt uitgegaan van de Toxic Unit benadering, wat betekent dat er vanuit wordt gegaan dat de effecten van stoffen additioneel zijn. Hierbij wordt geen rekening gehouden met eventuele synergistische en /of antagonistische werking. Tevens wordt er hierbij van uitgegaan dat alle stoffen hetzelfde werkingsmechanisme hebben. In ons geval weten we zeker dat er een verscheidenheid aan werkingsmechanismen aanwezig is in het effluent wat door het zuiveringsmoeras stroomt. Het uiteindelijke risicoquotiënt voor het effluent geeft dan ook niet het werkelijke risico van het effluent weer, maar is hoogstwaarschijnlijk een overschatting van het risico van een mengsel. Wel maakt deze benadering het mogelijk om de passieve sampler resultaten op een uniforme wijze met elkaar te vergelijken, en duidelijke probleemstoffen met een hoge RQ te kunnen detecteren.

1.3 Resultaten

1.3.1 Stoffen en stofgroepen op de passieve samplers

In totaal zijn gedurende de gehele bemonsteringsperiode meer dan 230 verschillende organische componenten op de passieve samplers geïdentificeerd. Appendix A geeft een overzicht van de geanalyseerde stoffen op de passieve samplers. Niet alle componenten kwamen op alle locaties of posities voor, of gedurende iedere periode.

In Figuur 1-5 is te zien hoeveel stoffen per ronde op positie 1 van alle drie de locaties werden aangetroffen. Hierin is te zien dat in Hapert over het algemeen de meest stoffen zijn aangetroffen, met een maximum van 135 in ronde 5. Ook is te zien dat het aantal stoffen in de eerste rondes lager was dan latere rondes. Dit komt doordat in de eerste rondes de nadruk lag op stoffen waarmee veel ervaring was opgedaan met passieve sampling. Vanaf ronde 3 zijn hier meer relevante rwzi stoffen bijgekomen. In ronde 6 en 7 zijn ook weer een aantal stoffen afgevallen. Het betreft hierbij voornamelijk OCB's, omdat het gebruik van deze stoffen al lang verboden is, maar nog steeds diffuus in het milieu worden aangetroffen. De concentratie van deze stoffen wordt dus niet beïnvloed door emissies vanuit rwzi's.

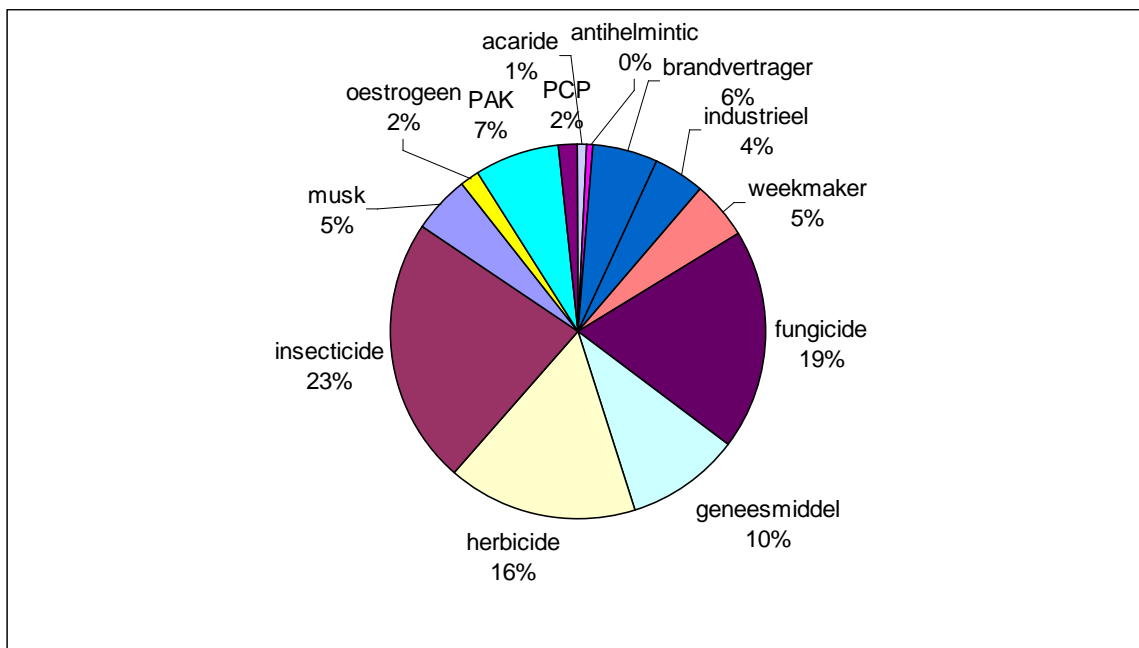


Figuur 1-5 Aantal geanalyseerde stoffen op de samplers.

Een analyse van de resultaten laat zien dat een klein aantal stoffen niet bestand is tegen de extractie van de passieve samplers via soxhlet-extractie. Door het verhogen van de temperatuur ontleden deze stoffen. De belangrijkste stof waarvoor dit het geval is, is 17 β -ethinyloestradiol, de belangrijkste component van de oestrogene activiteit in effluenten.

Figuur 1-6 geeft een overzicht van het totale aantal stoffen in de verschillende stofgroepen. Belangrijke groepen die geïdentificeerd konden worden zijn geneesmiddelen, herbiciden, fungiciden, insecticiden, musken, brandvertragers en ftalaten. Opvallend hierbij is het relatief grote aantal pesticiden dat gedetecteerd kon worden op de passieve samplers. Een aantal van deze stoffen wordt voornamelijk gebruikt op verhardingen en komt daardoor uiteindelijk in de rwzi terecht, een aantal van deze stoffen heeft echter uitsluitend toepassingen in de landbouw.

In totaal konden 20 van de 41 huidige KRW prioritaire stoffen en 7 van de 19 potentiële nieuwe prioritaire stoffen worden aangetoond in de passieve samplers. Daarnaast konden een groot aantal zogenaamde overige relevante stoffen worden aangetoond.

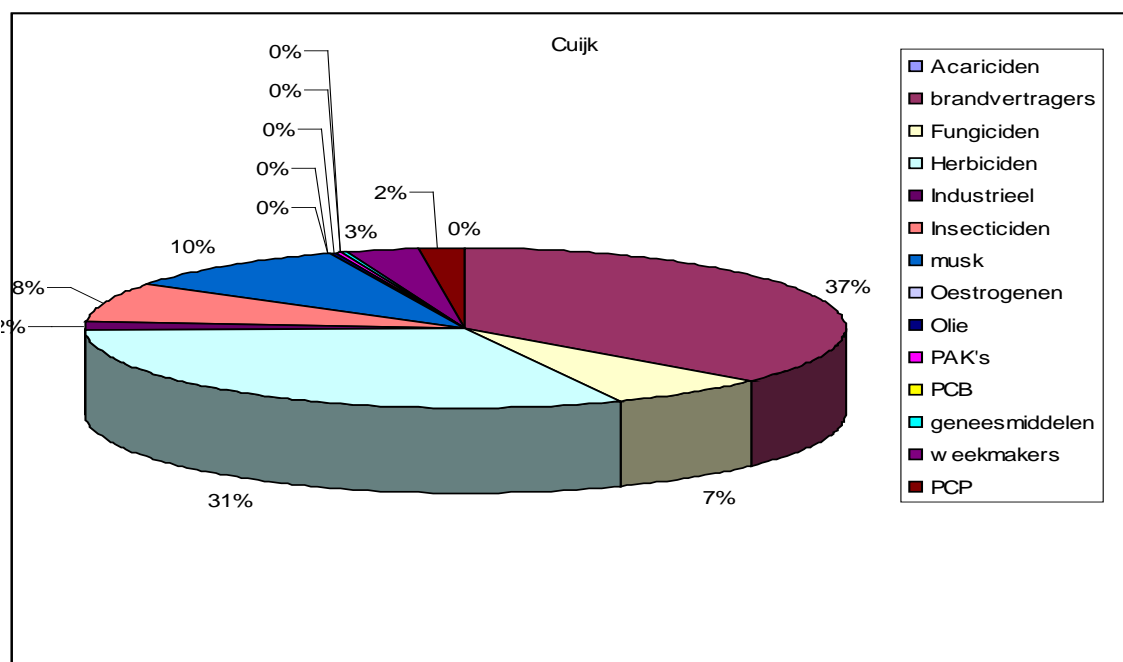


Figuur 1-6 Een overzicht van de verhouding in stofgroepen aanwezig op passieve samplers.

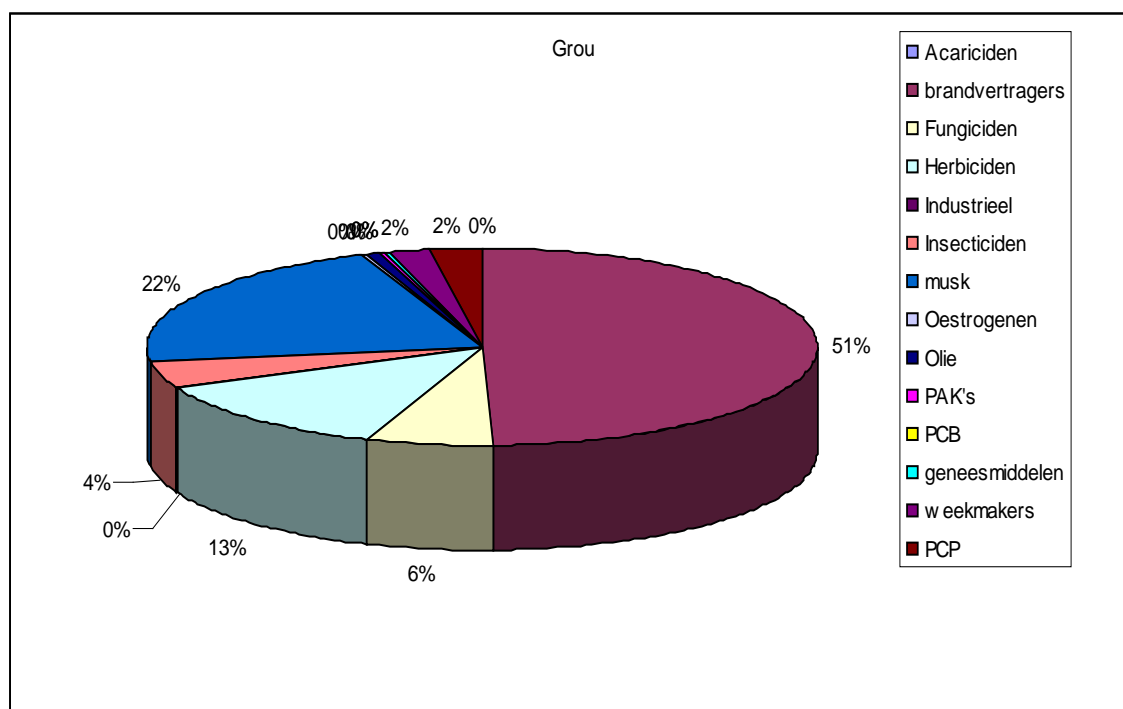
1.3.2 Concentraties van stoffen

Tijdens de omrekening van concentratie van stoffen op de passieve sampler naar waterconcentraties bleek voor een aantal stoffen dat deze omrekening met een grote onzekerheid gepaard gaat. Aanvullend onderzoek laat zien dat dit waarschijnlijk veroorzaakt wordt door afwijkend gedrag van deze stoffen op de passieve sampler. Het betreft een groep van geneesmiddelen, fungiciden en insecticiden, die bijna allen een azoolstructuur in hun molecuul hebben. Nader onderzoek hierna is vereist. Deze groep van stoffen is door de grote onzekerheid in berekening verder niet meegenomen in de verder analyses.

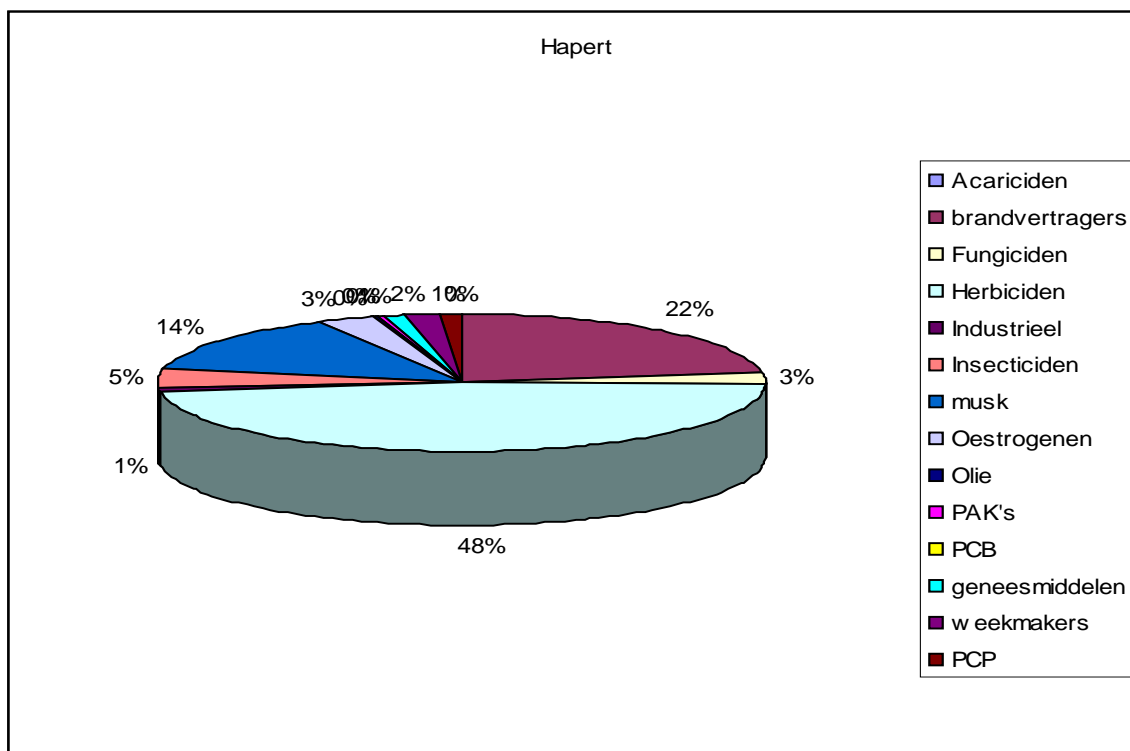
In Figuur 1-7 tot en met Figuur 1-9 zijn de gemiddelde concentraties van ronde 1 tot en met 7 van de verschillende groepen op positie 1 voor alle drie de locaties te zien. Hieruit is af te lezen dat de locaties qua samenstelling onderling nogal verschillen. Zo zijn het in land van Cuijk en Hapert duidelijk de groepen van de herbiciden en brandvertragers die het grootste deel van de vracht bepalen. Voor de herbiciden wordt dit voornamelijk veroorzaakt door de stoffen metribuzin en in minder mate lenacil, voor de brandvertragers door tris(1-chloor-2-propyl)fosfaat (TCPP). Wanneer het emissiepatroon van metribuzin nader wordt bekeken, blijkt dat de hoge gemiddelde concentratie voornamelijk wordt veroorzaakt door een piek in de passieve sampler van mei 2010. Dit tijdstip valt samen met de toepassingsmomenten van deze stof in de aardappelteelt. In het gebied rondom Hapert wordt relatief veel aardappel verbouwd (persoonlijk mededeling Waterschap de Dommel), wat de piekconcentratie kan veroorzaken. In Grou zijn het naast de brandvertragers (TCPP) ook de musken die prominent aanwezig zijn.



Figuur 1-7 Verhouding van gemiddelde concentraties van stoffen op positie 1 op locatie Cuijk.



Figuur 1-8 Verhouding van gemiddelde concentraties van stoffen op positie 1 op locatie Grou.

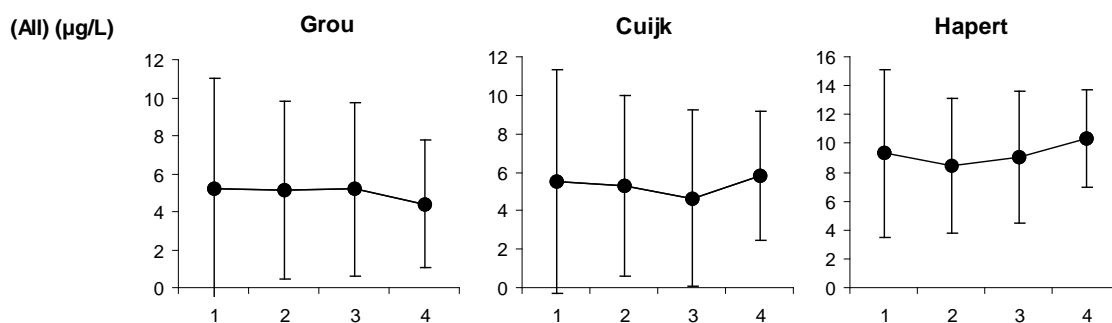


Figuur 1-9 Verhouding van gemiddelde concentraties van stoffen op positie 1 op locatie Hapert.

1.3.3 Concentratieverloop van stoffen in zuiveringsmoeras

In Figuur 1-10 is het verloop van de gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode weergegeven. Dit is weergegeven voor *alle* aangetroffen stoffen op de 4 posities van de 3 locaties. Uit deze figuren zijn een aantal conclusies te trekken:

Wanneer de totale vracht aan concentraties in beschouwing wordt genomen, dan blijkt dat rwzi Hapert veruit de grootste vracht aan stoffen loost. Deze vracht is bijna 2 keer zo groot als bij rwzi Cuijk en Grou, die vergelijkbaar zijn.

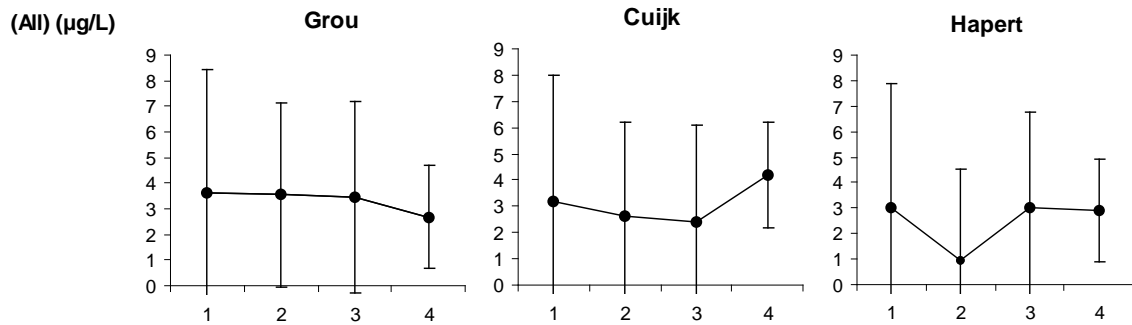


Figuur 1-10 Gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode van stoffen per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

Verder laat Figuur 1-10 zien dat in de drie zuiveringsmoerassen nauwelijks tot geen verwijdering van organische microverontreinigingen plaatsvindt. Rwzi Grou laat een lichte verwijdering zien, terwijl de andere 2 locaties een lichte stijging laten zien.

Ten derde valt op dat de spreiding in de resultaten relatief groot is. Hieruit blijkt dat de vracht aan stoffen in het effluent gedurende het jaar substantieel kan verschillen.

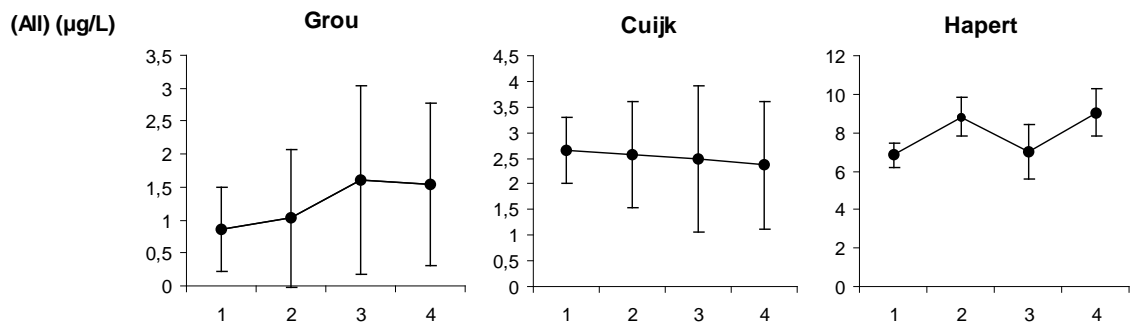
Omdat het totaal beeld van de vracht aan stoffen een te globaal beeld geeft, waarin waarschijnlijk veel informatie verloren gaat, is in Figuur 1-11 tot en met Figuur 1-15 voor de belangrijkste groepen van stoffen (brandvertragers, herbiciden, insecticiden, oestrogenen en musken) het verloop door de zuiveringsmoerassen heen weergegeven. De dikte van de punten in de grafiek geeft aan hoe vaak een bepaalde groep is meegenomen in de verschillende rondes.



Figuur 1-11 Gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van brandvertragers per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

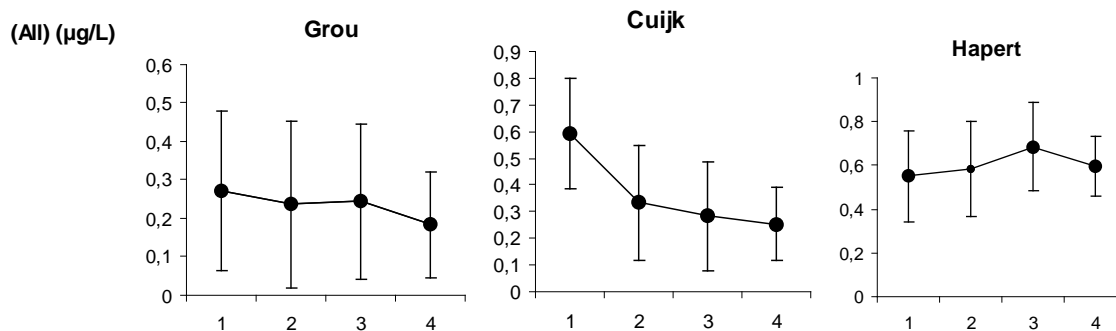
Uit Figuur 1-11 blijkt dat de *brandvertragers* voor een groot gedeelte het algemene beeld bepalen van de totale vracht; Figuur 1-11 ziet er vergelijkbaar uit als Figuur 1-10, behalve voor rwzi Hapert.

Bij locatie Hapert spelen de *herbiciden* een belangrijke rol (Figuur 1-12). Opvallend is relatief lage spreiding van deze groep van stoffen in Hapert, waarschijnlijk veroorzaakt door seizoensinvloed. Bij de andere 2 locaties is deze lage spreiding in mindere mate terug te vinden. Bij rwzi Grou is voor deze groep van stoffen een stijging van de concentratie te vinden.



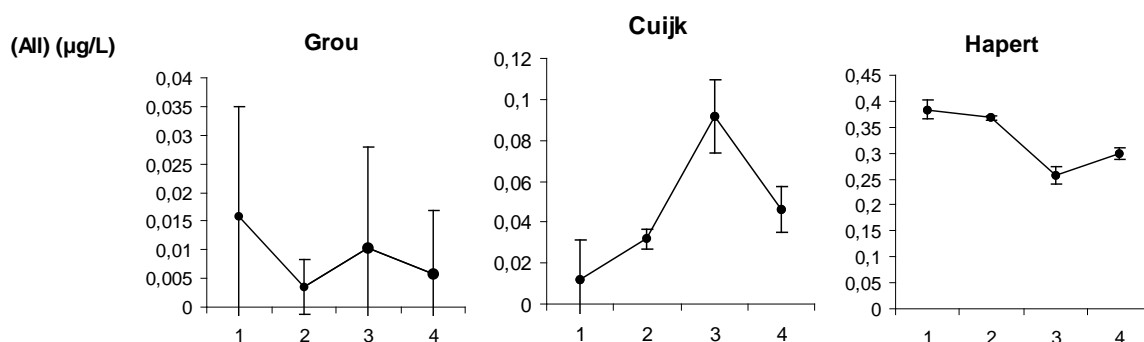
Figuur 1-12 Gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van herbiciden per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

De groep van *insecticiden* laat zowel bij rwzi Grou als rwzi Cuijk een daling in concentraties zien (Figuur 1-13, niet significant). Deze daling is bij rwzi Hapert niet terug te vinden



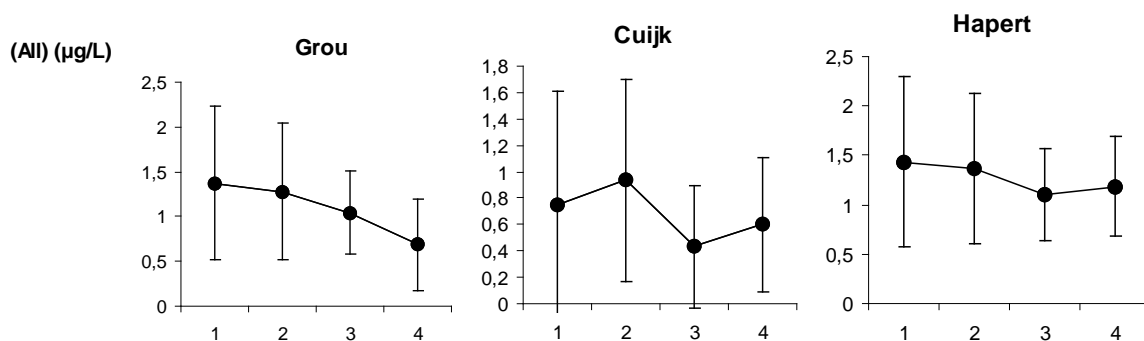
Figuur 1-13 Gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van insecticiden per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

De groep van oestrogenen laat een zeer wisselend beeld zien op de 3 locaties, zie Figuur 1-14. Bij rwzi Grou is de spreiding relatief groot in verhouding tot de andere 2 locaties. Rwzi Cuijk laat een stijging zien in concentraties zien, die al eerder in dit zuiveringsmoeras zijn gevonden (STOWA, 2004). In Hapert zijn de concentraties op positie 1 hoger dan bij de andere 2 locaties, en deze nemen ook af naar positie 4 af.



Figuur 1-14 Gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van oestrogenen per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

De groep van musken is de enige groep van stoffen die op alle drie de locaties een daling in concentraties laat zien van positie 1 naar positie 4 (Figuur 1-15), hoewel het verloop en de spreiding tussen de locaties enigszins verschilt.

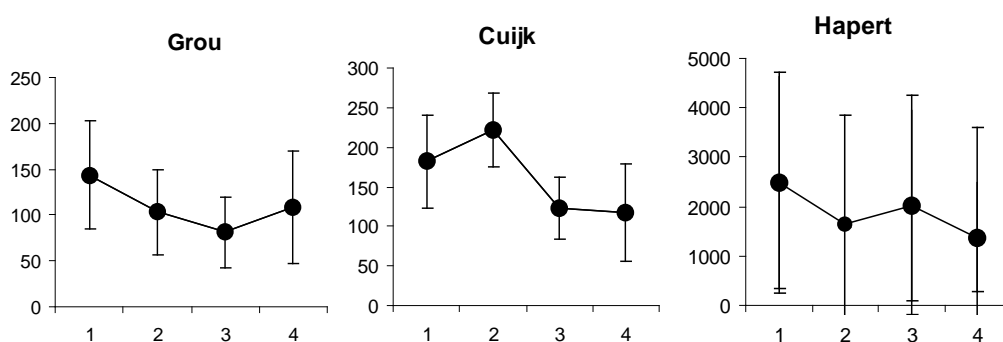


Figuur 1-15 Gemiddelde vracht gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van musken per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

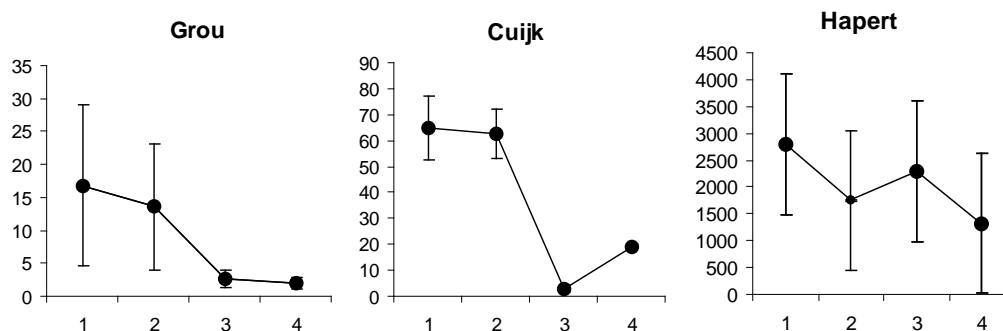
1.3.4 Van stof naar risico

In figuur 1-16 zijn de gemiddelde risicoquotiënten weergegeven voor alle 7 rondes, van alle drie de locaties, op alle vier de posities. Hieruit is duidelijk af te lezen dat de risicoquotiënten per locatie voor de afzonderlijke locaties sterk kunnen verschillen. Het risicoquotiënt van Hapert is ongeveer 15 keer zo hoog als van de andere 2 locaties. Hierbij moet opgemerkt worden dat de risico's voornamelijk door 2 stoffen veroorzaakt wordt, namelijk deltamethrin en pyreëne, stoffen met een enorm lage norm. Dit is duidelijk te zien in Figuur 1-17 en Figuur 1-18, die samen het overgrote deel van de risico's van Figuur 1-16 uitmaken.

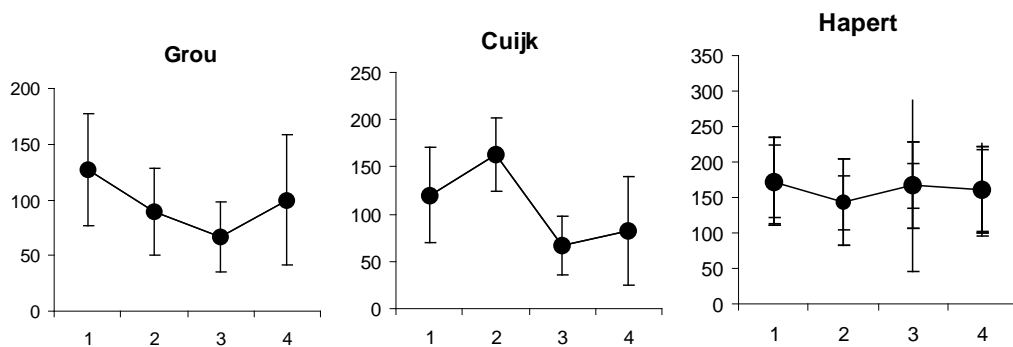
Verder blijkt, in tegenstelling tot de concentraties van stoffen, het risico van de stoffen wel van positie 1 naar positie 4 afnemen. Het verloop door het moeras heen verschilt wel per locatie. Zo draagt in Grou voornamelijk de bezinkvijver en het rietmoeras bij (afname 25%), terwijl het in Cuijk alleen het rietmoeras is (afname 35%), en in Hapert voornamelijk de bezinkvijver (afname 45%).



Figuur 1-16 Gemiddelde risicoquotienten gedurende de bemonsteringsperiode van stoffen per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

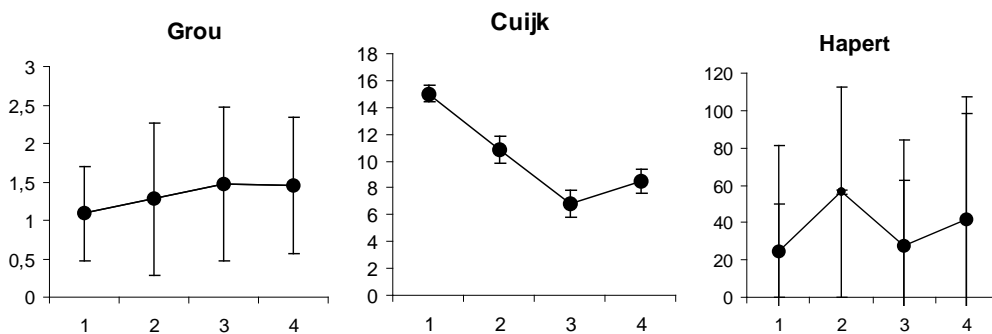


Figuur 1-17 Gemiddelde risicoquotienten gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van insecticiden per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

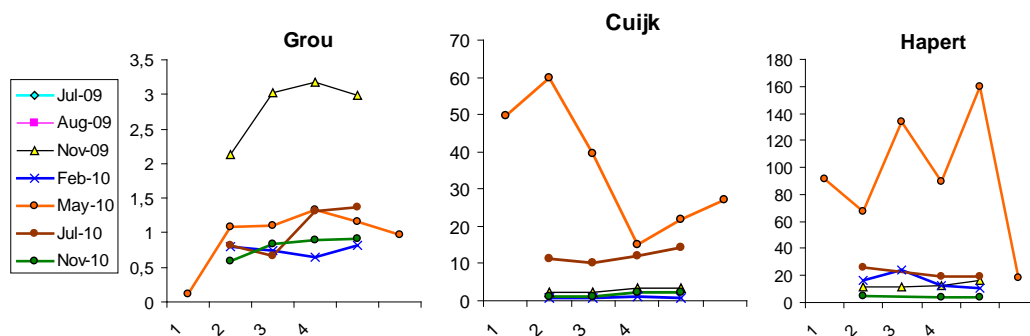


Figuur 1-18 Gemiddelde risicoquotienten gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van PAK's per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

In Figuur 1-18 zijn de gemiddelde risicoquotienten voor de groep van herbiciden weergegeven. Voor deze groep is te zien dat het risico per locatie duidelijk verschilt (zie verschillen in y-as). In Figuur 1-19 is te zien dat dit wordt veroorzaakt door een hogere concentratieprofiel in ronde 5 (mei 2010) en in minder mate in ronde 6 (juli 2010) op rwzi Hapert en Cuijk. Hoogstwaarschijnlijk is dit veroorzaakt door de toepassing van deze groep van stoffen in het groeiseizoen. Duidelijk is dat de agrarische invloed op rwzi Grou een stuk minder is. Dit geldt ook voor de groep van herbiciden en insecticiden (niet getoond).



Figuur 1-19 Gemiddelde risicoquotienten gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van herbiciden per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.



Figuur 1-20 Risicoquotienten gedurende de bemonsteringsperiode van de groep van herbiciden per locatie per positie, inclusief standaarddeviaties.

In Tabel 1-3 is de top 10 van stoffen met het hoogste gemiddelde risicoquotient van de 3 locaties weergegeven. Hierbij moet opgemerkt worden dat niet alle van deze stoffen in iedere ronde zijn aangetroffen. Al deze stoffen hebben een RQ die groter is dan 1. Hieruit blijkt het aandeel van bestrijdingsmiddelen, en dan voornamelijk insecticiden in het totaal groot is, gedeeltelijk veroorzaakt door

de relatief lage norm van deze groep van stoffen. Deze lijst bestaat voornamelijk uit middelen die hoofdzakelijk een biocide toepassingen of toepassingen in opslagplaatsen van agrarische producten hebben (permethrin, tetramethrin, propoxur, deltamethrin, methomyl, diflubenzuron, pirimifos-methyl). Het voorkomen van deze stoffen is te verklaren door afspoeling van regenwater op verhardingen. Gedeeltelijk bestaat de lijst ook uit stoffen die alleen een agrarische toepassing hebben, zoals metribuzin en dimethamid. Het voorkomen van deze stoffen in het effluent van een rwzi is moeilijker te verklaren. Tenslotte komen er bij rwzi Grou 2 stoffen voor, aldicarb en lenacil, die al enkel jaren geen toepassing meer hebben in Nederland (www.ctgb.nl).

De middelen DEET en diclofenac hebben een humane toepassing, β -oestradiol is de belangrijkste oestrogeen actieve stof van humane oorsprong.

Tabel 1-3 Top 10 van stoffen met het hoogste gemiddelde risicoquotiënt op de 3 locaties. Vetgedrukte stoffen staan in minimaal 2 van de 3 locaties in de top10 genoteerd.

Cuijk	Hapert	Grou
Pyreen	Deltamethrin	Pyreen
Deltamethrin	Beta-estradiol	Beta-estradiol
Metribuzin	Pyreen	Propoxur
Beta-estradiol	Metribuzin	Tetramethrin (Som)
Methomyl	Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)
Propoxur	Propoxur	Fluoranteen
Diflubenzuron	Methomyl	Pirimiphos-methyl
Fluoranteen	Dimethenamid	DEET
Pirimiphos-Methyl	Permethrin (Som)	Aldicarb
DEET	Diclofenac	Lenacil

Bestrijdingsmiddelen hebben vanwege hun werking logischerwijs een lage norm, met als gevolg dat de norm van deze stoffen vaak onder de rapportagegrens ligt. Hierdoor zijn metingen van deze stoffen vaak niet toetsbaar, omdat de metingen niet bepalen of een concentratie boven of onder de grens ligt. In de top 10 van Tabel 1-3 behoren deltamethrin en pirimifos-methyl tot deze stoffen. Deze zijn met passieve sampling goed meet- en toetsbaar.

1.4 Discussie en conclusies

In dit project is voor het eerst een grote verscheidenheid aan stoffen op de passieve samplers gemeten. De analyse van de passieve samplers laat zien dat voor een groot aantal van deze stoffen de methodiek van passieve sampling werkt. Voor een aantal stoffen is de methodiek van passieve sampling op dit moment nog niet werkbaar. In totaal betrof dit 10% van de geanalyseerde stoffen. Soms is de opwerkingsprocedure nog niet optimaal, zoals bij 17β -ethinyloestradiol, soms gedragen de stoffen zich anders ten opzichte van de passieve sampler als verwacht op basis van hun fysisch/chemische eigenschappen. In de nabije toekomst zullen dergelijke problemen binnen een aantal verschillende projecten

De passieve sampling methodiek biedt enkele duidelijke voordelen ten opzichte van de klassieke bemonsteringstechniek van metingen aan steekmonsters.

Ten eerste zullen door de langere bemonsteringstijd minder stoffen "gemist" worden, zoals stoffen die in een piek voorbij komen. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat de stoffen een zekere affiniteit voor de passieve sampler moeten hebben; zeer polaire stoffen zullen door de in dit onderzoek gebruikte passieve samplers niet opgenomen worden.

Ten tweede wordt door de lange bemonsteringstijd meer water bemonsterd, waardoor in feite de detectiegrens van stoffen verhoogd wordt, omdat de waterconcentraties zich concentreren op de passieve sampler, afhankelijk van de fysisch/chemische eigenschappen van de stof. Dit maakt het mogelijk om

stoffen, die bij klassiek bemonstering vaak niet toetsbaar bleken te zijn zoals deltamethrin en pirimofos-methyl), nu wel aan de norm getoetst kunnen worden.

Door de continue bemonstering gedurende langere tijd is een goed beeld verkregen van de vervuilingsgraad van de van de 3 zuiveringsmoerassen en het concentratieverloop van de stoffen door de moerassen heen. Wat hierbij opvalt, is dat de concentraties van stoffen tussen de bemonsteringsrondes substantieel kunnen verschillen. Gedeeltelijk is dit te wijten aan seizoensinvloeden van stofgroepen zoals de pesticiden (zie figuur 1-16), ten dele ligt dit gewoon aan de wisselende belasting van het influent van de rwzi.

Verder valt op dat het verwijderingsrendement in de zuiveringsmoerassen over het algemeen niet erg groot is. Wanneer puur gekeken wordt naar stofconcentraties, dan laat alleen de groep van musken in alle drie de zuiveringmoerassen een lichte daling zien. Waarschijnlijk is het verwijderingsrendement van de conventionele rwzi al zo hoog, waardoor het zuiveringsmoeras hier niet meer veel aan kan bijdragen. Helaas bleek het influent zo vervuild met lipofiele verbindingen, die zich afgezet hadden op de passieve samplers, dat de analyses van de influenten in ronde 5 niet betrouwbaar bleken te zijn. De totale input aan organische microverontreinigingen mag dan wel substantieel zijn (5-10 µg/L op positie 1), deze bestaat uit een verscheidenheid aan verschillende stoffen dat een verscheidenheid aan aangrijpingspunten voor micro-organismen vereist.

De totale risico's van de input op de zuiveringsmoerassen laat wel een daling zien op alle drie de locaties. Een nadere analyse per stofgroep laat zien dat deze daling voornamelijk veroorzaakt wordt door de groep van insecticiden. Deze groep van stoffen heeft een relatief grote invloed op het risicoquotiënt, vanwege hun lage norm. Dit blijkt ook uit de verschillende top 10 lijsten van stoffen met het hoogste risico, die voornamelijk bestaat uit insecticiden. Aangezien deze stoffen een RQ groter dan 1 hebben is er een risico voor deze stoffen in het zuiveringsmoeras te verwachten. Omdat deze stoffen aangetroffen worden op de passieve samplers, hebben zij de potentie om te accumuleren in organismen in het zuiveringsmoeras. Een groot gedeelte van deze insecticiden hebben toepassingen, waarvan het gebruik moeilijk te reguleren is, zoals het huishoudelijke gebruik van consumenten. Een aanbeveling is om deze toepassingen, in het licht van dit onderzoek, kritisch nader te bekijken.

Tenslotte, omdat de conventionele rwzi al voor een verdergaande verwijdering van organische microverontreinigingen heeft gezorgd, en gezien het feit dat het aanvullende verwijderingsrendement in de drie zuiveringsmoerassen niet erg groot blijkt te zijn, is het niet aannemelijk om het ontwerp van zuiveringsmoerassen hierop aan te passen.

1.5 Referenties

- Booij, K., Sleiderink, H.M., Smedes, F., 1998. Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices using exposure standards. *Environ Toxicol Chem*, vol. 17, pp 1236-1245.
- Booij, K., Smedes, F., van Weerlee, E.M., 2002. Spiking of performance reference compounds in low density polyethylene and silicone passive water samplers. *Chemosphere*, vol. 46, pp 1157-1161.
- Booij, K., Hofmans, H.E., Fischer, C.V., van Weerlee, E.M., 2003. Temperature-dependent uptake rates of non-polar organic compounds by semipermeable membrane devices and low-density polyethylene membranes. *Environ Sci Technol*, vol. 37, pp 361-366.
- Booij, K., van Bommel, R., Mets, A., Dekker, R., 2006. Little effect of excessive biofouling on the uptake of organic contaminants by semipermeable membrane devices. *Chemosphere*, vol. 65, pp 2485-2492.
- Booij, K., Smedes, F., 2010. An Improved Method for Estimating in Situ Sampling Rates of Nonpolar Passive Samplers. *Environ Sci Technol*, vol. 44, pp 6789-6794.
- Capdevielle, M., van Egmond, M., Whelan, D., Versteeg, M., Hofman-Kamensky, J., Inauen, V., Cunnigham, D., Woltering (2008) Consideration of exposure and Species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. *Integr Environ Assess Manag*, vol. 4, pp. 15-23.
- Carlsson, C., A-K, G. Alvan, K. Bergman, T. Kühler (2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part 1: environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci Total Environ*, vol. 363, pp. 67-87.
- EU (2008) European Union Risk Assessment Report on tris(2-chloro-1-methylethyl) phosphate (TCPP).
- Ferrari, B., R. Mons, B. Bollat, B. Fraysse, N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio, J. Garric (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem*, vol. 23, pp. 13144-1354.
- Grung, M., T. Källqvist, S. Sakshaug, S. Skurtveit, K.V. Thomas (2008) Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 71, pp. 328-340.
- Hernando, M.D., M. Mezcua, A.R. Fernandez-Alba, D. Barcelo (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, vol. 69, pp. 334-342.
- Hernando, M.D, A. Aguera, A.R. Fernandez-Alba (2007) LC-MS analysis and environmental risk of lipid regulators. *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, pp. 1269-1285.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Booij, K., 2006. *Monitors of organic chemicals in the environment: semipermeable membrane devices*. Springer, New York.
- Kümmerer, K. (ed.) (2004) *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, fate, effects and risks*, 2e editie.
- Reichenberg, F., Mayer, P., 2006. Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environ Toxicol Chem*, vol. 25, pp 1239-1245.
- Rusina, T.P., Smedes, F., Klanova, J., Booij, K., Holoubek, I., 2007. Polymer selection for passive sampling: A comparison of critical properties. *Chemosphere*, vol. 68, pp 1344-1351.
- Rusina, T.P., Smedes, F., Klanova, J., 2010a. Diffusion coefficients of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in polydimethylsiloxane and low-density polyethylene polymers. *Journal of Applied Polymere Science*, vol. 116, pp 1803-1810.
- Rusina, T.P., Smedes, F., Koblizkova, M., Klanova, J., 2010b. Calibration of Silicone Rubber Passive Samplers: Experimental and Modeled Relations between Sampling Rate and Compound Properties. *Environ Sci Technol*, vol. 44, pp 362-367.

- Smedes, F., 2007b. Monitoring of chlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons by passive sampling in concert with deployed mussels. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol 48 : Passive sampling techniques in environmental monitoring. Ed. Greenwood R., Mills, G., Vrana, B., pp 407-448.
- Smedes, F., Geertsma, R.W., Zande, T.v.d., Booij, K., 2009;. Polymer-Water Partition Coefficients of Hydrophobic Compounds for Passive Sampling: Application of Cosolvent Models for Validation. *Environ Sci Technol*, vol. 43, pp 7047-7054.
- Smedes F., 2010. Passive sampling en biomonitoring. Deltares report 1202337-004.
- Smedes, F., Beeltje, H., 2010. Silicone rubber-water partition coefficients for passive sampling. Deltares report 1201893-000.
- Smedes, F.; D.J. Bakker, J.P.A. de Weert 2010 Het gebruik van passive sampling in KRW-monitoring. De mogelijkheden van siliconenrubber als passieve sampler. Deltares rapport 1202337-004-BGS-0027
- STOWA, 2004. Praktijkonderzoek moerassysteem RWZI Land van Cuijk. STOWA rapport 2004-45.
- STOWA, 2005. Verkennende monitoring van hormoonverstorende stoffen en pathogenen op RWZI's met aanvullende zuiveringstechnieken. STOWA rapport 2005-32.
- STOWA, 2007. Effluentbehandeling op de Rwwz Maasbommel. STOWA rapport 2007-17.
- STOWA, 2009. Pilotonderzoek RWZI Horstermeer: 1-step filter als effluentpolishingstechniek. STOWA rapport 2009-34.
- Ter Laak, T.L., Busser, F.J.M., Hermens, J.L.M., 2008. Poly(dimethylsiloxane) as passive sampler material for hydrophobic chemicals: Effect of chemical properties and sampler characteristics on partitioning and equilibration times. *Anal Chem*, vol. 80, pp 3859-3866.
- Van Mil, G.M.J., B.M. Verhoeven, G.B.J. Rijs (2005) Monitoring geneesmiddelen en oestrogenen 2005. RIZA/Waterschap Aa en Maas rapport.
- Van Leeuwen, L.C. , P.L.A. van Vlaardingen (2010) Tebucanozool, afleiding van MTRwater en MACeco, water. SEC adviesrapport 12194A02
- Van Wezel, A.P., P. van Vlaardingen, R. Posthumus, G.H. Crommentuijn, D.T.H.M. Sijm (2000) Environmental Risk Limits for Two Phthalates, with Special Emphasis on Endocrine Disruptive Properties. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 46, pp 305-321.
- Verbruggen, E.M.J., J.P. Rila, T.P. Traas, C.J.A.M. Posthuma-Doodeman and R. Posthumus (2005) Environmental Risk Limits for several phosphate esters, with possible application as flame retardant. RIVM report 601501024.

1.6 Bijlagen

A. Berekeningsmethode passieve sampling

Inleiding

Een passieve sampler bestaat uit een materiaal (bv. siliconenrubber of polyethyleen), dat voor een bepaalde tijd aan water wordt blootgesteld. Een passieve sampler heeft, net als sediment of biota, een veel grotere opnamecapaciteit voor Persistent Organic Pollutants (POPs) dan water en zal POPs opnemen uit het milieu tot dezelfde chemische activiteit is bereikt als in de andere compartimenten. De opname door een passieve sampler vindt voornamelijk plaats door diffusie van vrij opgeloste moleculen naar de sampler, en zowel de opnamesnelheid als de evenwichtsconcentratie zijn proportioneel aan de vrij opgeloste concentratie. Calibratie van het passieve sampling proces maakt het mogelijk de vrij opgeloste concentratie te bepalen op een wijze die lijkt op hoe organismen de verontreiniging "ervaren".

Opname van Passive samplers

Apolaire, of hydrofobe stoffen die slecht oplossen in water adsorberen vaak sterk aan sediment en worden ook goed opgenomen door organismen. Het materiaal voor een passieve sampler is zo gekozen dat die deze stoffen ook goed opneemt. Hiervoor wordt veelal polymeer materiaal gebruikt zoals low density polyethyleen (LDPE) of zoals in dit project siliconen rubber (SR).. Als een sampler evenwicht heeft bereikt met het milieu waarin hij is geplaatst geldt:

$$C_w = K_{pw} C_p \quad (A1)$$

Waarbij C_w (ng/L) de vrij opgeloste concentratie in de waterfase is, C_p (ng/Kg) de concentratie in de sampler, en K_{pw} (L/Kg) de verdelingscoëfficiënt. Deze coëfficiënten moeten voor elke stof in het laboratorium worden bepaald.

De naam "passive sampler" zegt al dat de opname passieve is, dit in tegenstelling tot een organisme waarvoor ook actieve processen bijdragen aan de opname. De opname van een passieve sampler is vaak erg traag omdat de opnamesnelheid voornamelijk door diffusie is bepaald. Uitgehangen in water bevindt zich aan het oppervlak van de sampler een grenslaag van stilstaand water waar de stoffen doorheen moeten diffunderen. De consequentie is dat vaak geen evenwicht wordt bereikt tijdens de blootstelling. Dit heeft voor en nadelen. Een voordeel is dat de sampler op die wijze de concentratie in de waterfase over en bemonsteringsperiode kan integreren tot een tijdsgemiddelde maar een nadeel is dat dus dan de opname snelheid bekend moet zijn om de opname tot een concentratie in de waterfase te herleiden. Dat is allemaal goed onderzocht maar desalniettemin toch redelijk gecompliceerd. De opname van een passieve sampler door diffusie door de grenslaag volgt een 1^e orde vergelijking en de opgenomen hoeveelheid (N^t) van een stof na blootstelling van een periode t (d) kan dan worden weergegeven door:

$$N^t = N^\infty (1 - e^{-k_e t}) \quad (A2)$$

Hierin is N^∞ de opgenomen hoeveelheid als evenwicht zou zijn bereikt en k_e (d^{-1}) de eerste orde snelheids constante voor de afgifte. Deze k_e is gerelateerd aan de sampling rate R_s ($L d^{-1}$) volgens:

$$k_e = \frac{R_s}{K_{pw} m} \quad (A3)$$

In de noemer is m de massa van de sampler (kg) waardoor de noemer de capaciteit van de sampler vertegenwoordigt als virtuele liters water. Evenzo is de opname een extractie van virtuele liters water. De

sampling rate hangt af van het oppervlak en de geometrie van de sampler, en de waterbeweging rond de sampler. De waterbeweging laatste bepaald sterk de dikte van de grenslaag stilstaand water aan het sampleroppervlak.

In evenwicht is de concentratie op de sampler $C_w \cdot K_{pw}$ en dus is N^∞ gelijk aan $C_w \cdot K_{pw} \cdot m$ Met bovenstaande en invullen van formule 3 kan formule 2 worden omgeschreven naar:

$$N^t = C_w K_{pw} m \left(1 - e^{-\frac{R_s t}{K_{pw} m}} \right) \quad (A4)$$

Als de K_{pw} 's bekend zijn is voor een sampler is alleen nog de R_s nodig om de concentratie in de de waterfase (C_w) te berekenen.

Theoretisch wordt de R_s gecontroleerd door de transportweerstand, bepaald door de diffusie snelheid door de grenslaag van bulkwater naar de sampler, en de diffusie snelheid in het sampler materiaal. Voor silicone rubber is de weerstand in het sampler materiaal verwaarloosbaar t.o.v. die in de waterfase (Rusina et al 2007, Rusina et al 2010a).

De weerstand in de grenslaag neemt iets toe als de moleculen groter worden en de diffusiecoëfficiënt in water daardoor afneemt. Naast stoffeigenschaften is ook het oppervlak A (m^2) van de sampler en de proporties van de grenslaag bepalend voor R_s . De dikte van de grenslaag hangt af van de lokale stroming of turbulentie. Deze flow afhankelijkheid is gevat in de flowfactor (F) en de stofafhankelijkheid in de diffusie die kan worden beschreven door $M^{-0.47}$, waarbij M het molgewicht van de stof is (Rusina et al 2010b). De sampling rate, R_s , hangt van deze factoren af volgens

$$R_s = F A M^{-0.47} \quad (A5)$$

Hierin is A dus het oppervlak van de sampler en F de flowfactor die de waterbeweging rond de sampler vertegenwoordigt en daarmee de dimensies van de grenslaag. Verder zitten in F ook de factoren die nodig zijn om de eenheden met elkaar in overeenstemming te brengen.

Door samenvoeging van A4 en A5 kan C_w berekend worden door:

$$C_w = \frac{N_t}{K_{pw} m \left(1 - e^{-\frac{F A M^{-0.47} t}{K_{pw} m}} \right)} \quad (A6)$$

Hoe de voor de berekening benodigde flowfactor F wordt bepaald is beschreven in de volgende sectie.

Bepaling van de flowfactor en sampling rate

De uitwisseling tussen een passive sampler en de waterfase is isotroop (Rusina et al 2010), wat betekend dat het opname proces dezelfde kinetiek volgt als het afgifte proces. Dit maakt het mogelijk de sampling rate van SR-PSs te bepalen uit de afgifte van stoffen, zogenaamde performance reference compounds (PRC's), die vooraf op de sampler zijn gedoseerd (Booij et al 2002). De afgifte van deze PRC's volgt:

$$N_t = N_0 e^{-k_e t} \quad (A7)$$

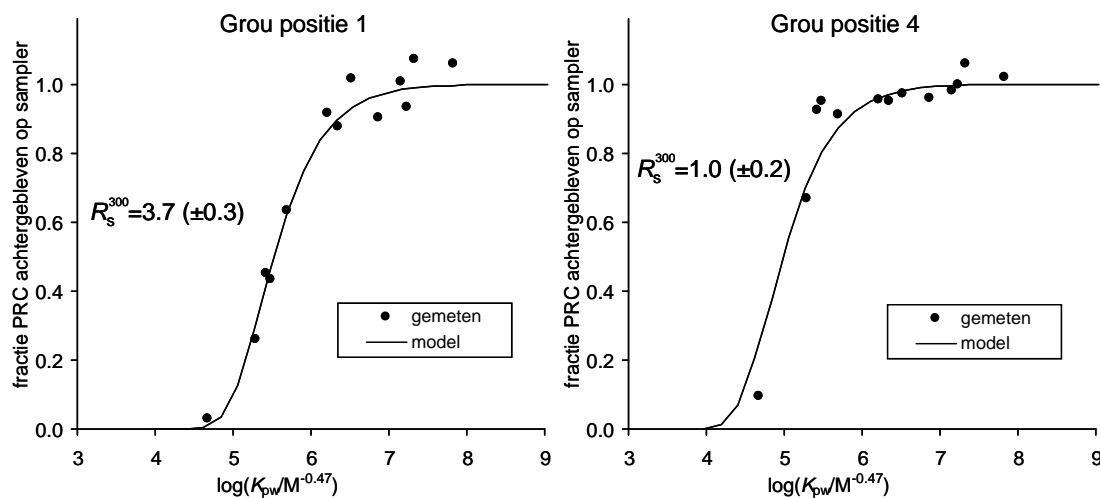
Hierin is N_0 de gedoseerde hoeveelheid gemeten in referentie sheets, N_t is de achtergebleven hoeveelheid van de PRC op de blootgestelde sampler, k_e (d^{-1}) is de eerste orde snelheids constante voor de afgifte.

Door combineren van de vergelijkingen A7, A3 en A5 kan de afgifte van PRC's worden weergegeven door:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-\frac{F A M^{-0.47} t}{K_{pw} m}} \quad (\text{A8})$$

Met een fictieve waarde van F worden van alle PRC's de modelwaardes van N_t/N_0 berekend. Daarna worden met F als aanpasbare parameter de modelwaardes gefit met de gemeten waardes door de som van de verschillen in het kwadraat te minimaliseren (Booij and Smedes, 2010). Deze methode is weinig gevoelig voor uitbijters.

Figuur A.1 laat voorbeelden zien hoe de gefitte data zich verhouden tot gemeten waardes voor twee samplers in Grou. In de figuur zijn de R_s waardes weergegeven voor een stof met een M van 300 (R_s^{300}) voor meteingen in Grou. Deze waardes sluiten goed aan op de lokale stroming condities. Op positie 1 dicht bij de inlaat is de stroming groter dan in de visvijver.



Figuur A.1 Afgifte profiel van PRC's afgezet tegen $K_{pw}/M^{0.47}$. De lijn geeft de door fitting verkregen modelwaardes weer. De data zijn van ronde 3, oktober tot december 2010

De fitting methode van Booij en Smedes (2010) geeft ook een schatting van de onzekerheid de verkregen parameters die ook is meegenomen in de overall onzekerheidsschatting (bijlage B).

Concentraties in de waterfase.

Met formule A6 en de waarde van F bepaald uit de afgifte van de PRCs kan dan de concentratie in de waterfase worden berekend. Hierin is N_t de opgenomen hoeveelheid van de target stoffen.

De eenheid van C_w is altijd gelijk aan de eenheid waarin N_t wordt bepaald uitgedrukt per liter. Dit is meestal het aantal nanogram per sampler waardoor C_w in ng L^{-1} wordt verkregen. De gebruikte verdelingscoëfficiënten zijn voor zover gemeten afkomstig uit Smedes et al 2009 en Smedes en Beeltje 2010. Echter voor veel nieuwe stoffen zijn deze nog niet bekend en zijn deze gelijk gesteld aan de K_{ow} . De gebruikte waardes staan vermeld in Bijlage C.

B. Schatting van een onzekerheidsfactor.

Om te schatten wat de onzekerheid van de berekende concentratie in de waterfase is, moet met veel factoren rekening worden gehouden. De meeste onzekerheid zit in de interpretatie en niet in de monsternamen zelf of de analyse. Resultaten van duplo blootstellingen bleken nauwelijks meer variatie te vertonen dan de analyse (Smedes, 2007). Meer onzekerheid is te verwachten van de gebruikte verdelingscoëfficiënten. De variatie in K_{pw} s zoals die in de literatuur worden gevonden is vaak heel groot. De oorzaak hiervan is dat voor de bepaling hiervan ook de vrij opgeloste concentratie in de waterfase moet worden gemeten. Deze meting geeft vaak een overschatting door aanwezig particulair materiaal (Hermans et al 1992). De K_{pw} s in dit rapport zijn bepaald met de cosolvent methode waarbij de meting van de $\log K_{pw}$ in alleen water geverifieerd wordt door extrapolatie naar alleen water van (log)verdelingscoëfficiënten gemeten in water-methanol mengsels in de range tot 50%. (Smedes et al 2009). Voor dit rapport zijn echter ook veel nieuwe stoffen gemeten in de passieve samplers waarvan nog geen K_{pw} s bekend zijn. Voor deze stoffen is in de berekening de K_{ow} gebruikt in plaats van de K_{pw} . Uiteraard draagt dat ook sterk bij aan de onzekerheid. De K_{ow} s zijn betrokken uit Epi-suite, een programma dat op basis van de structuur van een stof de waarde voor K_{ow} berekend. Als in Epi-suite ook experimentele waarden vermeld waren is deze gemiddelde met de berekende waarde. In Tabel B.1 worden de verschillende bronnen van onzekerheid beschreven.

Tabel B.1 *Onzekerheden in passieve sampling voor alle termen in formule .*

Soort onzekerheid		
Relatieve analyse spreiding – geldt voor hoge concentraties	CV_{anal}	Variatiecoëfficiënten zijn geschat op basis van expert judgement. Deze variëren van 0.1 voor GCMS methodes en hogere, tot 0.3, voor de LCMS methodes
Absolute analyse spreiding – geldt als de meting dicht bij de detectiegrens zit – in principe geldt $dg=3s_a$	s_a	Voor de standaardafwijking is uitgegaan van een generieke waarde van 1 ng. voor alle methodes.
Standaarddeviatie voor gemeten Verdelingscoëfficiënt.	CV_{kpw}	Voor de K_{pw} waarden die zijn gemeten met de cosolventmethode is ook de onzekerheid bekend. Het gemiddelde ligt rond de 20% en $CV_{kpw}=0.2$
Onzekerheid als de Verdelingscoëfficiënt is geschat uit de K_{ow}		De regressie van K_{ow} 's met gemeten K_{pw} 's gaf een standaarddeviatie van 0.46 logeenheid (Smedes en Beeltje (2010) wat overeenkomt met een factor 2.9
Variatiecoëfficiënt in de sampling rate of eigenlijk in de flowfactor F	CV_{RS}	Deze is meebepaald bij de non-lineaire regressie waarmee uit de afgifte van de PRCs de waarde van F is bepaald.

In de onzekerheid van passieve sampling resultaten spelen dus veel factoren een rol. Een complicerende omstandigheid bij de schatting van de onzekerheid is dat enkele factoren soms meer en soms minder van belang zijn, afhankelijk of de sampler voor die stof in evenwicht had bereikt of daar nog heel ver vandaan is. Zo is onzekerheid in de sampler-water verdelingscoëfficiënt sterk mede bepalend voor de totale onzekerheid als een stof evenwicht heeft bereikt gedurende blootstelling, maar deze is weer niet van belang als de sampler nog lineair met de tijd aan het opnemen is. Bij lineaire opname is weer juist de onzekerheid in de sampling rate van belang die in evenwicht weer irrelevant is. Dit is verwerkt door de CV_{kpw} the

vermenigvuldigen met de mate van evenwicht (DEQ) die is bereikt en de cv_F met de mate waarin nog geen evenwicht is bereikt (1-DEQ). De term DEQ is gelijk aan:

$$DEQ = 1 - e^{-\frac{F A M^{-0.47} t}{K_{pw} m}} \quad (B1)$$

Op basis hiervan is, door de verschillende onderdelen Tabel B.1 te sommeren, de variatiecoëfficiënt voor de WIPE passive sampling data berekend.

$$cv_{C_w} = \sqrt{cv_{anal}^2 + s_a^2 / N_t^2 + DEQ^2 cv_{K_{pw}}^2 + (1 - DEQ)^2 cv_F^2} \quad (B2)$$

De cv_{C_w} is een relatieve fout en de uitkomst kan in beginsel groter dan 1 (>100%) doordat de fout in de K_{pw} wel een factor 3 kan zijn hiervoor de K_{ow} is gebruikt. Dit is niet realistisch en het is logischer om de om te zetten naar een factor die de fout aangeeft :

$$uF = 1 + cv_{C_w} \quad (B3)$$

Dit betekent dat de min en plus 1-s grenzen gelijk zijn aan $C_w \times uF$ en C_w/uF en niet negatief worden bij grotere onzekerheid. Wel moet bedacht worden dat de DEQ ook beïnvloed wordt door de onzekerheid in de K_{pw} .

Dit is een eerste poging om de onzekerheid van passieve sampling in kaart te brengen en kan mogelijk verbeterd worden als de foutenstructuur en variatiecoëfficiënten/standaardafwijkingen beter bekend zijn. Verder is hier de onzekerheid geschat ten opzichte van een "werkelijke" waarde. Voor een vergelijking met normen is dat ook belangrijk.

Het is echter duidelijk dat gebruik van een onjuiste K_{ow} vooral een systematische afwijking tot gevolg heeft. Daarom zijn de resultaten wel heel goed onderling te vergelijken. Bij het zoeken naar ruimtelijke of temporele trends hoeft men alleen rekening te houden met de analysespreiding als evenwicht is bereikt. In situaties waar geen evenwicht is bereikt is ook de spreiding in de sampling rate van belang.

C. Op passive samplers geanalyseerde stoffen, inclusief hun norm

stof	Log Kow	Mol gewicht	CASnummer	groep	MKN (µg/L)	referentie	analysemethode	
Broompropylaat	4,9	4,9	428,12	18181-80-1	acaricide	0,17	adhocMTRopgelost	GCMS
chlorfenson	4,21	4,21	303,16	000080-33-1	acaricide	0,1	LC50/3000	GCMS
AVERMECTIN B1A	4,48	4,48	875,12	065195-55-3	antihelminthic	0,007	adhocMTRopgelost	
BDE-100 ¹	7,13	7,24	564,69	189084-64-8	brandvertrager	0,0005	KRW	GCMS
BDE-47 ¹	6,2	6,81	485,8	5436-43-1	brandvertrager	0,0005	KRW	GCMS
BDE-99 ¹	6,64	7,32	564,69	60348-60-9	brandvertrager	0,0005	KRW	GCMS
Tris-butoxyethylfosfaat (TBEP)	5,25	3	398,48	000078-51-3	brandvertrager	1600	Verbruggen et al., 2005	GCMS
Tris(2-chloorethyl)fosfaat (TCEP)	2,89	1,63	285,49	000115-96-8	brandvertrager	?	-	GCMS
Tri-chloor-2-propulfosfaat (TCPP-a)	3,52	2,89	327,57	013674-84-5	brandvertrager	640	EU, 2008	GCMS
Tri-chloor-2-propulfosfaat (TCPP-b)	3,73	2,89	327,57	013674-84-5	brandvertrager	640	EU, 2008	GCMS
tris(1,3-dichloor-2-propyl)fosfaat (TDCPP)	3,87	3,65	430,91	013674-87-8	brandvertrager	?	-	GCMS
Tris-2-ethylhexylfosfaat (TEHP)	6,08	9,49	434,65	000078-42-2	brandvertrager	-	Te weinig data	GCMS
Tri-n-butyl fosfaat (TnBP)	4,93		266	126-73-8	brandvertrager	66	Verbruggen et al., 2005	GCMS
Trifenylfosfaat (TPhP)	5,04	4,7	326,29	000115-86-6	brandvertrager	0,16	Verbruggen et al., 2005	GCMS
Pentachloorbenzeen ¹	4,61	5,0	250	608-93-5	industrie	0,007	KRW	GCMS
1,4-dichlorobenzeen	3,17		147	000106-46-7	Industrie, mottenballen, wc-blokjes	250	STAATSCOURANT, 2009	GCMS
Hexachloorbenzeen ¹	5,05	5,05 5,05	285		industrie	0,01	KRW	GCMS
Hexachloorbutadien ¹	4,91	4,9	260,76		industrie	0,1	KRW	GCMS
Nonylphenol ¹	4,62	5,99	215	25154-52-3	Industrie, detergent	0,3	KRW	LCMS NP&OP
Butylbenzylftalaat (BBPhT)	5,20	4,6	312,4	86-68-7	ftalaat	7,5	adhocMTRopgelost	#N/A
DCycPhT	5,67	5,9	328,2		ftalaat	?	-	#N/A
di-ethylhexulftalaat(DEHP) ¹	4,61	7,5	390,6	117-81-7	ftalaat	1,3	KRW	#N/A
Diethylftalaat (DEPhT)	3,23	2,3	222,2	84-66-2	ftalaat	165	adhocMTRopgelost	#N/A
n-dibutylftalaat(DIBPhT)	4,03	4,2	278,4	84-74-2	ftalaat	10	Van Wezel, 1999	#N/A
DiNonPhT	5,11	9,1	418,6		ftalaat	?		#N/A
Dimethylftalaat (DMPhT)	2,51	1,6	194,2	131-11-3	ftalaat	96	adhocMTRopgelost	#N/A
DnBPhT	4,64	4,5	278,4		ftalaat	?		#N/A

stof	Log Kow	Mol gewicht	CASnummer	groep	MKN (µg/L)	referentie	analysemethode	
DnOctPhT	6,07	8,1	390,6					
DtriDecPht	13,72	13,4	530,8	ftalaat	?		#N/A	
DundecPhT	11,69	11,5	464,7	ftalaat	?		#N/A	
azaconazool	2,73	2,73	300,15	060207-31-0	fungicide	51	adhocMTRopgelost	
azoxystrobin	1,58	1,58	403,4	131860-33-8	fungicide	0,056	adhocMTRopgelost	
captafol	3,42	3,42	349,06	002425-06-1	fungicide	0,028	MTRopgelost	
captan					fungicide	0,34	STAATSCOURANT, 2009	
chlorothalonil		3,66	265,91	001897-45-6	fungicide	0,8	MTRopgelost	
Clotrimazole	5,95		344,8	23593-75-1	fungicide	0,0187	adhocMTRopgelost	
difenoconazool (som)	5,2	5,2	406,27	119446-68-3	fungicide	0,76	MKN	
difenoconazool A	5,2	5,2	406,27	119446-68-3	fungicide	0,76	MKN	
difenoconazool B	5,2	5,2	406,27	119446-68-3	fungicide	0,76	MKN	
etridiazool		3,6	247,53	002593-15-9	fungicide	18,2	adhocMTRopgelost	
fenpropimorf	5,4	5,4	303,49	067564-91-4	fungicide	0,22	adhocMTRopgelost	
flutolanil	4,65	4,65	323,32	066332-96-5	fungicide	22	MTRopgelost	
imazalil	4,1	4,1	297,19	035554-44-0	fungicide	0,87	adhocMTRopgelost	
iprodione	2,85	2,85	330,17	036734-19-7	fungicide	0,5	adhocMTRopgelost	
propiconazool A	4,13	4,13	342,23	060207-90-1	fungicide	10	adhocMTRopgelost	
propiconazool B	4,13	4,13	342,23	060207-90-1	fungicide	10	adhocMTRopgelost	
							v. Leeuwen & v.	
tebuconazool	3,89	3,89	307,83	107534-96-3	fungicide	0,63	Vlaardingen, 2010	
thiabendazol	2	2	201,25	000148-79-8	fungicide	3,3	MTRtotaal	
trifloxystrobin	4,5	4,5	408,37	141517-21-7	fungicide	0,054	adhocMTRopgelost	
vinclozolin	3,01		286,11	50471-44-8	fungicide	1,6	adhocMTRopgelost	
BITERTANOL	4,07	4,16	4,07	337,42	055179-31-2	fungicide	0,31	adhocMTRopgelost
bupirimaat	2,69	2,7	2,68	316,42	18181-80-1	fungicide	30	adhocMTRopgelost
CARBENDAZIM	1,55	1,52	1,55	191,19	010605-21-7	fungicide	0,6	STAATSCOURANT, 2009
Cyazofamid	2,87	2,87	324,79	120116-88-3	fungicide	0,13	adhocMTRopgelost	
Cymoxanil	4,24	4,24	198,18	057966-95-7	fungicide	1,5	adhocMTRopgelost	
cyprodinil	3,995	4	3,99	225,3	121552-61-2	fungicide	0,41	adhocMTRopgelost
dichlofluanide	3,21	3,7	2,72	333,22	1085-98-9	fungicide	0,03	adhocMTRopgelost
dodemorf (som)	5,7	5,7	281,49	60-51-5	fungicide	33	adhocMTRopgelost	

stof	Log Kow	Mol		CASnummer	groep	MKN (µg/L)	referentie	analysemethode
		gewicht						
dodemorf-cis	5,7	5,7	281,49	1593-77-7	fungicide	33	adhocMTRopgelost	
dodemorf-trans	5,7	5,7	281,49	1593-77-7	fungicide	33	adhocMTRopgelost	
DODINE	1,235	1,15	1,32	287,45	002439-10-3	0,44	STAATSCOURANT, 2009	
fenhexamid	3,72	3,51	3,72	302,2	126833-17-8	2	adhocMTRopgelost	
kresoxim-methyl	4,64	3,4	5,88	313,36	143390-89-0	0,63	STAATSCOURANT, 2009	
METALAXYL	1,7	1,68	1,7	279,34	057837-19-1	46	adhocMTRopgelost	
Penconazool	4,67		4,67	284,19	066246-88-6	1,7	MTRopgelost	
Pencycuron	5,51	4,82	5,51	328,84	066063-05-6	2,7	adhocMTRopgelost	
Prochloraz	4,13		4,13	376,67	67747-09-5	1,3	adhocMTRopgelost	#N/A
PROPICONAZOLE	4,13	3,72	4,13	342,23	060207-90-1	10	adhocMTRopgelost	
pyrimethanil	3,015	2,84	3,19	199,26	53112-28-0	2,9	adhocMTRopgelost	
quintozeen	5,03		5,03	295,34	000082-68-80.44	2,9	adhocMTRopgelost	GCMS
Triademefon	2,94		2,94	293,75	43121-43-3	0,91	adhocMTRopgelost	#N/A
TRIADIMENOL	2,95	3,087	2,95	295,77	055219-65-3	3,2	adhocMTRopgelost	
Cyproconazole	3,25		3,25	291,78	94361-06-5	1,5	adhocMTRopgelost	#N/A
DES	5,64	5,07	5,64	268,36	000056-53-1	48,6	adhocMTRopgelost	
Triclosan	3,89		289,5	3380-34-5	PCP	0,053	Capdevielle et al., 2009	LCMS BPA_TBBA
trimethoprim	0,91		0,91	290,32	000738-70-5	16	Grung et al., 2008	LCPharma
AZITHROMYCIN	3,24	4,02	3,24	749	083905-01-5	120	Kummerer et al, 2004	
CHLORAMPHENICOL	1,03	1,14	0,92	323,13	000056-75-7	305	Kummerer et al, 2004	
Flumequine	2,7	1,6	2,7	261,25	042835-25-6	5	Hernando et al., 2006a	
sulfamethoxazole	0,685	0,89	0,48	253,28	000723-46-6	0,118	Grung et al., 2008	
carbamazepine	2,45		2,45	236,28	000298-46-4	0,5	Ferrari et al., 2006	LCPharma
Chloroquine phosphate	4,5	4,63	4,5	319,88	000050-63-5	11,7	Kummerer et al, 2004	
metoprolol	1,69		1,69	267,37	037350-58-6	31	Grung et al., 2008	LCPharma
							Kummerer et al., 2004,	
bisoprolol	1,84	1,87	1,84	325,45	066722-44-9	0.01	read across	
fenofibrate	5,19		5,19	360,84	049562-28-9	50	Hernando et al., 2006b	LCPharma
Gemfibrozil	4,77		4,77	250,34	025812-30-0	10,4	Hernando et al., 2006b	
Iopanoic acid	5,78		5,78	570,94	000096-83-3			
Cyclofosfamide	0,97	0,86	0,97	261,09	003778-73-2	1120	Grung et al., 2008	
Miconazole nitrate	6,25		6,25	416,14	022832-87-7			

stof	Log Kow	Mol gewicht	CASnummer	groep	MKN (µg/L)	referentie	analysemethode		
Ibuprofen ²	3,88	3,97	3,79	206,29	015687-27-1	geneesmiddel, pijnstillers	0,01	EC, 2011	
Diclofenac ²	0,635	0,7	0,57	318,14	15307-79-6	geneesmiddel, pijnstillers	0,1	EC, 2011	
naproxen	3,14	3,18	3,1	230,27	022204-53-1	geneesmiddel, pijnstillers	37	Carlsson et al., 2006	
paracetamol	0,27		0,27	151,17	000103-90-2	geneesmiddel, pijnstillers	9,2	Carlsson et al., 2006; Grung et al, 2008	LCPharma
phenazone	5,2		5,2	321,47	000127-35-5	geneesmiddel, pijnstillers			LCPharma
ANTIPYRINE	0,59	0,38	0,59	188,23	000060-80-0	geneesmiddel, pijnstillers	?		
2-aminoacetophenon	1,6		1,6	135,17	000551-93-9	Industrie, geurstof	?		GCPEST
clomazon	2,68	2,5	2,86	239,7	81777-89-1	herbicide	0,56	adhocMTRopgelost	
Bifenox ²	4,15		4,15	342,14	042576-02-3	herbicide	0,04	EC,2011	GCPEST
Chloropham	3,3		3,3	213,67	000101-21-3	herbicide	3,3	STAATSCOURANT, 2009	GCPEST
Diuron ¹	2,67		2,67	233,1	000330-54-1	herbicide	0,2	KRW	Lcpest
Isoproturon ¹	2,84		2,84	206,29	034123-59-6	herbicide	0,3	KRW	Lcpest
lenacil	3,09		3,09	234,3	002164-08-1	herbicide	0,95	adhocMTRopgelost STAATSCOURANT, 2009,	Lcpest
linuron	2,91		2,91	249,1	000330-55-2	herbicide	0,25	opgelsot	Lcpest
prosulfocarb	4,23		4,23	251,39	052888-80-9	herbicide	1,13	adhocMTRopgelost	GCPEST
Terbutryn ²	3,74		3,74	241,36	000886-50-0	herbicide	0,065	EC, 2011	GCPEST
Triallate	4,6		4,6	304,66	002303-17-5	herbicide	1,9	STAATSCOURANT, 2009	GCPEST
cycloxydim	3,88		3,88	325,47	101205-02-1	herbicide	2,6	adhocMTRopgelost	
Aclonifen ²	3,96	4,04	3,88	264,67	74070-46-5	herbicide	0,12	EC, 2011	
Atrazine ¹	2,715	2,61	2,82	215,69	1912-24-9	herbicide	0,6	KRW	
CHLORIDAZON	0,76	1,14	0,76	221,65	001698-60-8	herbicide	27	STAATSCOURANT, 2009	
cinidon-ethyl	4,84		4,84	394,26	142891-20-1	herbicide	1,1	adhocMTRopgelost	
fenmedifam	!	!				herbicide	0,5	adhocMTRopgelost	
DESMEDIPHAM	3,305	3,39	3,22	300,32	013684-56-5	herbicide	1	adhocMTRopgelost	
Diflufenican	3,53		3,53	394,29	83164-33-4	herbicide	9	adhocMTRopgelost	#N/A
dimethenamid	2,36	2,15	2,57	275,8	87674-68-8	herbicide	0,13	STAATSCOURANT, 2009	
ethofumesaat	2,795	2,7	2,89	286,35	26225-79-6	herbicide	6,4	adhocMTRopgelost	
fluazifop-butyl	4,92	4,5	5,34	383,37	69806-50-4	herbicide	0,53	adhocMTRopgelost	
Metamitron	1,44	0,83	1,44	202,22	041394-05-2	herbicide	10	MTRopgelost	
metazachloor	2,255	2,13	2,38	277,76	67129-08-2	herbicide	34	STAATSCOURANT, 2009	

stof	Log	Mol			CASnummer	groep	MKN	referentie	analysemethode
	Kow		gewicht				(µg/L)		
Methabenzthiazuron	2,65	2,64	2,65	221,28	018691-97-9	herbicide	1,8	MTRopgelost	
metolachloor	3,1275	3,015	3,24	283,8	51218-45-2	herbicide	0,2	STAATSCOURANT, 2009	
METOXURON	2,11	1,64	2,11	228,68	019937-59-8	herbicide	19	adhocMTRopgelost	
metribuzin	1,595	1,7	1,49	214,29	21087-64-9	herbicide	0,052	adhocMTRopgelost	
MONOLINURON	2,26	2,3	2,26	214,65	001746-81-2	herbicide	0,15	STAATSCOURANT, 2009	
MONURON	1,985	1,94	2,03	198,65	000150-68-5	herbicide	0,2	adhocMTRopgelost	
pendimethalin	5	5,18	4,82	281,31	40487-42-1	herbicide	0,3	adhocMTRopgelost	
propyzamide	3,5	3,43	3,57	256,13	23950-58-5	herbicide	11	adhocMTRopgelost	
Simazine ¹	2,4		2,4	201,66	122-34-9	herbicide	1	KRW	#N/A
terbutylazine	3,24	3,21	3,27	229,71	5915-41-3	herbicide	0,19	STAATSCOURANT, 2009	
Triflusulfuron-methyl	3,94		3,94	492,43	126535-15-7	herbicide	0,13	JG-MKN	
Desethylatrazine	1,78	1,78	1,78	187,63	006190-65-4	herbicide, metaboliet	74	adhocMTRopgelost	
2,6-Dichlorobenzamide (BAM)	0,835	0,77	0,9		002008-58-4	herbicide, metaboliet	1000	adhocMTRopgelost	
dichlobenil	2,8		2,8	172,01	001194-65-6	herbicide, verhardingen	20	adhocMTRopgelost	GCPEST
anthraquinone	3,39		3,39	208,22	000084-65-1	industrie	0,075	LC50/3000	GCPEST
Bisphenol-A	3,64		3,64	228,29	80-05-7	industrie	64	adhocMTRopgelost	#N/A
BUTYL BENZYL PHTHALATE	4,785	4,73	4,84	312,37	000085-68-7	industrie	7,5	adhocMTRopgelost	
DICYCLOHEXYL PHTHALATE	6,2		6,2	330,43	000084-61-7	industrie, weekmaker	0,84	MTRopgelost	
2,4-DDD ¹	5,52		5,87	320	53-19-0	insecticide	0,025	KRW	GCMS
2,4-DDE ¹	6,16		5,87	320,05	003224-82-6	insecticide	0,025	KRW	GCMS
2,4-DDT ¹	6,27			318		insecticide	0,025	KRW	GCMS
4,4-DDD ¹	5,41		4,8	320		insecticide	0,025	KRW	GCMS
4,4-DDE ¹	6,26		5,69	318		insecticide	0,025	KRW	GCMS
4,4-DDT ¹	6,14		6,36	355		insecticide	0,025	KRW	GCMS
aHCH ¹	3,28		3,7	291		insecticide	0,02	KRW	GCMS
alfa-endosulfan ¹	4,85			406,92	000959-98-8	insecticide	0,005	KRW	GCMS
bHCH ¹	2,29			291		insecticide	0,2	KRW	GCMS
Chloorpyrifos ¹	4,66		4,66	350,59	002921-88-2	insecticide	0,03	KRW	GCPEST
cis-chloordaan	5,24		5,47	409,8	5103719	insecticide	0,002	MTRopgelost	GCMS
deltamethrin	6,18		6,18	505,21	052918-63-5	insecticide	0,0000031	STAATSCOURANT, 2009	GCPEST
dHCH ¹	2,81			291		insecticide	0,02	KRW	#N/A
Dieldrin ¹	5,26		5,34	380,9	60-57-1	insecticide	0,01	KRW	GCMS

stof	Log Kow	Mol gewicht	CASnummer	groep	MKN (µg/L)	referentie	analysemethode		
Endrin ¹	5,4	5,4	380,91	000072-20-8	insecticide	0,01	KRW	GCMS	
gHCH ¹	3,34	3,7	291		insecticide	0,02	KRW	GCMS	
heptachloorepoxide (cis/trans) ²	4,84	5,1	389,32		insecticide	0,0005	STAATSCOURANT, 2009	GCMS	
Pirimiphos-methyl	3,44	3,44	305,33	029232-93-7	insecticide	0,0005	STAATSCOURANT, 2009	GCPEST	
tebufenpyrad	5,76	5,76	333,86	119168-77-3	insecticide	0,024	adhocMTRopgelost	GCPEST	
trans-chloordaan	5,24	5,47	410	5103742	insecticide	0,002	ECB, 2008	GCMS	
Aldrin ¹	6,625	6,5	6,75	364,92	309-00-2	insecticide	0,01	KRW	
bifenthrin	8,15	8,15	422,88	82657-04-3	insecticide	0,001	MTRopgelost		
Chloorfenvinfos ¹	3,98	3,81	4,15	359,58	470-90-6	insecticide	0,1	KRW	
Diazinon	3,86	3,86	304,35	333-41-5	insecticide	0,037	MTRopgelost	#N/A	
DIFLUBENZURON	3,735	3,88	3,59	310,69	035367-38-5	insecticide	0,004	STAATSCOURANT, 2009	
dimethoat	0,53	0,78	0,28	229,25	60-51-5	insecticide	0,07	MTRopgelost	
ethoprosfos	3,365	3,59	3,14	242,33	13194-48-4	insecticide	0,063	MTRopgelost	
fenamifos	3,26	3,23	3,29	303,36	22224-92-6	insecticide	0,012	JG-MKN	
fenitrothion	3,3	3,3	3,3	277,23	122-14-5	insecticide	0,009	STAATSCOURANT, 2009	
IMIDACLOPRID	0,565	0,57	0,56	255,67	138261-41-3	insecticide	0,067	STAATSCOURANT, 2009	
methiocarb	2,895	2,92	2,87	225,31	2032-65-7	insecticide	0,016	adhocMTRopgelost	
OXAMYL	-1,2	-0,47	-1,2	219,26	023135-22-0	insecticide	1,8	MTRopgelost	
parathion-ethyl	3,78	3,83	3,73	291,26	56-38-2	insecticide	0,005	MTRopgelost	
parathion-methyl	2,805	2,86	2,75	263,21	298-00-0	insecticide	0,011	MTRopgelost	
Pymetrozine	0,355	-0,18	0,89	217,23	123312-89-0	insecticide	0,5	adhocMTRopgelost	
tetramethrin (som)	5,135	4,73	5,54	331,42	5915-41-3	insecticide	0,00029	adhocMTRopgelost	
tetramethrin-cis	5,135	4,73	5,54	331,42	7696-12-0	insecticide	0,00029	adhocMTRopgelost	
tetramethrin-trans	5,135	4,73	5,54	331,42	7696-12-0	insecticide	0,00029	adhocMTRopgelost	
thiacloprid	2,33	2,33	252,72	111988-49-9	insecticide	0,01	Van Herwijnen, 2010		
tolclofos-methyl	4,665	4,56	4,77	301,13	57018-04-9	insecticide	1,2	KRW	
triazamaat	2,54	2,69	2,39	314,41	112143-82-5	insecticide	0,048	adhocMTRopgelost	
Propoxur	1,9	1,9	209,24	114-26-1	insecticide, anti-vlooien	0,01	STAATSCOURANT, 2009	#N/A	
Carbofuran	2,3	2,3	221,25	1563-66-2	insecticide, carbamaat	0,910	MTRopgelost	#N/A	
fenoxycarb	4,27	4,3	4,24	301,35	72490-01-8	insecticide, carbamaat	0,0003	STAATSCOURANT, 2009	
METHOMYL	0,605	0,6	0,61	162,21	016752-77-5	insecticide, carbamaat	0,08	MTRopgelost	
pirimicarb	1,55	1,7	1,4	238,29	23103-98-2	insecticide, carbamaat	0,09	MTRopgelost	

stof	Log			Mol			groep	MKN (µg/L)	referentie	analysemethode
	Kow			gewicht	CASnummer					
Aldicarb	1,36		1,13	1,36	190,26	000116-06-3	insecticide, carbamaat	0,1	MTRopgelost	
cyhalothrin-lambda	6,875		6,9	6,85	449,86	91465-08-6	insecticide, pyrethroid	0,00029	MTRopgelost	
permethrin (som)	6,965		6,5	7,43	391,3	40487-42-1	insecticide, pyrethroid	0,0002	MTRopgelost	
permethrin-cis	6,965		6,5	7,43	391,3	52645-53-1	insecticide, pyrethroid	0,0002	MTRopgelost	
permethrin-trans	6,965		6,5	7,43	391,3	52645-53-1	insecticide, pyrethroid		0,0002	
ADBI	5,26			5,4	244	13171-00-1	musk			GCMS
AHMI	5,08			5,85	244	15323-35-0	musk			GCMS
AHTN	5,29			5,7	258	1506-02-1	musk	2,8	ECB, 2008	GCMS
AITI	5,37			6,3	258	68140-48-7	musk			GCMS
DPMI	4,50			4,8	206,3239	33704-61-9	musk			GCMS
HHCB	5,32			5,9	258	1222-05-5	musk	4,4	ECB,2008	GCMS
musk Ambrette	4,31			3,7	268,2658	83-66-9	musk			GCMS
musk Keton	4,29			4,3	294,3031	81-14-1	musk	6,3	NOEC/10	GCMS
musk Moskeen	5,14			4,5	280,3196	116-66-5	musk			GCMS
musk Tibeteen	5,08			4,3	266,293	145-39-1	musk			GCMS
musk Xyleen	4,74			4,9	297,26	81-15-2	musk	1,1	NOEC/50	GCMS
alfa-estradiol	4,01			4,01	272,39	000057-91-0	oestro	-		LCPharma
beta-estradiol ²	4,01			4,01	272,39	000050-28-2	oestro	0,00053	EC, 2011	LCPharma
estrone	3,13			3,13	270,37	000053-16-7	oestro	0,322	adhocMTRopgelost	LCPharma
PROGESTERONE	3,77		3,87	3,67	314,47	000057-83-0	oestro	-		
MinOil	6				200		olie	-		
MinOil fract.C16	6				200		olie	-		
MinOil fract.C17	6				200		olie	-		
MinOil fract.C18	6				200		olie	-		
Acenafteen	3,62	3,62	3,62	3,92	154,2078	83-32-9	PAK	3,8	adhocMTR	GCMS
acenaftyleen	3,26	3,26	3,26	4	152,1919	208-96-8	PAK	5,8	adhocMTR	GCMS
Antraceen ¹	4,21	4,21	4,21	4,54	178,2292	120-12-7	PAK	0,1	KRW	GCMS
Benzo(a) atraceen	5,32	5,32	5,32	5,91	228,2879	56-55-3	PAK	0,01	adhocMTR	GCMS
Benzo(A)Pyreen ¹	5,69	5,69	5,69	6,04	252,3093	50-32-8	PAK	0,05	KRW	GCMS
Benzo(B)Fluoranteen ¹	5,74	5,74	5,74	5,9	252	205-99-2	PAK	0,03	KRW	GCMS
Benzo (GHI)Peryleen ¹	6,02	6,02	6,02	6,5	276	190-86-3	PAK	0,002	KRW	GCMS
Benzo(K)fluoranteen ¹	5,74	5,74	5,74	5,9	252	207-08-9	PAK	0,03	KRW	GCMS

stof	Log			Mol			groep	MKN (µg/L)	referentie	analysemethode
	Kow			gewicht		CASnummer				
Chryseen	5,25	5,25	5,25	5,86	228	218-01-9	PAK	0,3	MTRopgelost	GCMS
Dibenzo(a,h) antraceen	6,24	6,24	6,24	6,75	278		PAK	0,00102	adhocMTYRopgelost	GCMS
Fenantreen	4,11	4,11	4,11	4,57	178,2292	85-01-8	PAK	0,3	STAATSCOURANT, 2009	GCMS
Fluoreen	3,79	3,79	3,79	4,18	166,2185	86-73-7	PAK	0,068	adhocMTRopgelost	GCMS
Fluorantheen ¹	4,62	4,62	4,62	5,22	202,2506	206-44-0	PAK	0,002	KRW	GCMS
Indeno(123cd)pyreen ¹	6,06	6,06	6,06	6,5	276		PAK	0,1	KRW	GCMS
Naftaleen ¹	3,03	3,03	3,03	3,37	128,1705	91-20-3	PAK	2,4	KRW	GCMS
Pyreen	4,68	4,68	4,68	5,18	202,2506	129-00-0	PAK	0,000033	adhocMTRopgelost	GCMS
PCB028 ²	5,53	5,53	5,48	28	5,67	257,5	7012-37-5			GCMS
PCB052 ²	5,80	5,80	5,78	52	5,84	292	35693-99-3			GCMS
PCB101 ²	6,28	6,28	6,26	101	6,38	326,5	37680-73-2			GCMS
PCB118 ²	6,42	6,42	6,39	118	6,74	326,5	31508-00-6			GCMS
PCB138 ²	6,77	6,77	6,71	138	6,83	361	35065-28-2			GCMS
PCB153 ²	6,72	6,72	6,71	153	6,92	361	35065-27-1			GCMS
PCB180 ²	6,99	6,99	7,15	180	7,36	395,5	35065-29-3			GCMS
DEET	2,26			2,26	191,28	000134-62-3	PCP	0,11	adhocMTRopgelost	GCPEST
caffeine	0,16			0,16	194,19	000058-08-2	PCP	151	Kummerer et al., 2004	LCPharma
salicylzuur	2,25		2,26	2,24	138,12	000069-72-7	PCP	168	Kummerer et al., 2004	

= KRW prioritair(gevaarlijke stof), 2= potentiële prioritaire stof

D. stoffen met een grote onzekerheid in analyse

stofnaam	groep	Werkings-mechanisme	Onzekerheids-factor	Molecuul-gewicht
Fluoxetine	pharma	prozac	128	346
Trimethoprim	pharma	anti-bioticum	64	290
Metoprolol	pharma	betablokker	64	270
Oxamyl	insect	carbamaat	64	219
thiacloprid	insect	neonicotinoide	64	252
bisoprolol	pharma	betablokker	64	325
fenamifos	insect	insecticide	64	303
pymetrozine	insect	pyridine azomethines	64	217
abamectine	insect		64	873
imizalil (chlooramizool)	fung	azool	32	297
imidacloprid	insect	neonicotinoide	32	256
flumequine	pharma	anti-bioticum	32	262
phenazone	pharma	pijnstiller	16	188
prochloraz	fungic	imidazool	16	377
dodine	fungic		16	287
salicylic acid			16	138
miconazool	pharma	anti-schimmelmiddel	8	417
carbamazepine	pharma	anti-epilectum	8	237
Azoxystrobin	fungic	azoolgroep	8	403
Difenoconazool	fungic	azool	4	406
carbendazim	fungic	Benzimidazole fungicide	4	192
Chloramphenicol	pharma	anti-bioticum	2	323
thiabendazool	fungic	azool	2	201
Azaconazool	fungic	azool	2	300
Propiconazool	fungic	azool	2	342
Azithromycin	pharma	anti-bioticum	2	749
bitertanol	fungic	azool	2	338

2 In-vitro bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen

Albertinka Murk, Wageningen Universiteit
Hans van den Berg, Wageningen Universiteit



2.1 Samenvatting

In vitro bioassays kunnen een schakel vormen tussen chemische analyses enerzijds en effecten op organismen anderzijds. Effluenten zijn complexe mengsels van zeer veel stoffen die deel nog onbekend zijn (want bv nieuw gevormd) en deels onder de detectielimiet van chemische analyse vallen. Met de *in vitro* bioassays wordt de totale toxische potentie gekwantificeerd, waarbij het er niet toe doet of dit veroorzaakt wordt door 100 stoffen die in extreem lage concentraties voorkomen of maar door 1 of 2 stoffen. Met *in vitro* bioassays kan worden vastgesteld in welke monsters, en vervolgens in welke fracties daarvan zich eventueel nog onbekende toxiciteit bevindt wat kan helpen bij de verdere identificatie daarvan. Ook kan de mate van toxiciteit vergeleken worden met beleidsnormen of ecotoxicologisch veilige grenswaarden.

Van de 4 monsterlocaties in de 3 RWZI effluent nazuiverings-moerassen zijn watermonsters verzameld in de tijd en hieruit zijn microverontreinigingen geëxtraheerd. Deze extracten zijn in 7 *in vitro* bioassays getest die specifieke (bijvoorbeeld estrogene) of algemene toxische potentie van de stoffen in het extract kunnen kwantificeren. De volgende toxische potenties zijn bepaald met de celsystemen:

- 1) MTT assay: algemene cel toxiciteit ter karakterisering van de giftigheid van de extracten en om de (hierna genoemde) specifieke assays bij een niet toxische concentratie uit te kunnen voeren;
- 2) ER-Luc assay, een reporter gen assay voor estrogene activiteit;
- 3) AR-Luc assay, een reporter gen assay voor androgene activiteit;
- 4) DR-Luc assay, een reporter gen assay voor dioxine-achtige activiteit (48 uren meting voor stabiele stoffen) en voor PAK-achtige activiteit (6-8 uren voor snel metaboliseerbare stoffen);
- 5) CEPIA ("Cellular Efflux Pump Inhibition Assay") voor het bepalen van de remming van de cellulaire effluxpompjes, een mechanisme dat kan leiden tot hogere concentraties in de cel van andere toxische stoffen;
- 6) Pharma-test 1 en 2 waarin de toxiciteit van de extracten voor een tweetal bacterie-stammen wordt bepaald die gevoelig zijn voor antibiotica uit de groep van respectievelijk β -Lactams, waartoe ook penicilline behoort, en tetracycline-achtige antibiotica.

De meetresultaten voor de extracten in deze testen worden uitgedrukt als equivalenten van de standaardstoffen voor de verschillende testen, meestal als concentratie per liter water of als totale activiteit.

De resultaten van het *in vitro* onderzoek laten een grote variatie in toxiciteit in de tijd zien, hoewel elk moeras toch wel een karakteristiek gemiddeld respons patroon laat zien. Voor vrijwel alle testen neemt de toxische potentie af in de loop van het moeras. Het meest opvallend is het bufferende vermogen in die gevallen waar op posities 1 en 2 een relatief grote toxiciteit optreedt. Hierdoor bereikt de toxiciteit niet het oppervlaktewater. Maar over het algemeen is de acute toxiciteit in de extracten vrij laag.

De meest duidelijke responsen worden gevormd door de estrogene activiteit. De estrogeniteit van het effluent van de conventionele installatie (positie 1) ligt in dezelfde orde van grootte als die van het LOES project (Landelijk Onderzoek Estrogene Stoffen) waar deze in effluent 0,2-9,5 (mediaan 0,9) pmol EEQ/L was.

In Grou is de estrogeniteit soms relatief hoog, maar deze neemt altijd af in de richting van posities 3 en 4. Vooral in augustus 2010 was er extreem hoge estrogene input. Soms is de EEQ op locatie 2 hoger dan op locatie 1. Dit zou kunnen komen door het verdwijnen van antagonisten of door het passeren van een batch effluent met relatief hoge estrogene activiteit, maar wellicht ook door vogels die hormonen in het water inbrengen. In Hapert neemt de estrogeniteit altijd eerst toe na positie 1. Over het algemeen is deze toename weer verdwenen op positie 4, behalve in mei. In Cuyk is de estrogeniteit ook het laagst bij het verlaten van het moeras (positie 4).

De gemiddelde en mediane androgene potenties zijn 3-10 keer lager dan de estrogene activiteit maar wel hoger dan de waarden uit het LOES project. Dit kan samenhangen met een andere extractie methode. De androgene activiteit neemt ook af tijdens de gang door het moeras.

Schildklierhormoonequivalenten werden in geen van de geëxtraheerde watermonsters aangetroffen boven de detectiegrens van 0,01 tot 0,16 pmol T3-equivalenten /monster. De extractie methode is niet ontwikkeld of geëvalueerd voor schildklierhormoonreceptor gemedieerde werking, dus er is op dit moment nog geen uitspraak te doen over de aanwezigheid van een dergelijke specifieke endocrien versturende werking.

De DR-Luc responsen voor Benzo-a-pyreen laten geen duidelijk patroon over de moerassen zien. Wel zijn er uitschieters gevonden. In de extracten van de watermonster uit het moeras was geen dioxine-achtige toxische potentie waarneembaar, behalve bij één van de monsters van Grou (signaal dat net boven de waarnemingsgrens van 0,01 tot 0,25 pmol TEQ/monster lag). De verwachting is dat sedimentmonsters een grotere BaPEQ- en TEQ activiteit zullen hebben aangezien dergelijke stoffen een relatief hoge LogKow hebben en dus niet vrij in het water aanwezig zijn. Het is echter ook niet te verwachten dat er in watermonsters dioxine-achtige stoffen aanwezig zijn. In het LOES project werden soms hoge activiteiten van dioxine-achtige stoffen aangetroffen in sedimenten.

Verschillende waterextracten remden de werking van de cellulaire efflux pompjes, maar er was geen duidelijke relatie met de locatie in het moeras of het signaal nam juist toe naar het einde van het moeras. Het is nog niet duidelijk of dit komt door het verdwijnen van antagonisten of het verschijnen van meer gecompliceerde natuurlijke organische stoffen. Binnen het project zijn specifieke *in vitro* bioassays voor antibiotica ontwikkeld voor 96-wells platen. Er zijn twee bacterie stammen gebruikt (*K.rhizophila* en *B.cereus*) die specifiek gevoelig zijn voor blootstelling aan respectievelijk Tetracycline en Penicilline. De antibacteriële activiteit van de moeraswaterextracten waren echter lager dan de detectielimiet.

Het zuiveringsmoeras draagt wel bij aan de vermindering van de toxische potentie van de waterextracten van het effluent. De grootste verbetering is te zien in Grou tijdens de episodes met sterk verhoogde estrogene activiteit op positie 1 (in maart en augustus 2010). Na passage van het zuiveringsmoeras (positie 4) was de estrogene activiteit in die gevallen een factor 22 en 15 lager. Bij Grou is de gemiddelde reductie van estrogene potentie 7x. Bij Cuijck en Hapert zijn de resterende estrogene potenties in het effluent vrij consequent relatief laag, maar incidentele pieken worden efficiënt verwijderd. In Hapert valt op dat op posities 2 en 3 regelmatig de estrogene potentie toeneemt om daarna weer af te nemen naar positie 4. Het is de vraag of de toename komt doordat antagonisten uit het afvalwater worden afgebroken, of dat bv eventueel aanwezige vogels estrogene stoffen via hun ontlasting toevoegen aan het moeraswater.

Om aangetoonde microverontreinigingen die de zuivering hebben overleefd alsnog af te breken zouden andere afbraakroutes geïntroduceerd moeten worden dan aerobe en anaerobe biotransformatie. om de stoffen. Dit zou wellicht met UV uit natuurlijk zonlicht kunnen, omdat UV nog niet is toegepast tijdens het zuiveringsproces.

2.2 Principe van de toegepaste meettechnieken

In aanvulling op chemische analyses en testen met levende organismen (*in vivo* bioassays) zijn in dit onderzoek ook *in vitro* bioassays toegepast. Waar een veelheid van stoffen vanwege de zeer lage concentraties niet aan te tonen zijn met chemische analyses, en de effecten van deze stoffen gemist worden in *in vivo* bioassays omdat ze subacuut zijn en pas op langere termijn zichtbaar worden, kunnen de gevoelige *in vitro* bioassays aanwijzingen geven voor de aanwezigheid van lage concentraties verontreinigende stoffen die bijvoorbeeld tot verstoring van de hormoonhuishouding kunnen leiden. Bijvoorbeeld in het Landelijk Onderzoek Oestrogene Stoffen (LOES) is met diverse *in vitro* bioassays aangetoond dat in ongezuiverd en gezuiverd riool- en oppervlaktewater estrogene activiteit aanwezig was, en in sommige effluenten en in de rivier de Maas ook androgene activiteit.

Aangetoond werd dat van de estrogene activiteit in het RWZI influent in het effluent nog maar een fractie over was. In dit WIPE project zijn de volgende *in vitro* bioassays toegepast op extracten van de verschillende locaties en posities in de zuiveringsmoerassen:

Bepaling van de algemene toxiciteit voor de cellen (MTT assay):

Ter karakterisering van de giftigheid van de extracten en om de specifieke assays bij een niet-toxische concentratie uit te kunnen voeren, is de groeiremming van blootgestelde cellen vastgesteld. In de zogenoemde MTT-toets wordt de algemene toxiciteit van de watermonsters uitgedrukt als het percentage groeiremming van de cellen na 24 uur blootstelling aan waterextract. De groeiremming wordt gemeten door toevoeging van het substraat MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) dat door vitale cellen wordt omgezet in het blauwe formazan dat neerslaat in de cellen. De productie van deze blauwe neerslag wordt kwantitatief gemeten en de mate van omzetting is direct gerelateerd aan de hoeveelheid levende, vitale cellen. De hoeveelheid omzetting die bij niet-blootgestelde cellen werd op 100% gesteld (= 0% groeiremming)

Na deze bepaling van de algemene toxiciteit zijn er een aantal specifieke reporter gen assays uitgevoerd. Het principe van reporter gen assays is dat activatie van een specifieke receptor door stoffen resulteert in de productie van het enzym luciferase. Hiervoor worden genetisch gemodificeerde zoogdiercellen gebruikt, uitgerust met hormoon-specifieke receptoren en een stukje herkenning DNA voor deze receptoren gekoppeld aan een gen coderend voor het enzym luciferase afkomstig van de vuurvlug. De hoeveelheid gevormd luciferase wordt gemeten door toevoeging van het substraat luciferine waarbij via een biochemische reactie licht wordt geproduceerd. De hoeveelheid gemeten licht is evenredig aan de toxische potentie van de mix van in het extract aanwezige stoffen waaraan de cellen zijn blootgesteld

De volgende *in vitro* reporter gen assays zijn uitgevoerd:

ER-Luc voor estrogene activiteit:

Deze assay wordt uitgevoerd in U2OS-cellen, oorspronkelijk humane bontumorcellen, voorzien van de estrogen receptor alpha (ER α) plus het ERE-Luciferase construct. Activatie van de receptor wordt uitgedrukt relatief ten opzichte van het vrouwelijke geslachtshormoon 17 β -estradiol. Blootstelling is gedurende 24 uur in celkweek medium zonder natuurlijke hormonen.

AR-Luc voor androgene activiteit:

Ook dit is een test uit de groep van reporter gen assays. In dit geval gaat het om T47D-AR cellen, humane borstkankercellen waarin de receptor voor het mannelijk geslachtshormoon aldosteron is ingebracht plus het ARE-Luciferase construct. Activatie van de receptor wordt uitgedrukt relatief ten opzichte van het mannelijke geslachtshormoon aldosteron. Blootstelling is gedurende 24 uur in celkweek medium zonder natuurlijke hormonen.

TR-Luc voor schildklierhormoon verstorende activiteit:

Deze reporter gen assay maakt gebruik van GH3-cellen, cellen uit een hypofysetumor van een rat, met natuurlijke schildklierhormoon receptoren plus het TRE-Luciferase construct. Activatie van de receptor wordt uitgedrukt relatief ten opzichte van het schildklierhormoon triiodothyronine (T3). Blootstelling is gedurende 24 uur in celkweek medium zonder natuurlijke hormonen.

DR-Luc voor dioxine-achtige en PAK-achtige activiteit:

Reporter gen assay op basis van de natuurlijke AhR (arylhydrocarbon receptor, ook wel dioxine receptor genoemd) uit H4IIE-cellen (rattenlever tumorcellen) plus een DR-Luc reporter construct. Deze H4IIE cellen bezitten nog het vermogen om milieuvreemde stoffen af te breken waardoor de assay op twee verschillende manieren gebruikt kan worden. Om de zeer stabiele stoffen te bepalen die vrijwel niet afbreekbaar zijn wordt 48 uur blootgesteld. Hierdoor geven alleen de echte dioxine-achtige stoffen een signaal. Wanneer de cellen slechts 6-8 uur worden blootgesteld reageren de cellen ook sterk op poly-aromatische koolwaterstoffen (PAK's). Bij de 48-uurs blootstelling zijn eventuele effecten van PAK's nagenoeg verdwenen en blijft alleen het signaal van dioxines en verwante stabiele stoffen (bv PCB's) over. In de 6-uurs bepaling werd benzo(a)pyreen (BaP) gebruikt als referentie standaard, in de 48-uurs meting was dit 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

CEPIA-bepaling:

De CEPIA ("Cellular Efflux Pump Inhibition Assay") is een nieuwe test die aangeeft of stoffen het vermogen van cellen om binnendringende vreemde stoffen actief uit te scheiden remmen. Vooral cellen uit weefsel die in contact staan met de 'buitenwereld' bezitten dit vermogen, bijvoorbeeld kieuwcellen van waterorganismen en darm- of nier cellen. De test wordt uitgevoerd met cellen uit een hondennier (MDCK) die zodanig gemodificeerd zijn dat ze een groter aantal cellulaire pompjes hebben dan gebruikelijk waardoor remming beter kwantificeerbaar is. Verapamil, een stof gebruikt bij kankertherapie om te voorkomen dat tumorcellen tijdens een chemokuur de geneesmiddelen uitscheiden, wordt als referentiestandaard gebruikt. Remming van de effluxpompjes kan leiden tot hogere concentraties in de cel van andere stoffen die als ze uitgescheiden zouden zijn geen of veel minder effect gehad zouden hebben. De stof Calceïn-AM wordt gebruikt als indicator stof. Deze stof wordt alleen in de cel omgezet in een fluorescerende stof, niet daarbuiten. De mate van fluorescentie is een maat voor blokkering van de pompjes na blootstelling aan het extract gedurende 1 uur.

Pharma-test 1 en 2:

In deze test wordt de toxiciteit bepaald van de extracten voor een tweetal bacteriestammen: 1) *Kocuria rhizophila*, een grampositieve bacterie die vooral gevoelig is voor antibiotica uit de groep van de β -Lactams waartoe ook penicilline behoort; 2) *Bacillus cereus*, eveneens een grampositieve bacterie die vooral gevoelig is voor tetracycline-achtige antibiotica.

In deze test in 96-wells platen worden de bacteriën gedurende 24 uur blootgesteld aan de waterextracten. De remming van de bacterie vitaliteit wordt vergeleken met het effect van respectievelijk penicilline en tetracycline. De twee groepen antibiotica zijn gekozen op basis van het verbruik in Nederland.

De resultaten van al deze testen worden uitgedrukt als equivalenten van de standaardstoffen voor de verschillende testen, meestal uitgedrukt als concentratie per liter water of als totale hoeveelheid in het geëxtraheerde monster.

2.3 Materiaal en methoden

Monsterbereiding:

Gedurende de looptijd van het WIPE-project zijn op regelmatige tijdstippen watermonsters genomen van ongeveer 20 liter. Deze monsters zijn door de afdeling Milieu van IMARES geëxtraheerd over kolommen gevuld met XAD[®]-hars, waarna de geabsorbeerde stoffen met behulp van organische oplosmiddelen konden worden verzameld en geconcentreerd. Ongeveer 1/3 van het uiteindelijke extract is gebruikt voor de *in vitro* experimenten bij de Leerstoelgroep Toxicologie van Wageningen Universiteit. Voordat de extracten werden gebruikt in *in vitro* proeven werd eerst het oplosmiddel vervangen door dimethylsulfoxide (DMSO) aangezien dit minder toxisch is voor de gebruikte cellen.

De assays werden allen uitgevoerd in 96-wells platen volgens eerder beschreven methoden:

Bepaling van de algemene toxiciteit voor de cellen (MTT assay):

Hamers T, Smit MGD, Murk AJ and Koeman JH (2001). Biological and chemical analysis of the toxic potency of pesticides in rainwater. *Chemosphere*, 45:4, 495-510.

ER-Luc voor estrogene activiteit:

Murk AJ, J. Legler, M.M.H. van Lipzig, J.H.N. Meerman, A.C. Belfroid, A. Spenkeliink, G.B.J. Rijs, A.D. Vethaak (2002). Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environ. Toxicol. and Chem.* 21:1: 16-23

AR-Luc voor androgene activiteit:

Blankvoort, BMG, RJT Rodenburg, AJ Murk, JH Koeman, R Schilt and JMMJG Aarts (2005). Androgen activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: indications for mixture effects. ETAP 19, 263-272.

TR-Luc voor schildklierhormoon verstorende activiteit:

Freitas J., P Cano, C Craig-Veit, ML Goodson, JD Furlow, AJ Murk (2010). Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable *in vitro* reporter gene assay. Toxicology *in vitro* 25 (2011) 257–266

DR-Luc voor dioxine-achtige en PAK-achtige activiteit:

Murk AJ, Leonards PEG, Van Hattum B, Luit R, Van der Weiden MEJ, Smit M. (1998). Application of biomarkers for exposure and effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in naturally exposed European otters (*Lutra lutra*). Env. Toxicol. and Pharmacol. 6, 91-102

Hamers T, Schaardenburg MD van, Felzel EC, Murk AJ and JH Koeman (2000). The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. Sci. Total Environ. 262, 159-174.

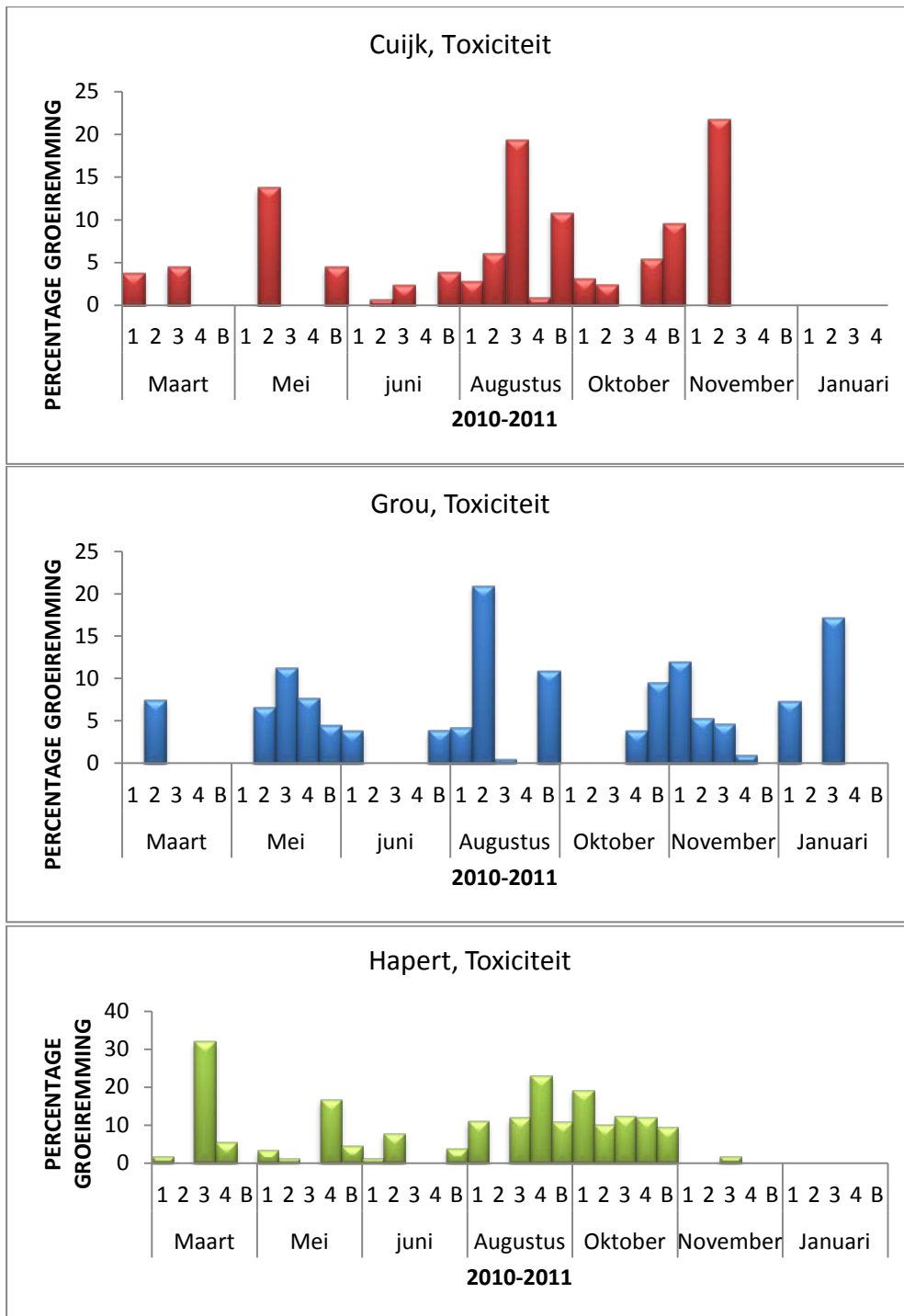
CEPIA-bepaling:

Georgantzopoulou, A, JHJ van den Berg, W Brand, E Skoczynska, IMCM Rietjens, AJ Murk. Fast Small-Scale Cellular Efflux Pump Inhibition Assay (CEPIA) for Assessment of Environmental Contaminants that Interfere with Efflux Pumps. Submitted.

2.4 Resultaten

De algemene cytotoxiciteit (MTT-bepaling):

De acute toxiciteit in de extracten is over het algemeen vrij laag, minder dan 10% remming van de vitaliteit in de MTT assay (Figuur 2-1). Eventuele toxiciteit verdwijnt gedurende het verblijf in het zuiveringsmoeras.



Figuur 2-1: Toename van de cel vitaliteit, weergegeven als groeiremming, is een indicatie voor verhoogde toxiciteit

Omdat de watermonsters een tijdsopname geven zijn in Tabel 2-1 de gemiddelde en mediane toxiciteit over de 7 meetperioden gegeven per positie in ieder zuiveringsmoeras. Het meest valt op dat de toxiciteit bij Hapert het hoogst is en geen afname in de tijd laat zien.

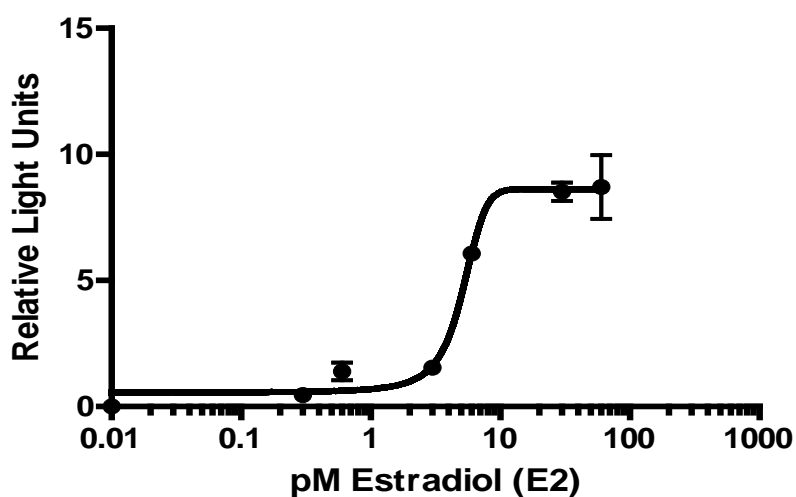
Tabel 2-1: Overzichtstabel cel-toxiciteits-verloop

Locatie	Opmerking	Pos.	% groeiremming		
			Gem.	Std.	Mediaan
Cuijk	Pieken in Toxiciteit zijn altijd uitgedempt op positie 4	1	1.4	1.8	0.0
		2	6.4	8.4	2.5
		3	3.8	7.1	0.0
		4	0.9	2.0	0.0
Grou	Pieken in Toxiciteit zijn altijd uitgedempt op positie 4	1	3.9	4.5	3.8
		2	5.8	7.5	5.4
		3	4.8	6.9	0.5
		4	1.8	3.0	0.0
Hapert	Geen vermindering Toxiciteit	1	5.3	7.3	1.9
		2	2.7	4.3	0.0
		3	8.3	11.9	1.9
		4	8.2	9.3	5.4

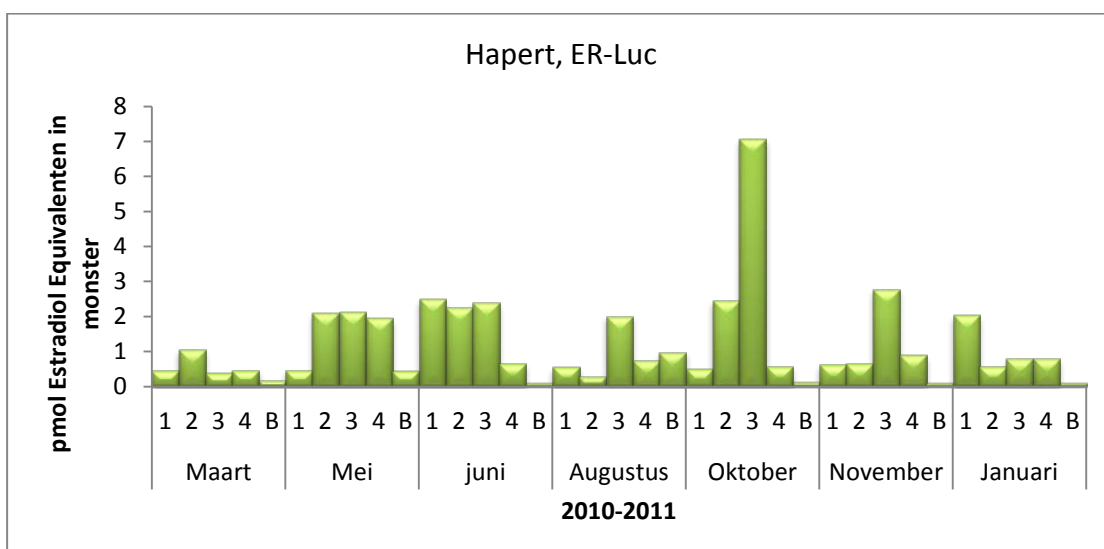
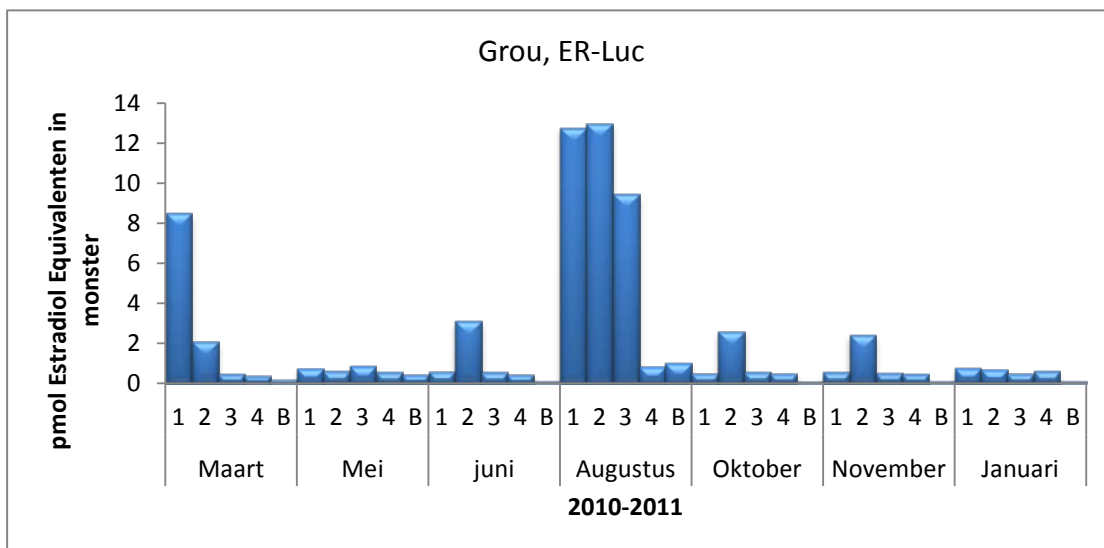
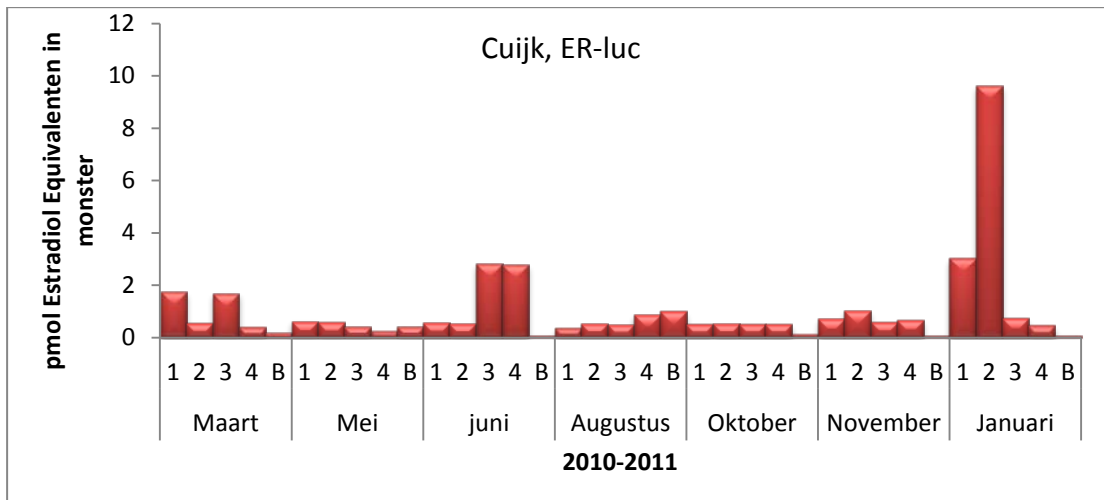
De ER-Luc bepaling:

In de ER-Luc assay kunnen estradiol equivalenten (EEQs) vanaf 1 pM worden gekwantificeerd (zie ijklijn in Figuur 2-2).

Standaard reeks Estradiol verdunningen
in U2OS-ER α -cellen



Figuur 2-2: Het natuurlijk hormoon 17 α -Estradiol (E2) wordt gebruikt om relatie tussen blootstelling en lichtproductie in de ER-Luc assay aan te tonen



Figuur 2-3: Meetresultaten voor de ER-Luc assay per locatie voor de gehele bemonsteringsperiode. Aangezien het aantal liters water per monster nagenoeg constant was zal ook een omrekening naar EEQ per liter het algehele beeld niet veranderen

De estrogeniteit in de watermonsters ligt gemiddeld per lokatie tussen 0,07 en 3,50 pmol EEQ/L en de patronen in de loop van de moerassen zijn min of meer karakteristiek voor de moerassen (Figuur 2-3).

In Cuijk is de estrogeniteit over het algemeen het laagst, zeker op positie 4. De estrogene input in januari 2011 is hoog, en opvallend is dat dit dan op positie 2 zelfs nog hoger wordt dan op positie 1. Op 3 en 4 is de estrogeniteit echter weer afgenomen tot de normale (relatief lage) waarde.

In Grou is de estrogeniteit soms relatief hoog, maar deze neemt altijd af naar posities 3 en 4. Vooral in augustus 2010 was er extreem hoge estrogene input. Soms is EEQ op locatie 2 hoger dan op locatie 1. Dit zou kunnen komen door het verdwijnen van antagonisten, maar wellicht ook door vogels die hormonen in het water inbrengen of doordat er zich algen ontwikkelen die phytoestrogenen bevatten.

In Hapert neemt de estrogeniteit altijd toe na positie 1. Over het algemeen is dit weer verdwenen op p4, behalve in mei.

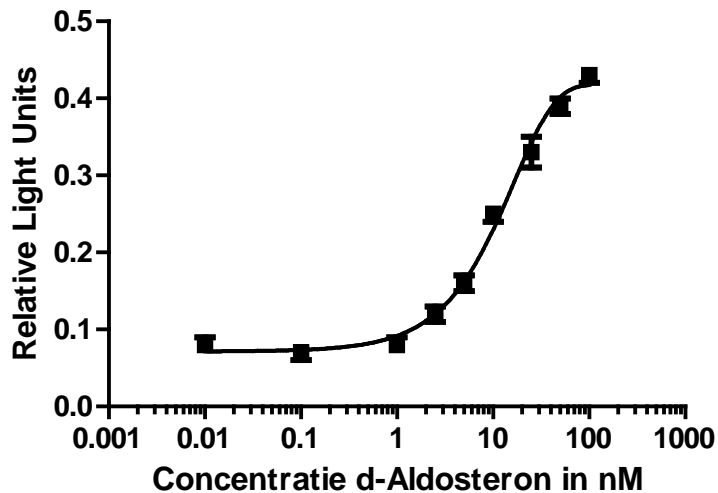
In Tabel 2-2 worden de gemiddelde en mediane estrogene potenties over de 7 meetperioden gegeven per positie in ieder zuiveringsmoeras. Ter vergelijking zijn er de EEQ waarden uit het LOES project aan toegevoegd.

Tabel 2-2: *Overzichtstabel EEQ-verloop over de zuiveringsmoerassen berekend als gemiddelde en als mediaan om de invloed van uitbijters te verminderen.*

Locatie	Opmerking	Pos.	pmol EEQ/L		
			Gem.	Std.	Mediaan
Cuijk	EEQ meestal laagst op p4. Input januari 2011 hoog (p2>p1)	1	1.09	0.97	0.64
		2	1.92	3.41	0.56
		3	1.05	0.90	0.61
		4	0.85	0.88	0.52
Grou	EEQ conc. p1 > bij C en H P2 hoger dan op 1 Augustus 2010 hoog (& t/m 3) Altijd lager op locaties 3 en 4	1	3.50	5.03	0.75
		2	3.51	4.29	2.43
		3	1.84	3.35	0.54
		4	0.55	0.15	0.51
Hapert	Op posities 2&3 altijd > 1 Meestal weer afname op p4 Niet altijd lager op p4 (mei).	1	1.03	0.86	0.57
		2	1.34	0.91	1.06
		3	2.52	2.19	2.14
		4	0.88	0.49	0.77
LOES	oppervlaktewater mediaan regenwater mediaan effluent mediaan sloot bioindustrie gebied		0.07		
			0.13		
			0.90		
			0.74		

De AR-Luc bepaling:

In de AR-Luc bepaling kunnen aldosteron-equivalenties vanaf 1 pM worden gekwantificeerd (Figuur 2-4).



Figuur 2-4: Het natuurlijk hormoon aldosteron wordt gebruikt om relatie tussen blootstelling en lichtproductie in de AR-Luc assay aan te tonen

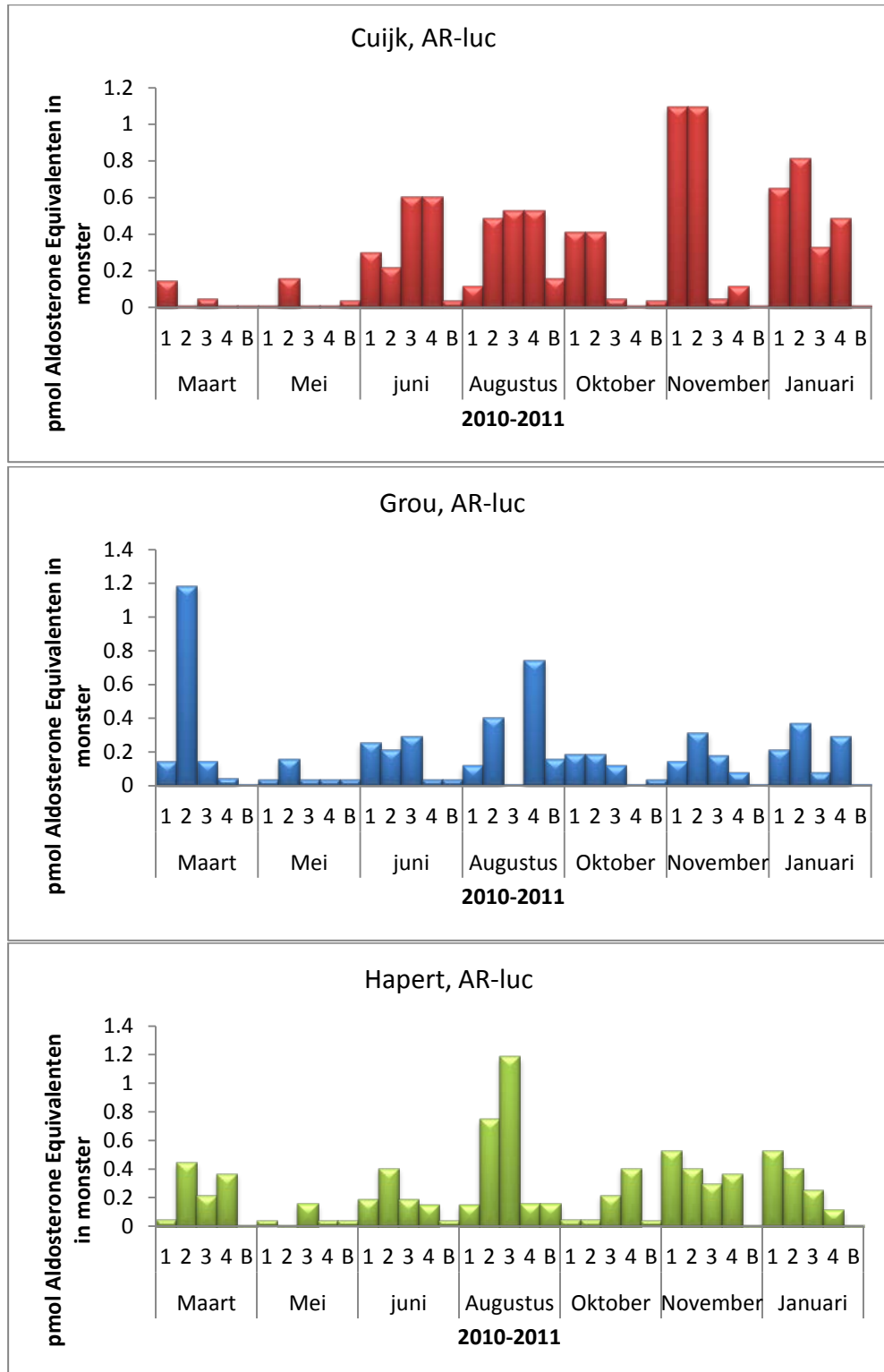
In de Tabel 2-3 worden de gemiddelde en mediane androgene potenties over de 7 meetperioden gegeven per positie in ieder zuiveringsmoeras.

Ter vergelijking zijn er de AEQ waarden uit het LOES project aan toegevoegd. De waarden van de effluënten zijn hoger dan die gemeten in het LOES project maar in dezelfde orde van grootte als de AEQs in de meest belaste rivier destijds (Maas). Alleen in influënten van farmaceutische bedrijven en ziekenhuizen werden in het LOES project (veel) hogere gehalten aangetroffen (Blankvoort *et al.*, 2005).

Tabel 2-3: Overzichtstabel AR-Luc

Locatie	Opmerking	Pos.	nmol AEQ/L water	
			Gem.	Mediaan
Cuijk	Hoger dan andere 2 Verwijdering OK	1	0.08	0.06
		2	0.09	0.08
		3	0.05	0.01
		4	0.06	0.03
Grou	Positie 2 hoogst 1 & 4 zelfde	1	0.03	0.03
		2	0.09	0.07
		3	0.03	0.02
		4	0.04	0.01
Hapert	positie 2 & 3 hoogst 1 en 4 zelfde	1	0.05	0.03
		2	0.07	0.09
		3	0.08	0.05
		4	0.05	0.03
LOES	Alg. effluent < dl Industrieel afvalw. Eijsden		30-630 nmol/L 0.02 nmol AEQ/L	

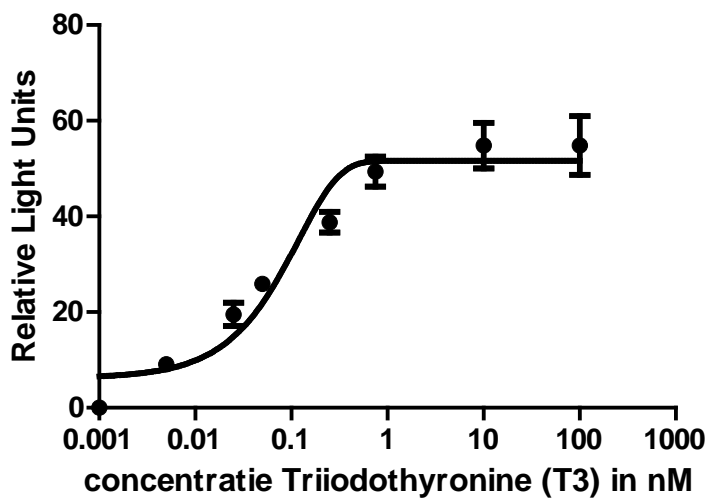
Op alle locaties neemt de androgene activiteit van het afvalwater neemt af tijdens de gang door het moeras (Figuur 2-5).



Figuur 2-5: Meetresultaten voor de AR-Luc assay per locatie gedurende de gehele bemonsteringsperiode.

De TR-Luc bepaling:

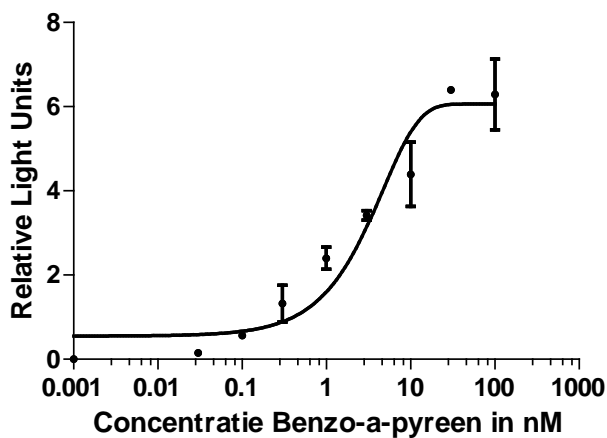
In de TR-Luc assay is detectielimiet voor de positieve controle T3 (triiodothyronine; de actieve vorm van het schildklierhormoon) ongeveer 0,01 nM (Figuur 2-6) wat bij de gebruikte verdunning overeenkomt met 0,002 tot 0,03 nmol T3-equivalenten /L. Geen enkele van de geëxtraheerde watermonsters gaf een resultaat dat boven deze detectielimiet. De extractie methode was echter niet ontwikkeld of geëvalueerd voor schildklierhormoonreceptor gemedieerde werking, dus is op dit moment nog niet te zeggen of dergelijke schildklierhormoon verstorende stoffen niet aanwezig zijn in het zuiveringsmoeras of niet mee geëxtraheerd zijn.



Figuur 2-6: Het natuurlijk schildklierhormoon triiodothyronine (T3) wordt gebruikt om relatie tussen blootstelling en lichtproductie in de TRE-luc assay aan te tonen

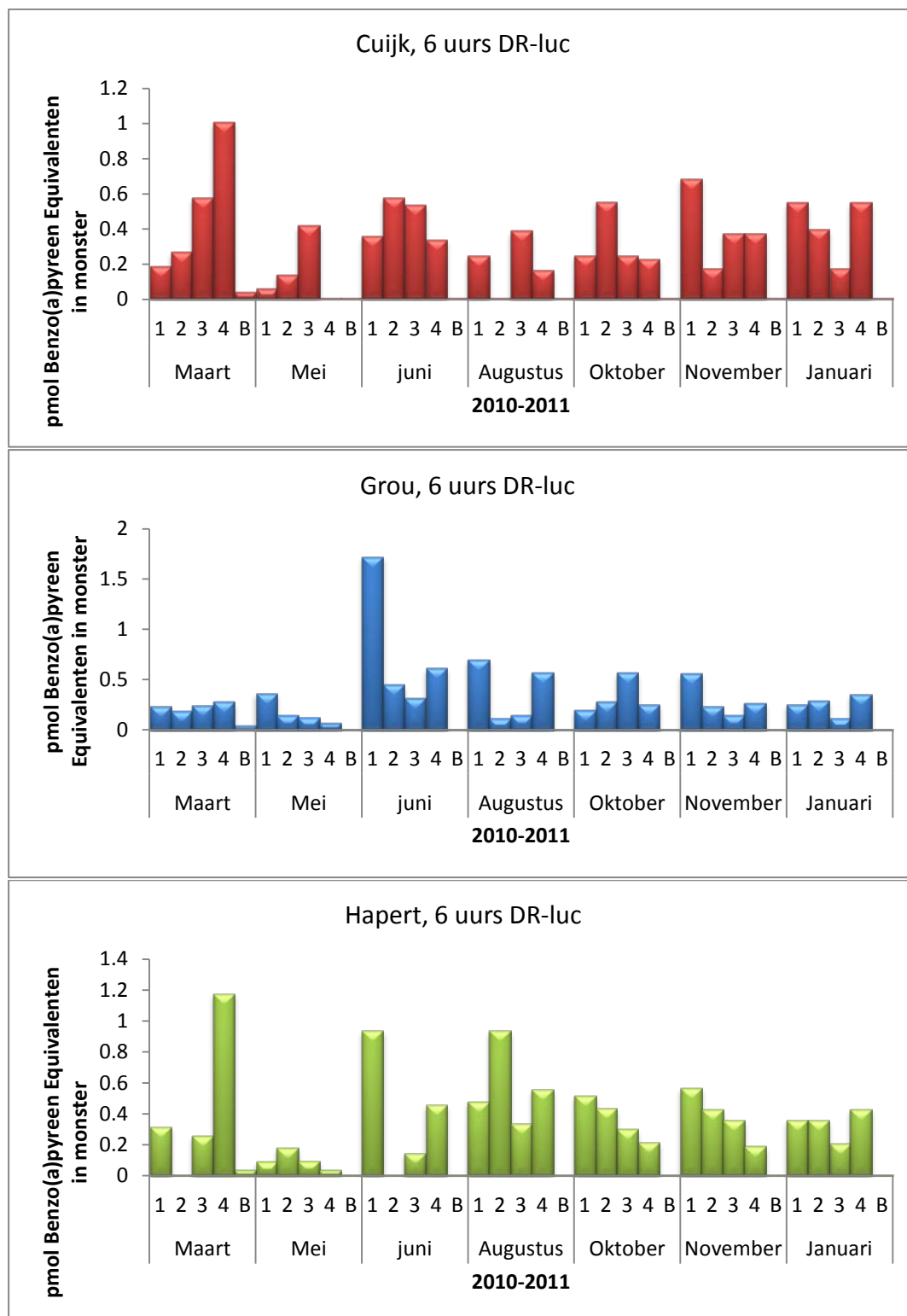
De DR-Luc bepaling na 6 uur blootstelling:

Na 6 uur geeft de DR-Luc vooral respons op PAK-Achtige stoffen die makkelijk afbreekbaar zijn. De detectielimiet voor de referentiestof BaP is ongeveer 0,02 nM, voor het watermonster in de gebruikte verdunning 0,002 nmol/L.



Figuur 2-7: In de 6-uurs DR-Luc fungeert Benzo-a-pyreen als positieve controle en als referentiestof

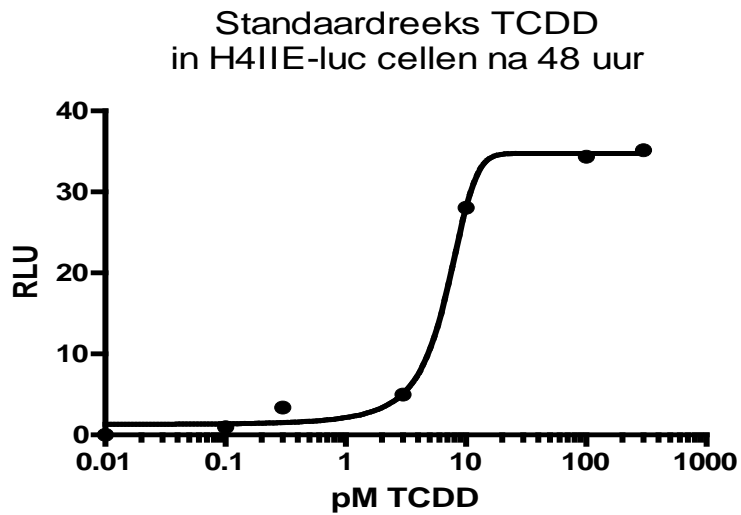
De DR-Luc responsen laten geen duidelijk patroon over de moerassen zien (Figuur 2-8). Wel zijn er uitschieters gevonden. De verwachting is dat in sedimentmonsters een grotere BEQ-activiteit zal worden aangetroffen aangezien dergelijke stoffen een relatief hoge LogK_{ow} hebben en dus niet vrij in het water aanwezig zijn.



Figuur 2-8: Meetresultaten voor de 6-uurs DR-Luc assay per locatie voor de gehele bemonsteringsperiode.

De DR-Luc bepaling na 48 uur blootstelling:

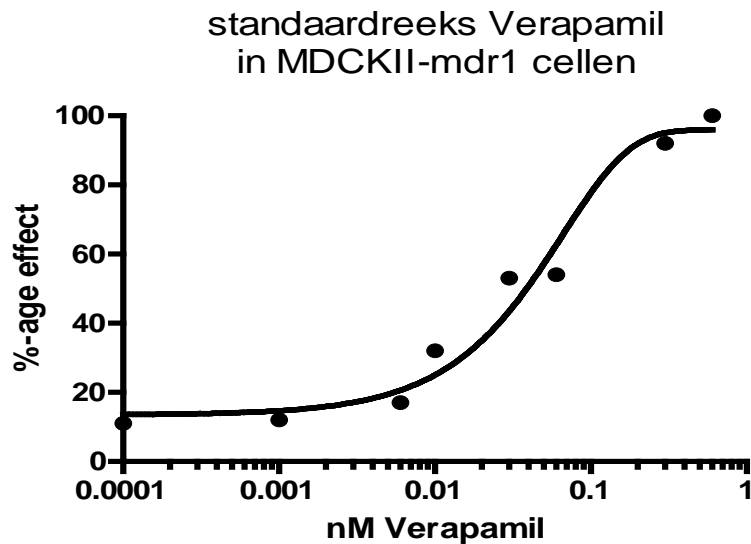
In de extracten van de watermonster uit het moeras was geen dioxine-achtige toxische potentie waarneembaar, behalve bij één van de monsters van Grou positie 1 (signaal dat net boven de waarnemingsgrens van 0,002 tot 0,05 pmol/L lag). Het is echter niet te verwachten dat er in watermonsters veel dioxine-achtige stoffen aanwezig zijn. In het LOES project waren ook sedimenten geanalyseerd, en daar werden wel, soms hoge, activiteiten van dioxine-achtige stoffen aangetroffen (Legler *et al.*, 2006).



Figuur 2-9: In de 48-uurs DR-Luc assay wordt 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) gebruikt als referentie stof voor het meten van de relatieve licht productie (RLU)

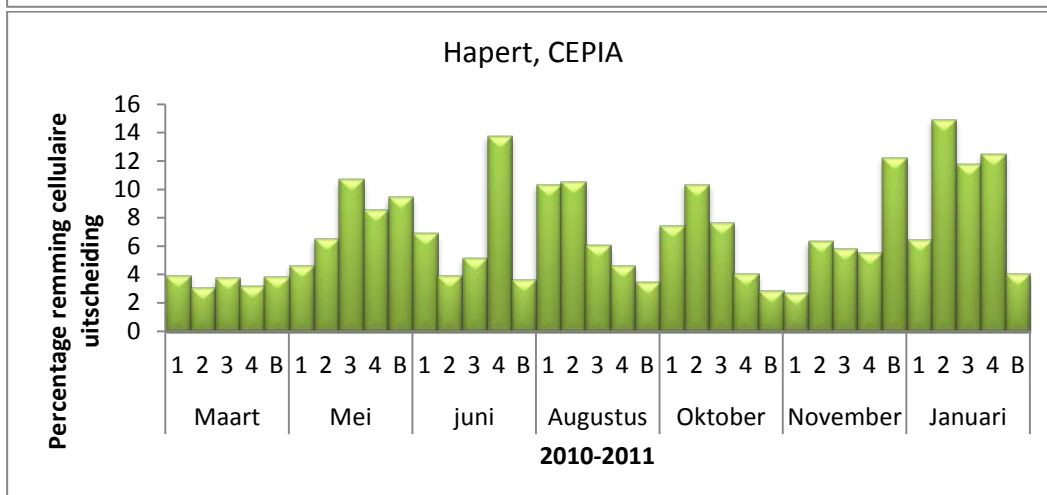
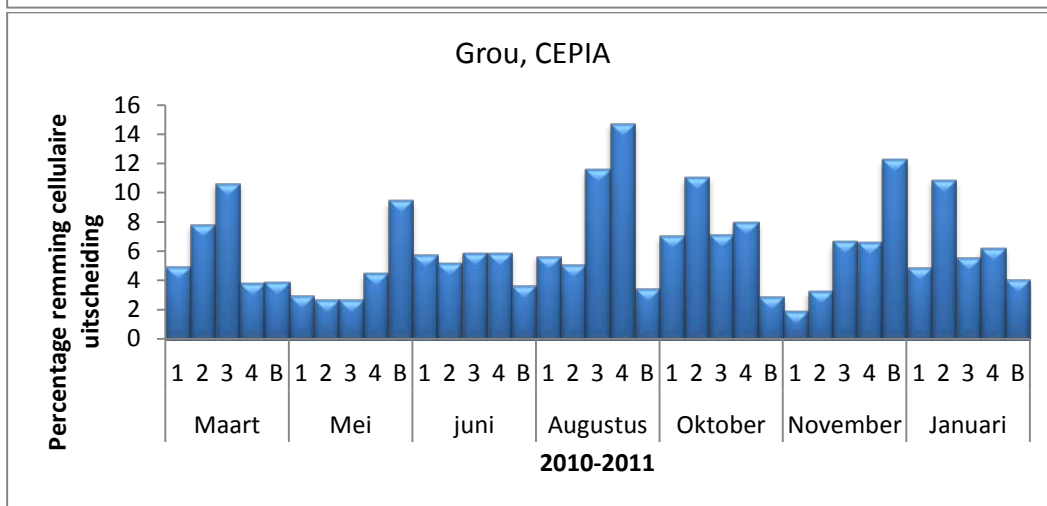
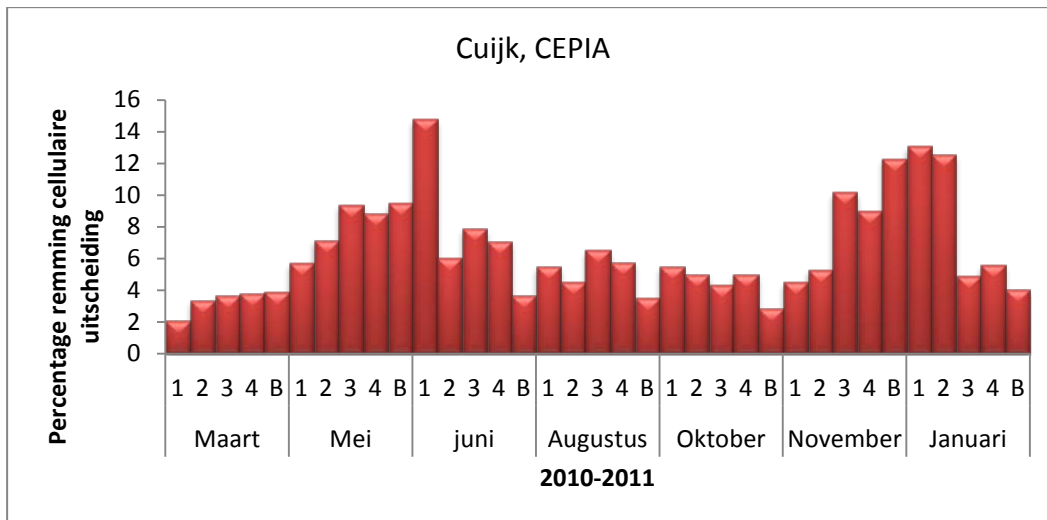
De CEPIA bepaling

Figuur 2-10 toont een dosis-respons relatie van remming van de cellulaire efflux pompjes door de referentiestof Verapamil. Van diverse milieucontaminanten en bepaalde nanoparticles is aangetoond dat ze nog sterkere remming geven in de zogenomede CEPIA (cellulaire efflux pomp inhibitie assay) (Georgantzopoulou *et al.*, submitted; Anselmo *et al.*, submitted).



Figuur 2-10: Als referentie stof voor het meten van de remming van intercellulaire efflux pompjes wordt Verapamil gebruikt. Het percentage effect is hierbij gelijk aan het percentage gemeten remming.

Ook diverse waterextracten remden de werking van de cellulaire efflux pompjes, maar er was geen duidelijke relatie met de locatie in het moeras of het signaal nam juist toe naar het einde van het moeras. Het is nog niet duidelijk of dit komt door het verdwijnen van antagonisten of het verschijnen van meer gecompliceerde natuurlijke organische stoffen. Voor deze relatief nieuwe assay moet nog worden onderzocht vanaf welk percentage remming het effect ecotoxicologisch relevant wordt.



Figuur 2-11: Meetresultaten voor de CEPIA assay per locatie voor de gehele bemonsteringsperiode, uitgedrukt als percentage remming cellulaire uitscheiding

Pharma-1 en Pharma-2 bepaling:

Deze assays zijn ontwikkeld voor 96-wells platen en blijken specifiek gevoelig voor hun eigen antibioticum. De bacterie stammen *K.rhizophila* en *B. cereus* zijn specifiek gevoelig voor blootstelling aan respectievelijk

Tetracycline en Penicilline. De concentraties in de watermonsters bleken in alle gevallen beneden de detectie grens te liggen.

2.5 Discussie

De resultaten van het *in vitro* onderzoek laten zien dat er sprake is van grote variatie in respons in de tijd, hoewel elk moeras toch wel een karakteristiek gemiddeld respons patroon laat zien. Voor vrijwel alle eindpunten neemt de toxische potentie af in de loop van het moeras, en meest opvallend is het bufferende vermogen door de moerassen in die gevallen waar op posities 1 en 2 een relatief grote toxiciteit optreedt. Hierdoor bereikt de toxiciteit niet het oppervlaktewater.

De gemeten estrogene activiteit van het effluent (positie 1) ligt in dezelfde orde van grootte als die van het LOES project (Landelijk Onderzoek Estrogene Stoffen) waar deze in effluent 0,2-9,5 (mediaan 0,9) pmol EEQ/L was (Vethaak *et al.*, 2005). De mediane concentratie in het oppervlaktewater (0,07 pmol EEQ/L, max 0,61 pmol/L) en in regenwater (mediaan 0,13, maximaal 0,22 pmol/L) liggen lager. De concentraties EEQ's van water op de posities 1 liggen gemiddeld ongeveer 2x lager dan in het LOES project. Aangezien de zuiveringsmethoden niet sterk zijn veranderd sindsdien mag verwacht worden dat dit verschil komt door een iets lagere extractie-efficiëntie in deze studie. De in dit onderzoek gebruikte extractie methode was anders dan in het Loes project. De LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) na 4 dagen voor luciferase inductie in transgene zebravissen was 50 pmol ethinylestradiol/L (No Observed-Effect Concentration was 10 pmol EE2/L) en 100x meer voor estradiol (Legler *et al.*, 2006). Hoewel beide stoffen dezelfde estrogene potentie *in vitro* hadden was EE2 veel potenter *in vivo* vanwege de grotere persistentie. Aangezien het grootste deel van de *in vitro* EEQ's in effluent afkomstig is van EE2, niet van E2, wordt als veilige waarde 10 pmol EEQ/L water aangehouden. Zonder correctie voor het mogelijke verschil in extractie efficiëntie lag de estrogene potentie van het effluent op positie 1 van Grou bij 2 van de 7 bemonsteringen boven of dicht tegen de NOEC waarde aan. De effluënten op positie 4 hebben een EEQ van gemiddeld 0,5 – 0,9 pmol EEQ/L, dus onder de NOEC voor estrogene effecten in vis.

Het zuiveringsmoeras draagt vooral bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent in Grou tijdens de episodes met sterk verhoogde estrogene activiteit op positie 1 (in maart en augustus 2010). Het zuiveringsmoeras verlaagt in die gevallen de EEQ's met een factor 22 en 15 respectievelijk. Bij Grou is de reductie van estrogene potentie 7x. Bij Cuijk en Hapert zijn de resterende estrogene potenties in het effluent vrij consequent relatief laag, maar incidentele pieken worden efficiënt verwijderd. In Hapert valt op dat op posities 2 en 3 regelmatig de estrogene potentie toeneemt om daarna weer af te nemen naar positie 4. Het is de vraag of de toename komt doordat antagonisten uit het afvalwater worden afgebroken, of dat bv eventueel aanwezige vogels estrogene stoffen via hun ontlasting toevoegen aan het moeraswater.

In de zuiveringsmoerassen zijn ook androgene stoffen aanwezig. De AEQ waarden van de effluënten zijn hoger dan die gemeten in het LOES project maar in dezelfde orde van grootte als de AEQs in de meest belaste rivier destijds (Maas). Alleen in influënten van farmaceutische bedrijven en ziekenhuizen werden in het LOES project (veel) hogere gehalten aangetroffen (Blankvoort *et al.*, 2005).

Een belangrijke kanttekening is dat *in vitro* assays alleen effecten van stoffen gemeten worden die daadwerkelijk in het extract terecht komen. De meer lipofiele stoffen zullen niet in het water aanwezig zijn maar gebonden aan deeltjes in het sediment en enigszins aan zwevend stof (Legler *et al.*, 2003). De meeste daarvan zijn nu niet meegenomen in de extractie van water. Tijdens de eerste pilot is gewerkt met POCIS samplers en in de extracten daarvan is meer toxiciteit gevonden. Nadeel van deze samplers is dat niet bekend is met hoeveel water het verzamelde extract overeen komt en dat deze in de loop van de tijd deze filters dichtslibben.

Voor het optimaliseren van het zuiveringsmoeras heeft het geen zin om te zoeken naar nog meer bacteriële afbraak of vervluchtiging, want dat is tijdens het zuiveringsproces al heel efficiënt gebeurd. Mogelijk zouden andere afbraakroutes geïntroduceerd moeten worden om de stoffen die de zuivering hebben overleefd alsnog af te breken. Dit zou mogelijk met UV (uit natuurlijk zonlicht?) kunnen, omdat UV nog niet is toegepast tijdens het zuiveringsproces. De radicale metabolieten die vrijkomen zullen snel reageren met in de het afvalwater aanwezige organische stoffen.

2.6 Conclusies en aanbevelingen

- Zuiveringsmoerassen bufferen de incidentele toxiciteit in het effluent dat de zuiveringsmoerassen ingaat waardoor dit niet het oppervlaktewater bereikt.
- Het effluent bij Grou is relatief estrogeen, en hier wordt de grootste reductie bereikt in het zuiveringsmoeras.
- In het waterextract is weinig dioxine-achtige, PAK-achtige en schildklierhormoonverstorende activiteit aanwezig.
- Voor waterextracten zijn de algemene cytotoxiciteit en de estrogeniteit waarden de meest relevante *in vitro* eindpunten.

Voor *in vitro* testen in de toekomst is het aan te bevelen om ook het sediment en zwevend stof te extraheren en POCIS extractie met het water uit te voeren omdat hiermee meer lipofiele microverontreinigingen worden verzameld.

2.7 Referenties

Blankvoort, BMG, RJT Rodenburg, AJ Murk, JH Koeman, R Schilt and JMMJG Aarts (2005). Androgen activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: indications for mixture effects. ETAP 19, 263-272.

Hamers T, PJ van den Brink, L Mos, S van den Linden, JH Koeman and Murk AJ, (2003). Estrogenic and esterase inhibiting potency in rainwater in relation to pesticide concentrations, sampling season and location. Environmental Pollution, 123/1 pp. 47-65.

Legler, J., Leonards, P., Spenklink, A., Murk AJ (2003). In vitro biomonitoring in solid phase matrices reveals the presence of unknown compounds with estrogenic activity. Ecotoxicology, 12: 239-249.

Legler J, Bulder AS, De Voogt P, De Boer J, Schrap M and Murk AJ (2006). Bioanalysis of estrogenic and dioxin-like activity in field samples. In: Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment: An integrated approach for field monitoring and effect assessment Vethaak D., Schrap M and de Voogt P (eds). SETAC-scientific book 978-1-880611-85-2, 512 p.

Legler J, M van der Zee, LTM van der Ven, CCH Jonkers, AD Vethaak, B van der Burg and AJ Murk (2006). The in vivo transgenic zebrafish reporter gene assay for bioanalysis of exposure and effects of estrogenic chemicals in the aquatic environment. In: Estrogens and xeno-1 estrogens in the aquatic environment: An integrated approach for field monitoring and effect assessment Vethaak D., Schrap M and de Voogt P (eds). SETAC-scientific book, ISBN 978-1-880611-85-2, 512 p.

Murk AJ, J. Legler, M.M.H. van Lipzig, J.H.N. Meerman, A.C. Belfroid, A. Spenklink, G.B.J. Rijs, A.D. Vethaak (2002). Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. Environ. Toxicol. and Chem. 21:1: 16-23

Vethaak AD, J Lahr, SM Schrap d, AC. Belfroid,GB.J. Rijs, A Gerritsen, J de Boer, AS. Bulder, GCM Grinwis, RV Kuiper, J Legler, AJ Murk, W Peijnenburg g, HJM Verhaar, P de Voogt. (2005). An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59: 511–524.

Overzicht van de gemeten monsters					G= Grou, H = Hapert, C = Cuijk, B = blanco monster								
locatie	dag	maand	jaar	MTT % groei- remming per L	ER-luc pmol EEQ/L	6-uurs DR- luc nmol BaPEQ/L	48-uurs DR- luc pmol TEQ/L	TRE-luc nmol T3EQ/L	AR-luc nmol AEQ/L	CEPIA% remming per L	Pharma 1-β- Lactams nmol PenicilineEQ/L	Pharma 2- Tetracyclines pmol TetracyclineEQ/L	
G	1	22	3	10	0.0	1.77	0.050	0.07	<0.002	0.314	0.88	<1.5	<1.0
G	2	22	3	10	1.6	0.44	0.040	<0.001	<0.008	0.618	1.44	<1.5	<1.0
G	3	22	3	10	0.0	0.10	0.051	<0.0002	<0.002	0.308	1.92	<1.5	<1.0
G	4	22	3	10	0.0	0.08	0.060	<0.0002	<0.002	0.097	0.68	<1.5	<1.0
H	1	23	3	10	0.4	0.10	0.071	<0.001	<0.008	0.101	0.76	<1.5	<1.0
H	2	23	3	10	0.0	0.23	<0.002	<0.0002	<0.002	0.982	0.55	<1.5	<1.0
H	3	23	3	10	6.8	0.08	0.055	<0.05	<0.03	0.476	0.68	<1.5	<1.0
H	4	23	3	10	1.1	0.10	0.244	<0.001	<0.008	0.774	0.54	<1.5	<1.0
C	1	23	3	10	0.8	0.37	0.040	<0.001	<0.008	0.318	0.34	<1.5	<1.0
C	2	23	3	10	0.0	0.12	0.056	<0.0002	<0.002	<0.03	0.59	<1.5	<1.0
C	3	23	3	10	0.9	0.36	0.122	<0.001	<0.008	0.096	0.65	<1.5	<1.0
C	4	23	3	10	0.0	0.13	0.306	<0.0002	<0.002	<0.03	0.97	<1.5	<1.0
B		22	3	10	0.0	0.04	0.008	<0.0002	<0.002	<0.03	0.66	<1.5	<1.0
G	1	10	5	10	1.4	0.16	0.079	<0.001	<0.008	<0.03	0.51	<1.5	<1.0
G	2	10	5	10	2.4	0.13	0.032	<0.05	<0.03	<0.03	0.45	<1.5	<1.0
G	3	10	5	10	1.7	0.18	0.028	<0.001	<0.008	<0.03	0.47	<1.5	<1.0
G	4	10	5	10	0.8	0.11	0.015	<0.001	<0.008	<0.03	0.79	<1.5	<1.0
H	1	11	5	10	0.2	0.10	0.019	<0.001	<0.008	<0.03	0.83	<1.5	<1.0
H	2	11	5	10	0.0	0.44	0.038	<0.0002	<0.002	<0.03	1.20	<1.5	<1.0
H	3	11	5	10	3.5	0.45	0.021	<0.05	<0.03	<0.03	1.94	<1.5	<1.0
H	4	11	5	10	0.3	0.40	0.008	<0.001	<0.008	<0.03	1.54	<1.5	<1.0
C	1	11	5	10	0.0	0.13	0.013	<0.05	<0.002	<0.03	1.01	<1.5	<1.0
C	2	11	5	10	2.9	0.12	0.029	<0.05	<0.03	<0.03	1.27	<1.5	<1.0
C	3	11	5	10	0.0	0.09	0.085	<0.0002	<0.002	<0.03	1.67	<1.5	<1.0
C	4	11	5	10	0.0	0.05	0.002	<0.0002	<0.002	<0.03	1.64	<1.5	<1.0
B		10	5	10	0.9	0.09	<0.002	<0.0002	<0.008	<0.03	1.64	<1.5	<1.0
G	1	28	6	10	0.0	0.12	0.353	<0.0002	<0.002	0.530	1.00	<1.5	<1.0
G	2	28	6	10	0.0	0.69	0.100	<0.0002	<0.002	0.496	0.98	<1.5	<1.0
G	3	28	6	10	0.0	0.11	0.067	<0.0002	<0.002	0.618	1.04	<1.5	<1.0
G	4	28	6	10	0.9	0.09	0.127	<0.0002	<0.008	0.023	1.02	<1.5	<1.0
H	1	29	6	10	1.6	0.52	0.195	<0.001	<0.008	0.387	1.22	<1.5	<1.0
H	2	29	6	10	0.0	0.47	<0.002	<0.0002	<0.002	0.850	0.70	<1.5	<1.0
H	3	29	6	10	0.0	0.51	0.032	<0.0002	<0.002	0.393	0.93	<1.5	<1.0
H	4	29	6	10	2.2	0.14	0.093	<0.05	<0.03	0.305	2.45	<1.5	<1.0
C	1	29	6	10	0.0	0.12	0.076	<0.001	<0.002	0.626	2.74	<1.5	<1.0
C	2	29	6	10	0.1	0.11	0.120	<0.001	<0.008	0.463	1.06	<1.5	<1.0
C	3	29	6	10	0.5	0.58	0.111	<0.001	<0.008	1.258	1.40	<1.5	<1.0
C	4	29	6	10	0.0	0.58	0.071	<0.0002	<0.002	1.273	1.27	<1.5	<1.0
B		28	6	10	0.8	<0.02	<0.002	<0.001	<0.008	<0.03	0.62	<1.5	<1.0
G	1	16	8	10	4.3	2.61	0.143	<0.05	<0.03	0.236	1.00	<1.5	<1.0
G	2	16	8	10	0.1	2.83	0.026	<0.001	<0.008	0.893	0.96	<1.5	<1.0
G	3	16	8	10	0.0	1.97	0.031	<0.0002	<0.002	0.023	2.10	<1.5	<1.0
G	4	16	8	10	0.0	0.18	0.121	<0.0002	<0.002	0.397	2.77	<1.5	<1.0
H	1	17	8	10	0.0	0.12	0.100	<0.0002	<0.002	0.315	1.90	<1.5	<1.0
H	2	17	8	10	2.5	0.06	0.194	<0.05	<0.03	0.385	1.90	<1.5	<1.0
H	3	17	8	10	4.6	0.40	0.068	<0.05	<0.03	0.591	1.04	<1.5	<1.0
H	4	17	8	10	3.9	0.15	0.112	<0.05	<0.03	<0.03	0.78	<1.5	<1.0
C	1	17	8	10	0.6	0.08	0.052	<0.001	<0.008	0.242	0.98	<1.5	<1.0
C	2	17	8	10	1.2	0.11	<0.002	<0.001	<0.008	0.986	0.77	<1.5	<1.0
C	3	17	8	10	3.9	0.10	0.079	<0.05	<0.03	1.066	1.13	<1.5	<1.0
C	4	17	8	10	0.2	0.19	0.036	<0.001	<0.008	1.107	1.05	<1.5	<1.0
B		16	8	10	2.2	0.00	<0.002	<0.05	<0.03	<0.03	0.58	<1.5	<1.0
G	1	4	10	10	0.0	0.12	0.043	<0.0002	<0.002	0.406	1.33	<1.5	<1.0
G	2	4	10	10	0.0	0.56	0.060	<0.0002	<0.002	0.397	2.06	<1.5	<1.0
G	3	4	10	10	0.8	0.12	0.121	<0.001	<0.008	0.246	1.32	<1.5	<1.0
G	4	4	10	10	2.5	0.11	0.054	<0.05	<0.03	0.023	1.44	<1.5	<1.0
H	1	5	10	10	2.1	0.10	0.109	<0.05	<0.03	0.095	1.36	<1.5	<1.0
H	2	5	10	10	2.6	0.52	0.093	<0.05	<0.03	0.096	1.92	<1.5	<1.0
H	3	5	10	10	2.5	1.47	0.062	<0.05	<0.03	0.464	1.37	<1.5	<1.0
H	4	5	10	10	0.0	0.12	0.046	<0.0002	<0.002	0.859	0.71	<1.5	<1.0
C	1	5	10	10	0.6	0.11	0.052	<0.001	<0.008	0.856	0.98	<1.5	<1.0
C	2	5	10	10	0.5	0.11	0.115	<0.001	<0.008	0.846	0.87	<1.5	<1.0
C	3	5	10	10	0.0	0.11	0.052	<0.0002	<0.002	0.095	0.77	<1.5	<1.0
C	4	5	10	10	1.1	0.11	0.047	<0.001	<0.008	0.023	0.86	<1.5	<1.0
B		4	10	10	1.9	0.03	<0.002	<0.001	<0.008	<0.03	0.46	<1.5	<1.0
G	1	22	11	10	1.1	0.11	0.118	<0.001	<0.008	0.318	0.32	<1.5	<1.0
G	2	22	11	10	1.0	0.49	0.049	<0.001	<0.008	0.164	0.57	<1.5	<1.0
G	3	22	11	10	0.2	0.10	0.031	<0.001	<0.008	0.093	1.16	<1.5	<1.0
G	4	22	11	10	1.5	0.10	0.055	<0.001	<0.008	0.163	1.15	<1.5	<1.0
H	1	23	11	10	0.0	0.13	0.118	<0.0002	<0.002	1.094	0.46	<1.5	<1.0
H	2	23	11	10	0.4	0.14	0.091	<0.001	<0.008	0.871	1.17	<1.5	<1.0
H	3	23	11	10	0.0	0.57	0.073	<0.0002	<0.002	0.603	1.04	<1.5	<1.0
H	4	23	11	10	0.0	0.18	0.038	<0.0002	<0.002	0.743	0.96	<1.5	<1.0
C	1	23	11	10	0.0	0.16	0.150	<0.0002	<0.002	2.386	0.83	<1.5	<1.0
C	2	23	11	10	4.6	0.22	0.038	<0.05	<0.03	2.297	0.94	<1.5	<1.0
C	3	23	11	10	0.0	0.12	0.078	<0.0002	<0.002	0.093	1.82	<1.5	<1.0
C	4	23	11	10	0.0	0.14	0.079	<0.0002	<0.002	0.240	1.62	<1.5	<1.0
B		22	11	10	0.0	----	<0.002	<0.0002	<0.002	<0.03	2.14	<1.5	<1.0
G	1	10	1	11	0.0	0.16	0.055	<0.0002	<0.002	0.476	0.87	<1.5	<1.0
G	2	10	1	11	3.6	0.15	0.061	<0.05	<0.03	0.780	1.99	<1.5	<1.0
G	3	10	1	11	0.0	0.11	0.025	<0.0002	<0.002	0.165	0.98	<1.5	<1.0
G	4	10	1	11	0.0	0.12	0.074	<0.0002	<0.002	0.607	1.08	<1.5	<1.0
H	1	11	1	11	0.0	0.42	0.074	<0.0002	<0.002	1.084	1.13	<1.5	<1.0
H	2	11	1	11	0.0	0.12	0.074	<0.0002	<0.002	0.849	2.73	<1.5	<1.0
H	3	11	1	11	0.0	0.17	0.044	<0.0002	<0.002	0.538	2.14	<1.5	<1.0
H	4	11	1	11	0.0	0.16	0.088	<0.0002	<0.002	0.237	2.26	<1.5	<1.0
C	1	11	1	11	0.0	0.62	0.113	<0.0002	<0.002	1.343	2.35	<1.5	<1.0
C	2	11	1	11	0.0	1.97	0.082	<0.0002	<0.002	1.681	2.27	<1.5	<1.0
C	3	11	1	11	0.0	0.16	0.037	<0.0002	<0.002	0.690	0.87	<1.5	<1.0
C	4	11	1	11	0.0	0.09	0.114	<0.0002	<0.002	1.016	1.00	<1.5	<1.0
B		10	1	11	0.0	<0.02	<0.002	<0.0002	<0.002	<0.03	0.68	<1.5	<1.0
				detectie limiet		0.02	0.002	0.002-0.05	0.002-0.03	0.03		1.5	1.0

3 In-vivo bioassays resultaten van water extracten uit de rwzi-zuiveringsmoerassen

Edwin Foekema	IMARES, afdeling milieu
Andrea Sneekes	IMARES, afdeling milieu
Erika Koelemij	IMARES, afdeling milieu
Maadjeda Tjon Atsoi	IMARES, afdeling milieu



3.1 Samenvatting

1. Beschrijving van de metingen

Vanaf maart 2010 tot en met januari 2011 zijn ca. elke 2 maanden watermonsters van ruim 20 liter verzameld van de 4 posities uit de drie zuiveringsmoerassen. Per monster werd 20 liter gedurende 48 uur geëxtraheerd met behulp van XAD kunsthars. De door hars opgenomen stoffen werden vervolgens overgebracht in 1 ml aceton. Van dit concentraat werd 0.5 ml gebruikt voor de in-vivo assays beschreven in dit rapport. 0.25 ml van concentraat werd gebruikt voor de uitvoering van in-vitro assays en de resterende 0.25 ml werd opgeslagen voor onvoorziene zaken.

De toxiciteit van de extracten werd bepaald met behulp van drie in-vivo testen: een bacterietest (microtox), een algengroeiremmingstest en een daphnia immobiliteitstest. Deze testen werden uitgevoerd met een verdunningsreeks van het concentraat.

2. Belang van de metingen

De metingen zijn uitgevoerd om een indruk te krijgen van de giftigheid van het bemonsterde effluent. Het voordeel van de concentratie methode, boven het direct testen van het watermonster is tweeledig. Enerzijds worden door deze werkwijze de testresultaten niet beïnvloed door randvoorwaarden van het watermonster (pH, nutriënten gehalten, etc.), anderzijds is het mogelijk om het effect van concentraten te testen waardoor met het gebruik van kortdurende testen toch een indicatie kan worden verkregen van het risico bij chronische blootstelling.

Door de testresultaten van verschillende posities in de zuiveringsmoerassen te vergelijken wordt een indruk verkregen of de toxiciteit van het effluent tijdens het doorlopen van het moerassysteem veranderd.

3. Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De toxiciteit van het effluent varieert sterk in de tijd, maar geen van de onderzochte monsters was zo toxisch dat er risico bestaat op het ontstaan van acute effecten. Echter, wanneer het criterium van Durand (2009) wordt gehanteerd dat er bij meer dan 0.05 Toxic Units sprake is van een risico bij chronische blootstelling dan laten de testresultaten zien dat deze grens regelmatig wordt overschreden. Bij rwzi Land van Cuijk en rwzi Grou was dit het geval bij 71% van de monsters die bij de ingang van het moeras werden verzameld als zijnde representatief voor het rwzi effluent zoals dat op het moerassysteem geloosd wordt. Bij rwzi Hapert lag dit percentage lager (43%), maar hier werden wel de sterkste overschrijdingen van de grenswaarde waargenomen. Van de gebruikte testorganismen bleek daphnia het meest gevoelig.

4. Draagt met zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

In de zuiveringsmoerassen worden pieken in toxiciteit gedempt. Bij het verlaten van het zuiveringsmoeras ligt het maximale Toxic Units niveau veelal lager dan bij het begin van het moeras. Bij rwzi land van Cuijk en Grou was de frequentie waarmee effluentmonsters beoordeeld werden als 'potentieel risico voor ontstaan chronische effecten' aan het eind van het zuiveringsmoeras gehalveerd ten opzichte van het begin van het moeras. Dit was niet het geval bij rwzi Hapert. Hoewel ook hier afname van toxiciteit werd waargenomen was dit niet voldoende om de relatief hoge overschrijdingen van de risicogrens volledig teniet te doen.

5. Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Het mechanisme achter het afvlakken van de toxiciteit die in de zuiveringsmoerassen plaatsvindt is niet duidelijk. Hierdoor is het niet mogelijk om specifieke aanbevelingen te formuleren ter optimalisatie van het zuiveringsmoeras. Het is niet uit te sluiten dat de aangename van de toxiciteit het gevolg is van verdunning van een batch relatief toxisch effluent tijdens het passeren van het moerassysteem. In dit geval is het van belang dat het moerassysteem voldoende volume heeft.

3.2 Materiaal & Methoden

3.2.1 XAD extracties

Per RWZI zijn op de vier vaste bemonsteringsposities in het moerassysteem watermonsters van 20-25 liter verzameld met tweemaandelijks intervallen tussen maart 2010 en januari 2011 (6 tijdstippen). Deze watermonsters werden geëxtraheerd met XAD-hars volgens de procedure zoals beschreven in Durand et al. (2009). Hiertoe werd op de dag van monsternamen 20 liter van het monster gedurende 48 uur geëxtraheerd met XAD-hars onder continu roeren. Tijdens deze procedure worden de apolaire en zwak apolaire stoffen uit het monster in de XAD-hars geconcentreerd. Na 48 uur is de XAD-hars door middel van filtratie verzameld, gedroogd en geëluëerd met 1 ml aceton (pico grade). Het aceton-eluaat werd vervolgens verdeeld in drie submonsters: 0.5 ml werd gebruikt voor de in-vivo bioassays zoals in dit rapport beschreven en 0.25 ml, representatief voor ca. 5 liter van het oorspronkelijk monster, werd gebruikt voor analyse met in-vitro assays bij de Universiteit van Wageningen (zie rapport nr. 3). De resterende 0.25 ml werd bewaard voor onvoorziene zaken of eventueel aanvullende analyses. Alle monsters werden in monstervials opgeslagen bij -20°C tot het moment van analyse.

De dag voordat de bioassays werden ingezet is het aceton-eluaat ontdooid en het aceton afgedampt. Het restant werd opgelost in 60 ml Dutch Standard water (DSW), waardoor het monsterconcentraat werd verkregen dat als uitgangsmateriaal diende voor de bioassays. Door de gevolgde procedure was de concentratie van de geëxtraheerde stoffen in dit monsterconcentraat ruim 150 maal hoger dan in het oorspronkelijke effluentmonster.

3.2.2 Bioassays

De algemene beschrijving van de testen worden gegeven in de Bijlagen:

- A. Bacterie luminescentieremmingstest met *Vibrio fischeri* (Microtox®)
- B. Zoetwater algen-groei remmingstest met *Pseudokirchneriella subcapitata*
- C. Zoetwater acute immobiliteitstest met de crustacean *Daphnia magna*

In een bioassay wordt een testorganisme blootgesteld aan een concentratiereeks van het te onderzoeken monster. In dit geval met XAD extractie verkregen monsterconcentraten. De conditie van de blootgestelde organismen wordt vergeleken met de conditie van een niet blootgestelde controlegroep. In een ideale test wordt bij de laagste blootstellingsconcentratie geen effect gevonden en veroorzaakt de hoogste concentratie 100% effect. De aldus verkregen gegevens kunnen worden gebruikt om een dosis-effect curve te fitten waaruit de EC₅₀-waarde kan worden berekend. De EC₅₀-waarde is de concentratie waarbij 50% effect kan worden verwacht. Hoe lager de EC₅₀-waarde hoe hoger de giftigheid.

De conditie van de gebruikte testorganismen wordt gecontroleerd door tevens een concentratiereeks in te zetten met een referentietoxicant waarvan de effectconcentratie bekend is.

Minimaal zijn vier testconcentraties nodig om een goede dosis effect relatie te schatten, waar idealiter de laagste en hoogste concentratie respectievelijk 0% en 100% effect veroorzaken. Door de testopzet is de hoogste haalbare concentratie bij de Microtox test 45%. De gebruikte concentratiereeksen zijn weergegeven in Tabel 3-1.

Tabel 3-1 Concentratierreeksen die zijn toegepast bij de uitvoering van de verschillende bioassays met het ca. 150x geconcentreerde monster.

Daphnia		Alg		Bacterie	
Aandeel monster	concentratiefactor	Aandeel monster	concentratiefactor	Aandeel monster	concentratiefactor
0%	0x	0%	0x	0%	0x
0.4%	0.6x	0.4%	0.6x	0.7%	1.1x
1.6%	2.3x	1.6%	2.3x	2.8%	4.2x
6.2%	9.4x	6.2%	9.4x	11%	17x
25%	38x	25%	38x	45%	68x
100%	150x	100%	150x		

Bioassays kunnen worden beïnvloed door karakteristieken van het monster die niet direct met de aanwezigheid van toxische stoffen samenhangen. Gedacht moet worden aan bijvoorbeeld de zuurgraad, geleidend vermogen of zuurstofgehalte. Het is mogelijk dat hierdoor voor bepaalde testen geen bruikbare resultaten kunnen worden behaald. Daarom is vlak voor het inzetten in de bioassays op het laboratorium met behulp van een HACH Lange HQ40d multimeter de zuurgraad (pH), saliniteit, geleidend vermogen (EGV) en zuurstofgehalte (DO2) gemeten in de monsters.

3.2.3 Interpretatie van de resultaten

In de bioassays wordt de respons van het testorganisme getest in een verdunningsreeks van het monster, in dit geval het monsterconcentraat. Het resultaat wordt uitgedrukt als de verdunning waarbij 50% effect verwacht kan worden (EC_{50}). Correcties voor de concentratiefactor worden naderhand toegepast waarmee uiteindelijk een EC_{50}^f wordt gegeven. De EC_{50}^f is het aantal malen dat het originele watermonster (in theorie) geconcentreerd moet worden om 50% effect te veroorzaken in de betreffende bioassay. Voor het berekenen van de EC_{50}^f is gebruik gemaakt van de volgende formule:

$$EC_{50}^f = \frac{EC_{50} \times C_f}{100}$$

Waarin: EC_{50}^f = concentratiefactor waarbij 50% effect is gevonden (-)
 EC_{50} = Concentratie waarbij 50% effect is gevonden (v/v%)
 C_f = Concentratiefactor extractie (-)

Ten behoeve van de interpreteerbaarheid zijn de resultaten in dit onderzoek uitgedrukt in Toxic Units (TU). De Toxic Units van een monster wordt berekend volgens de formule:

$$TU = \frac{1}{EC_{50}^f}$$

TU <1 betekent dat het effluentmonster geconcentreerd moet worden om 50% effect te veroorzaken. Bij TU >1 is een monster meer toxisch en zal het verdund moeten worden om 50% effect te laten zien.

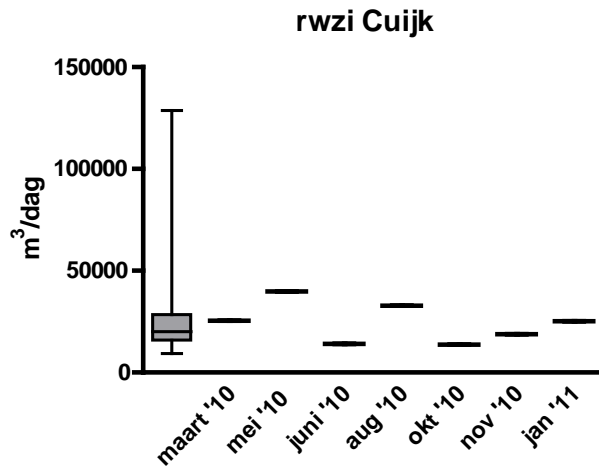
Rekening houdend met de variatie in de effectiviteit van de extractiemethode voor verschillende stoffen die in een monster kunnen voorkomen zijn door Durand *et al.* (2009) grenswaarden gedefinieerd die indicatief zijn voor de toxiciteit van het onderzochte monster. Hierbij wordt gesteld er een risico bestaat voor het ontstaan van effecten bij chronische blootstelling aan een monster met TU >0.05. Bij de beoordeling van de resultaten binnen WIPE is ervan uitgegaan dat er bij TU <0.05 geen ecologisch risico bestaat.

3.3 Resultaten

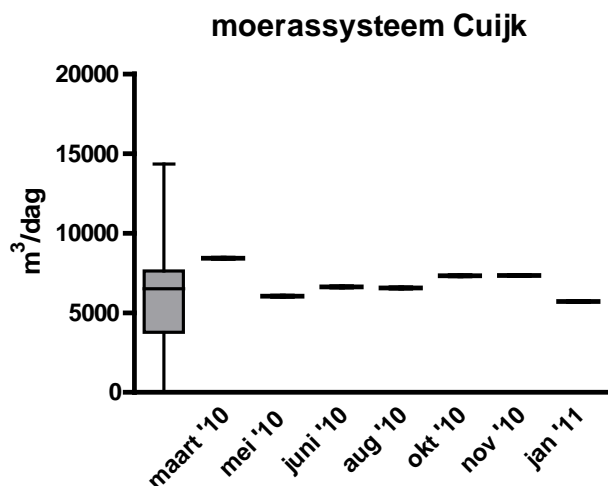
3.3.1 RWZI land van Cuijk

Tijdens de periode januari 2010 en januari 2011 waarin de bemonsteringen werden uitgevoerd was het gemiddelde debiet van rwzi Land van Cuijk 27495 m³/dag. De helft van de dagen lag het debiet tussen 15 790 en 28 380 m³/dag (Figuur 3-1). Dit was ook het geval op vijf van de zeven bemonsteringsdagen. Afwijkingen hiervan vielen in mei en augustus 2010 toen bemonsterd werd in perioden met relatief hoge debieten van de rwzi.

De aanvoer van effluent door het moerassysteem lag gemiddeld op 5652 m³/dag. Tijdens de maart '10 bemonstering was dit debiet relatief hoog, maar de andere bemonsteringen werden uitgevoerd in perioden met normale debieten. Zowel met betrekking tot de debieten van de rwzi en de debieten door het moerassysteem kan gesteld worden dat er niet tijdens extreme momenten is bemonsterd.

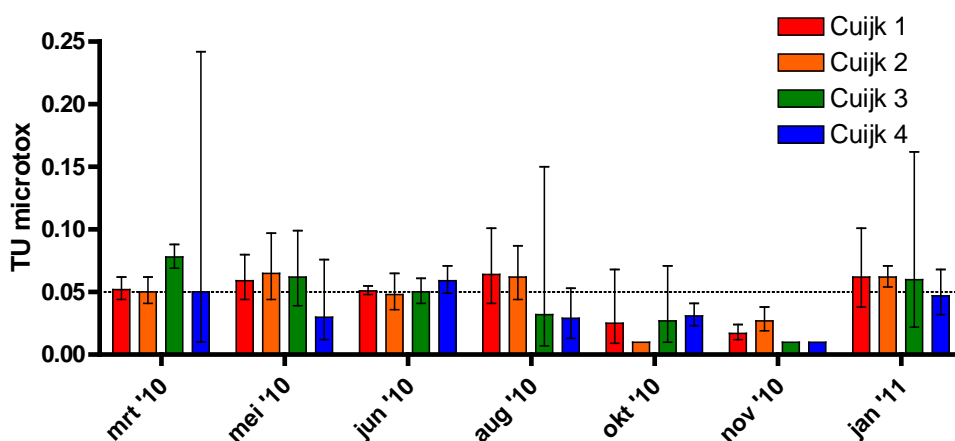


Figuur 3-1 Lozingsdebiet van rwzi Land van Cuijk tijdens de periode januari 2010 tot en met januari 2011 weergegeven als box-whisker plot voor de gehele periode, (box is 25 tot 75% percentiel, horizontale lijn is mediaan, error bars geven de range van de minimale en maximale waarden weer), en per bemonsteringsmaand het gemiddelde debiet tijdens de bemonsteringsdag en de dag daarvoor.



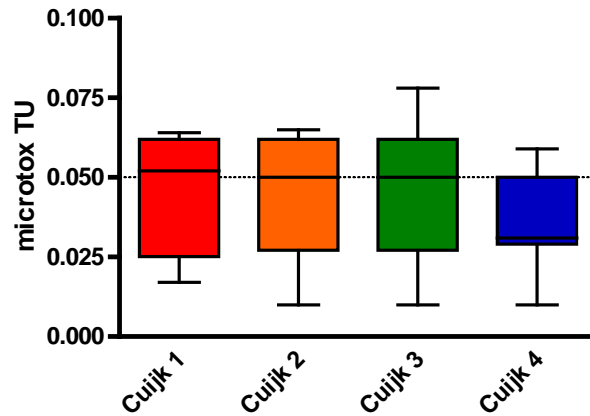
Figuur 3-2 Debiet van het effluent door het zuiveringsmoeras van rwzi Land van Cuijk tijdens de periode januari 2010 tot en met januari 2011 weergegeven als box-whisker plot voor de gehele periode, (box is 25 tot 75% percentiel, horizontale lijn is mediaan, error bars geven de range van de minimale en maximale waarden weer), en per bemonsteringsmaand het gemiddelde debiet tijdens de bemonsteringsdag en de dag daarvoor.

In totaal zijn 28 monsters (4 posities op 7 tijdstippen) uit het zuiveringsmoeras bij rwzi land van Cuijk met de in-vivo bioassays getest. Bij 12 van deze monsters werd met de bacterietest (microtox) de $TU < 0.05$ waarde overschreden (Figuur 3-3). Op 5 van de 7 bemonsteringstijdstippen werd deze waarde overschreden op positie 1, op positie 4 was dit eenmaal het geval. Bij geen van de monsters was sprake van hoge toxiciteit, de TU's bleven in alle gevallen beneden 0.1. In de maanden oktober 2010 en november 2010 werd op geen van de posities de grenswaarde van $TU < 0.05$ overschreden.

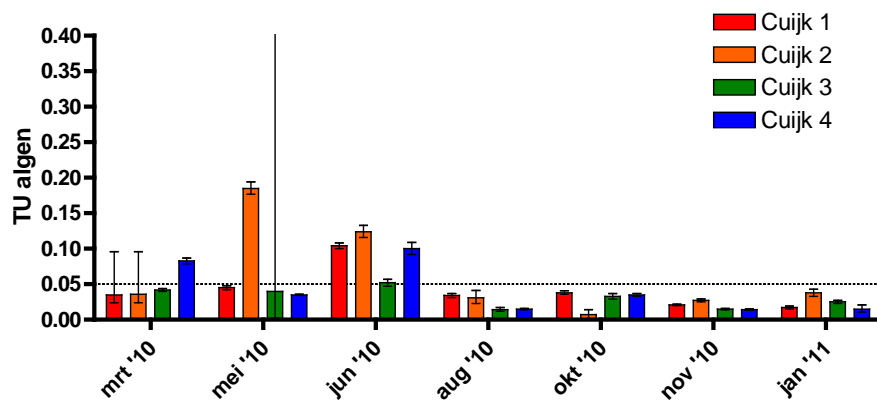


Figuur 3-3 Resultaten van de bacterie test met monsters van RWZI Land van Cuijk uitgedrukt als Toxic Units (TU). De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.

Wanneer alle bacterie test resultaten per positie worden samengevoegd blijken de resultaten van posities 1, 2 en 3 van rwzi land van Cuijk sterk op elkaar te lijken. Circa 50% van deze monsters heeft een TU waarde van 0.05. Op positie 4 zijn de hoge waarden afgevlakt en werd nog slechts bij 25% van de monsters een TU-waarde boven 0.05 aangetoond.

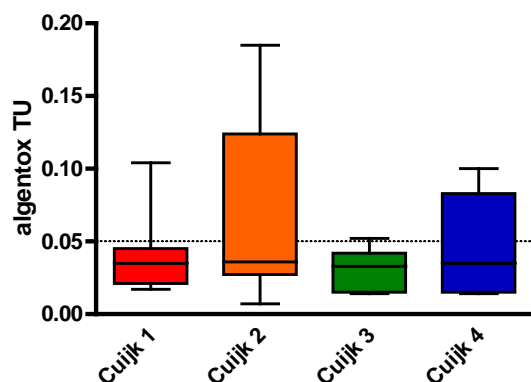


Figuur 3-4 Box-whisker plot van de microtox resultaten uitgedrukt in TU van RWZI Land van Cuijk. Weergegeven zijn de resultaten van alle 7 bemonsteringstijdstippen per bemonsteringspositie. De horizontale lijn geeft de mediaan van de gemiddelde TU data weer. Het gekleurde blok omvat de data tussen 25 en 75 percentiel en de T-bars geven de hoogst en laagst berekende TU waarde aan.



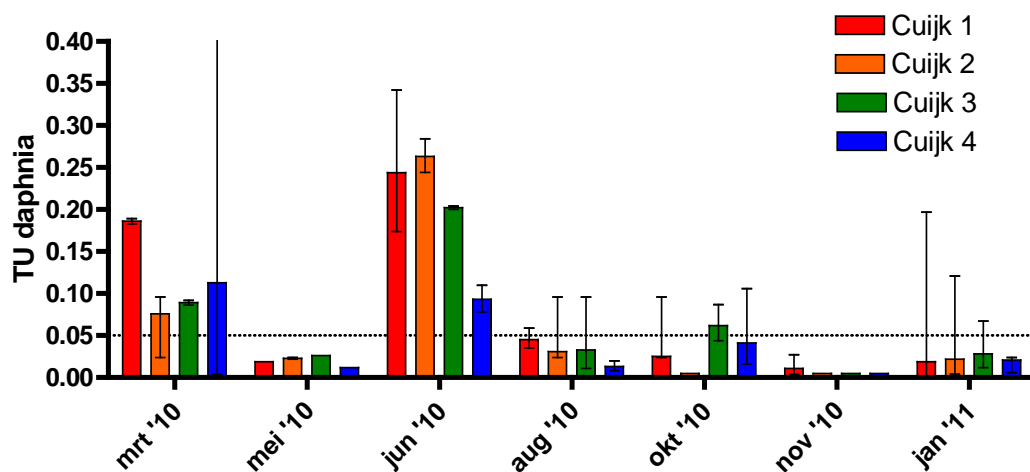
Figuur 3-5 Resultaten van de algen test met monsters van RWZI Land van Cuijk uitgedrukt als Toxic Units (TU). De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.

De algentesten gaven bij de monsters uit rwzi land van Cuijk allen indicaties op ecologische risico's in de periode maart tot en met juni 2010. Van de 12 monsters die in deze periode werden getest werd in 5 gevallen een TU gevonden die hoger lag dan 0.05. Deze overschrijdingen waren niet extreem en geven met een maximum van ca. 0.02 op positie 2 in mei 2010 geen indicatie voor risico op acute effecten. Een relatie van de TU waarden met de positie in het moeras lijkt niet aanwezig. Dit komt ook naar voren wanneer de resultaten per positie worden samengevoegd (Figuur 3-6). De sterkste overschrijdingen van de grenswaarde TU=0.05 worden gevonden op positie 2 en in mindere mate 4.



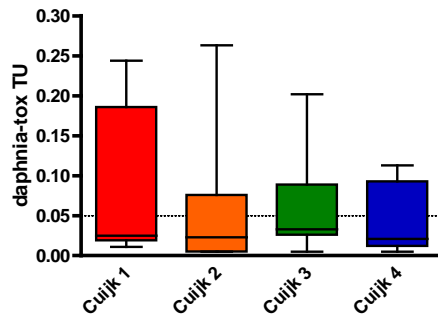
Figuur 3-6 Box-whisker plot van de algen test resultaten uitgedrukt in TU van RWZI Land van Cuijk. Weergegeven zijn de resultaten van alle 7 bemonsteringstijdstippen per bemonsteringspositie. De horizontale lijn geeft de mediaan van de gemiddelde TU data weer. Het gekleurde blok omvat de data tussen 25 en 75 percentiel en de T-bars geven de hoogst en laagst berekende TU waarde aan

Hoewel minder uitgesproken dan met de algentesten wordt ook met de daphniatesten de hoogste toxiciteit gevonden in de periode maart toe en met juni 2010. Dit komt tot uiting in relatief hoge Tu-waarden op alle posities in maart en juni 2010. Opvallend is dat bij de tussen liggende bemonstering in mei nauwelijks toxiciteit werd waargenomen. Dit was ook het geval in de periode augustus 2010 tot en met januari 2011, waarin van de 16 monsters slechts eenmaal TU=0.05 grens werd overschreden, en dan nog in zeer geringe mate.



Figuur 3-7 Resultaten van de daphnia test met monsters van RWZI Land van Cuijk uitgedrukt als Toxic Units (TU). De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.

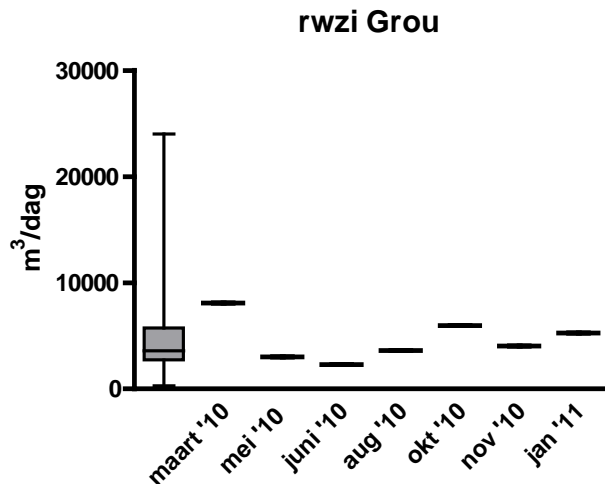
Wanneer de resultaten per positie worden samengevoegd, wordt duidelijk dat de sterkste overschrijdingen van de ecologische risicogrens zijn aangetroffen in monsters van posities 1 en 2, en het minst in monsters op positie 4 (Figuur 3-8). In de loop van het zuiveringsmoeras neemt de maximale TU waarde af.



Figuur 3-8 box-whisker plot van de Daphnia testresultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de bemonsteringsposities van MZA Cuijk

3.3.2 RWZI Grou

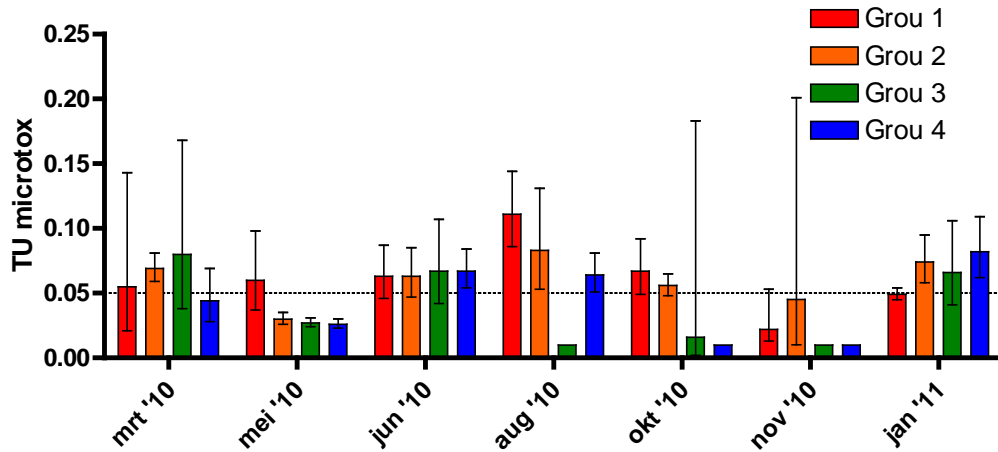
Het gemiddelde debiet van rwzi Grou tijdens de onderzoeksperiode bedroeg 5069 m³/dag. De helft van de dagen lag het lozingsdebiet tussen 2701 en 5739 m³/dag (Figuur 3-9). Dit was ook het geval tijdens de meeste bemonsteringen. Uitzonderingen hierop waren de bemonsteringen in maart 2010, toen de rwzi relatief hoog belast was, en juni 2010 toen het debiet van de rwzi net iets onder de 25% percentiel lag. Ongeacht deze variatie in aanvoer op de rwzi werd het moerassysteem van Grou met een vast debiet van 1000 m³/dag gevoed.



Figuur 3-9 Lozingsdebiet van rwzi Grou tijdens de periode januari 2010 tot en met januari 2011 weergegeven als box-whisker plot voor de gehele periode, (box is 25 tot 75% percentiel, horizontale lijn is mediaan, error bars geven de range van de minimale en maximale waarden weer), en per bemonsteringsmaand het gemiddelde debiet tijdens de bemonsteringsdag en de dag daarvoor.

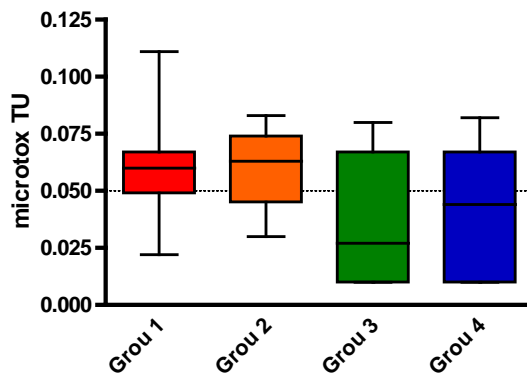
Van de 28 watermonsters die in het moerassysteem van rwzi Grou zijn verzameld, bleken er 16 in de bacterietest meer dan 0.05 TU te scoren. De hoogste toxiciteit werd aangetroffen in het monster dat werd verzameld op augustus 2010 op positie 1, dit was tevens het enige monster waarin (iets) meer dan 0.10 TU werd aangetoond. Hoewel uit de gegevens geen duidelijke trend in positie of tijd kan worden gezien, valt wel

op dat van de 7 bemonsteringsmomenten de TU-grenswaarde op positie 1 zesmaal werd overschreden, op zowel positie 3 als positie 4 gebeurde dit driemaal.



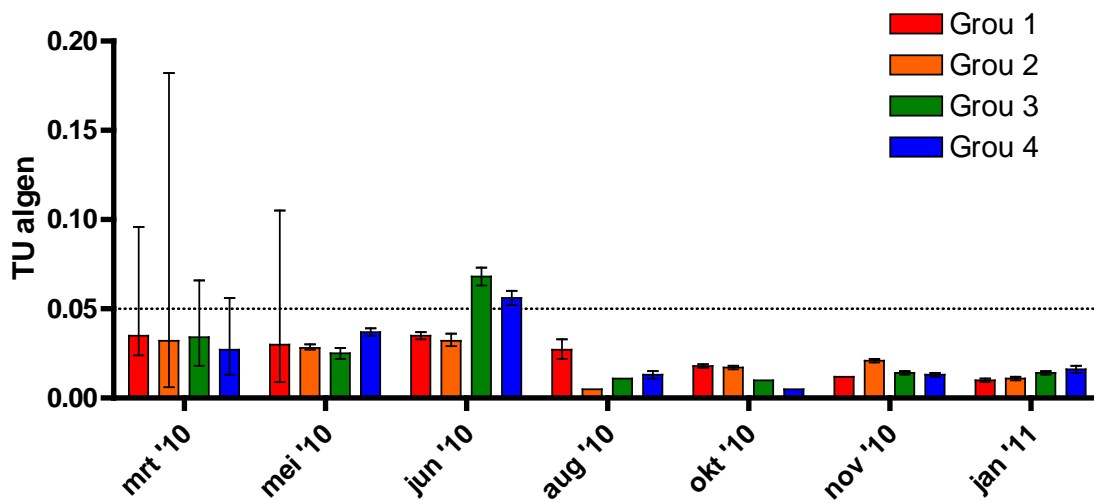
Figuur 3-10 Resultaten van de bacterietesten met monsters van RWZI Grou uitgedrukt als Toxic Units. De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.

Wanneer de gegevens per positie worden samengevoegd blijkt ook dat de TU-waarden lager is bij monsters die verder in het moeras genomen zijn (Figuur 3-11). Op posities 1 en 2 bevindt bijna 75% van de monsters zich boven de TU=0.05 grens, meer dan de helft van de monsters zich onder deze grens bevindt op posities 3 en 4.

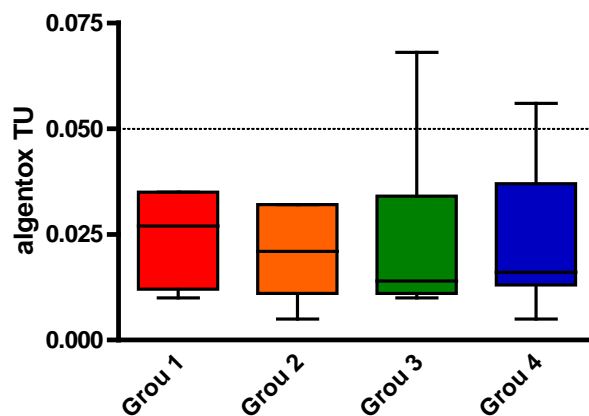


Figuur 3-11 Box-whisker plot van de microtox resultaten uitgedrukt in TU van RWZI Grou. Weergegeven zijn de resultaten van alle 7 bemonsteringstijdstippen per bemonsteringspositie. De horizontale lijn geeft de mediaan van de gemiddelde TU data weer. Het gekleurde blok omvat de data tussen 25 en 75 percentiel en de T-bars geven de hoogst en laagst berekende TU waarde aan.

De algentesten van de monsters van rwzi Grou, lieten slechts in twee monsters toxiciteit zien. Het betrof de posities 3 en 4 in juni 2010, waarop een geringe overschrijding van de TU-grenswaarde werd gevonden (Figuur 3-12). Volledigheidshalve zijn de gegevens ook uitgezet per positie, maar zoals verwacht kan worden is hierin geen trend aanwezig (Figuur 3-13).

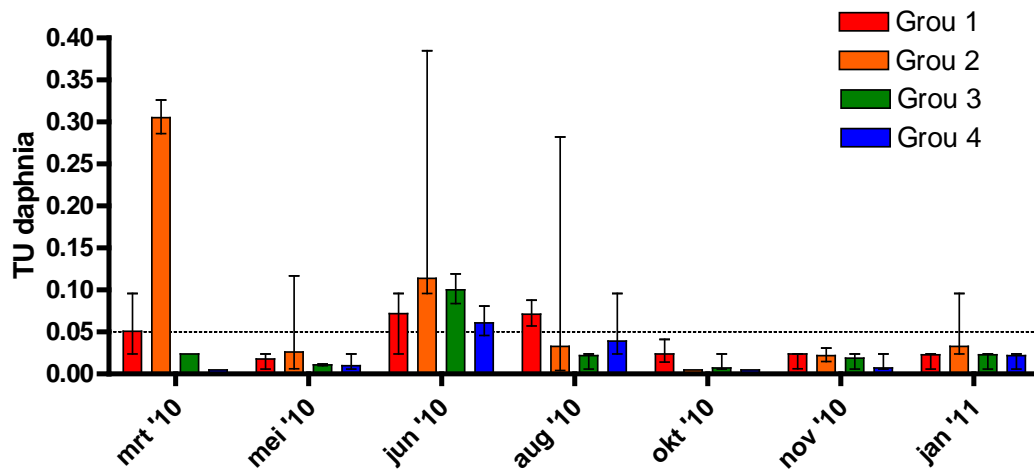


Figuur 3-12 Resultaten van de algentesten met monsters van RWZI Grou uitgedrukt als Toxic Units. De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.

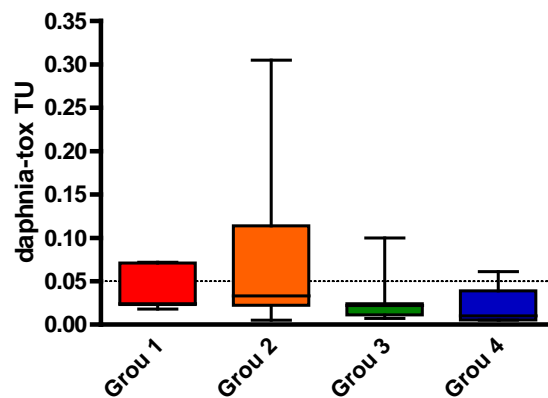


Figuur 3-13 Box-whisker plot van de algentestresultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de bemonsteringsposities van RWZI Grou

Met de daphnia test werd de TU-grenswaarde met monsters van rwzi Grou zesmaal overschreden (Figuur 3-14). In alle gevallen betrof dit monsters die waren verzameld vanaf maart tot en met augustus 2010. In alle daarna genomen monsters was de toxiciteit laag. De meeste overschrijdingen werden gevonden op posities 1 en 2, waarbij de hoogste TU waarden op positie 2 werden aangetroffen. In maart 2010 bedroeg deze waarde 0.3 TU, wat betekent dat dit monster slechts 3 maal geconcentreerd hoeft te worden om sterke acute effecten te veroorzaken.



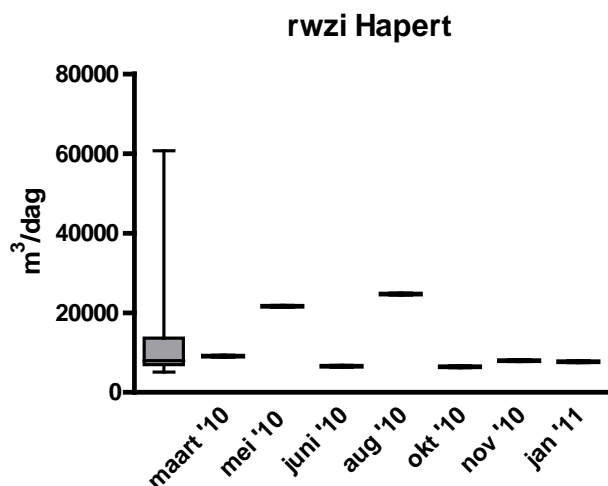
Figuur 3-14 Resultaten van de daphniatesten met monsters van RWZI Grou uitgedrukt als Toxic Units. De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.



Figuur 3-15 Box-whisker plot van de Daphnia testresultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de bemonsteringsposities van MZA Grou

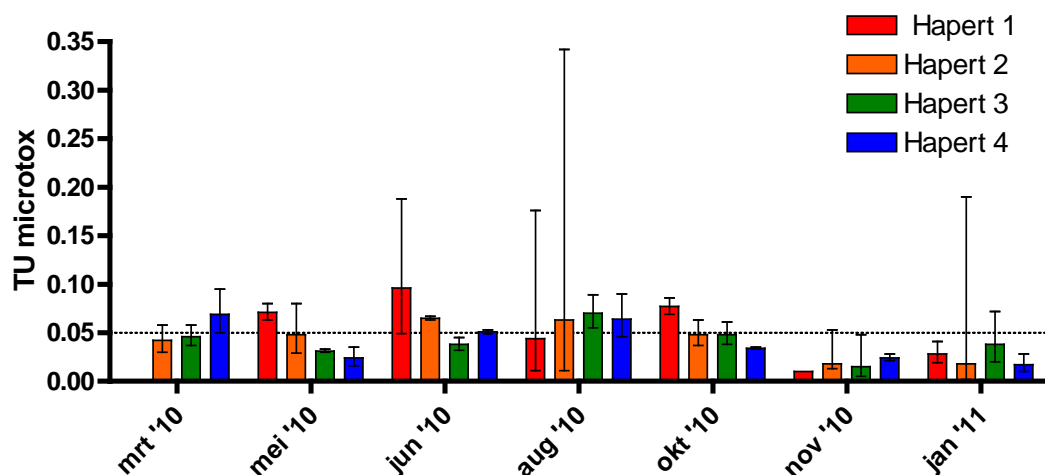
3.3.3 RWZI Hapert

Het debiet van rwzi Hapert gedurende de onderzoeksperiode bedroeg gemiddeld 12591 m³/dag, terwijl 50% van de dagen het debiet tussen 6879 en 13632 m³/dag lag. Tijdens de meeste bemonsteringsperioden lag het debiet aan de onderzijde binnen deze range. Uitzonderingen werden gevormd door de bemonsteringen in mei en augustus 2010 maanden toen debieten van meer dan 20000 m³/dag door de rwzi werden geloosd.



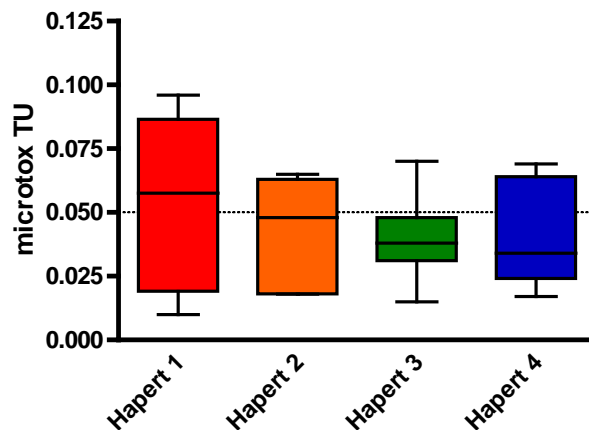
Figuur 3-16 Lozingsdebiet van rwzi Hapert tijdens de periode januari 2010 tot en met januari 2011 weergegeven als box-whisker plot voor de gehele periode, (box is 25 tot 75% percentiel, horizontale lijn is mediaan, error bars geven de range van de minimale en maximale waarden weer), en per bemonsteringsmaand het gemiddelde debiet tijdens de bemonsteringsdag en de dag daarvoor.

Het monster van positie 1 van rwzi Hapert dat in maart 2010 was verzameld, is tijdens de opwerking verloren gegaan. Hierdoor zijn voor rwzi hapert 27 monsters getest in plaats van 28 zoals bij de andere locaties. Van deze 27 monsters werd in de bacterietest 8 maal de TU-grenswaarde overschreden (Figuur 3-17). Deze overschrijdingen vonden verspreid over de posities plaats tot en met oktober 2010 en werden tijdens de laatste twee bemonsteringsrondes niet meer waargenomen.



Figuur 3-17 Resultaten van de bacterietesten met monsters van RWZI Hapert uitgedrukt als Toxic Units. De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.

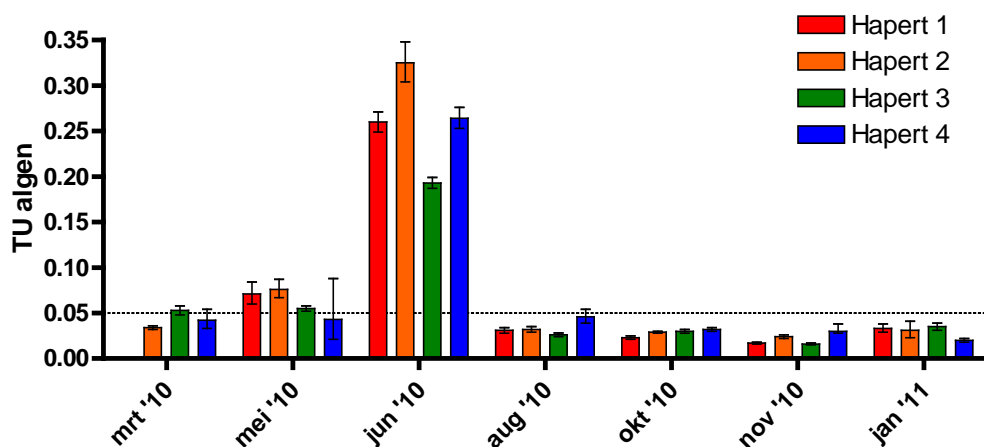
Wanneer alle monsters per positie worden samengevoegd blijkt dat op positie 1 meer dan de helft van de monsters in de bacterietest een TU-waarde boven 0.05 scoorden. Naarmate de monsters verder in het moerassysteem werden verzameld daalt laat dit aandeel een dalende trend zien. Niet alleen de mediane TU neemt af, ook de maximaal gemeten toxiciteit wordt lager.



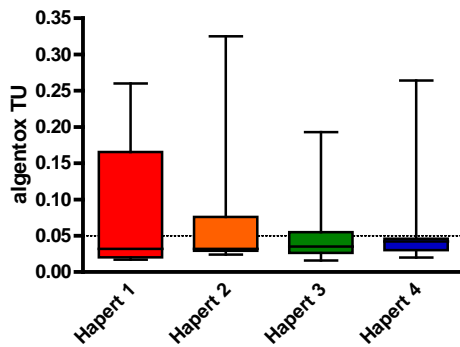
Figuur 3-18 Box-whisker plot van de microtox resultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de bemonsteringsposities van MZA Hapert

De algentesten suggereren een invloed van het seizoen op de resultaten. Met name in mei en juni 2010 werden overschrijdingen van de TU-grenswaarde vastgesteld (Figuur 3-19). In mei betrof dit zeer geringe overschrijdingen die ruim beneden TU=0.1 bleven, maar in juni werden TU-waarden van meer dan 0.3 gemeten. In mei is een trend zichtbaar van afnemende toxiciteit naarmate de monsters verder in het moeras zijn verzameld, maar in juni is geen relatie met de bemonsteringspositie aantoonbaar.

Door alle resultaten per posities samen te voegen ontstaat toch het beeld dat de meeste pieken in toxiciteit worden aangetroffen op positie 1, en hoewel de pieken overal op hetzelfde niveau blijven, daalt de TU-waarde van de meeste monsters naarmate deze verder in het moeras zijn verzameld.



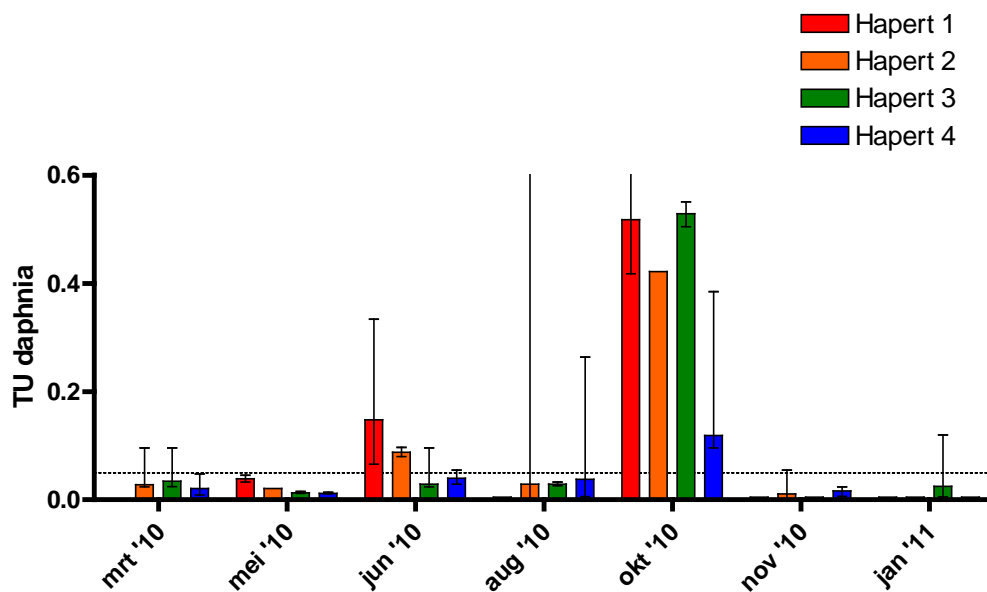
Figuur 3-19 Resultaten van de algentesten met monsters van RWZI Hapert uitgedrukt als Toxic Units. De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.



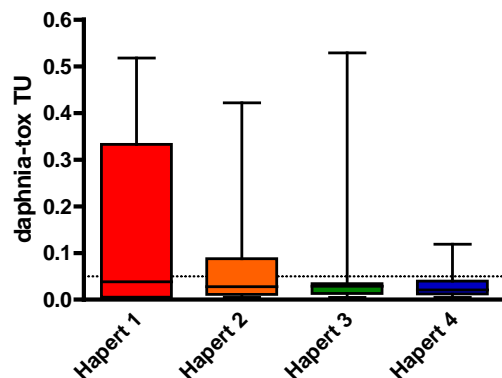
Figuur 3-20 Box-whisker plot van de algentestresultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de bemonsteringsposities van MZA Hapert

Met de daphnia testen werden tijdens vijf van de 7 bemonsteringsperioden geen TU-waarden boven de 0.05 grens aangetoond (Figuur 3-21). In juni werd deze grens wel overschreden op posities 1 en 2. Vanaf positie 1 is een dalende trend zichtbaar zodat de monsters van posities 3 en 4 onder de TU-grenswaarde vallen. In oktober 2010 is sprake van een hogere toxiciteit waarbij TU-waarden van 0.4-0.5 worden bepaald op posities 1 tot en met 3. Op positie 4 is de TU-waarde duidelijk lager, maar bevindt zich met 0.1 nog steeds boven de grenswaarde.

De per positie samengevoegde testresultaten laten aan dalende toxiciteit zien in de loop van het moeras (Figuur 3-22).



Figuur 3-21 Resultaten van de daphniatesten met monsters van RWZI Hapert uitgedrukt als Toxic Units. De horizontale stippellijn geeft het niveau aan waaronder geen ecologisch risico wordt verondersteld.



Figuur 3-22 Box-whisker plot van de Daphnia testresultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de bemonsteringsposities van MZA Hapert

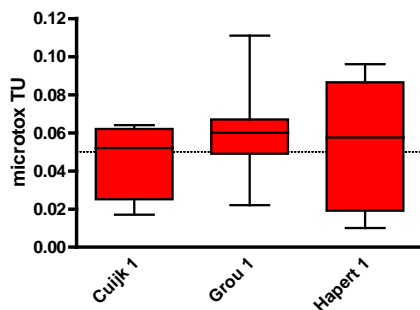
3.4 Discussie

3.4.1 Algemene beschouwing van de resultaten

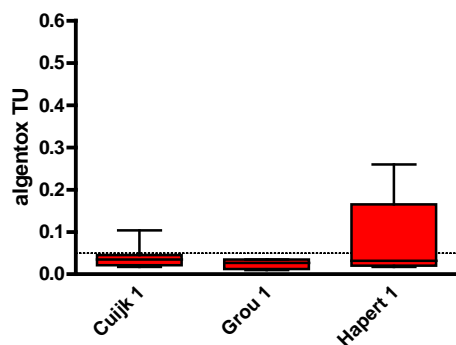
Er blijken aanzienlijke verschillen te bestaan tussen de test resultaten van de verschillende monsters. Het betreft hier zowel verschillen in tussen rwzi's, in de tijd en tussen monsterposities.

Verschillen tussen rwzi's

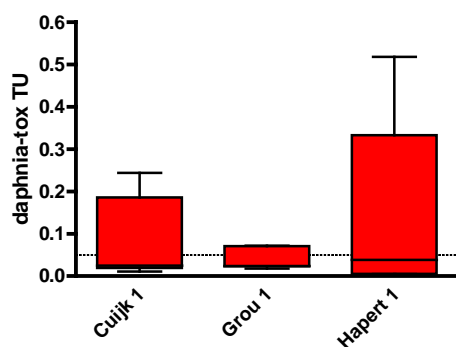
Om de RWZI's onderling met elkaar te vergelijken zijn de resultaten van positie 1 naast elkaar geplaatst (Figuur 3-23; Figuur 3-24; Figuur 3-25). Dit zijn de posities aan het begin van de zuiveringsmoerassen, waarin dus het ruwe effluent uit de rwzi geloosd wordt. Het effluent van rwzi Hapert blijkt in alle in-vivo testen de sterkste respons te veroorzaken, gevolgd door respectievelijk rwzi Land van Cuijk en Grou. De daphniatest blijkt voor alle rwzi's de meest gevoelige test. Bij monsters van Cuijk en Hapert wordt een TU waarde van 0.1 regelmatig overschreden. Voor de algentest gebeurt dit eigenlijk alleen nog in monsters van rwzi Hapert, terwijl met de bacterietest bij geen van de rwzi's de TU-waarde van 0.1 noemenswaardig wordt overschreden.



Figuur 3-23 Box-whisker plot van de microtox resultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de eerste bemonsteringsposities van de RWZI's



Figuur 3-24 box-whisker plot van de algen testresultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de eerste bemonsteringsposities van de RWZI's



Figuur 3-25 box-whisker plot van de Daphnia testresultaten uitgedrukt in TU t.o.v. de eerste bemonsteringsposities van de RWZI's

Bovenstaande gegevens geven aan dat de hoogste toxiciteit in het effluent van rwzi Hapert is aangetroffen. Het is echter niet zo de monsters van rwzi Hapert continue een hoge toxiciteit lieten zien. Wanneer wordt gekeken naar het aantal monsters waarbij ten minste één van de drie testen de $TU=0.05$ grens overschreed, dan blijkt dat op positie 1 bij rwzi Hapert driemaal het geval te zijn geweest, terwijl dit bij rwzi Land van Cuijk en Grou bij vijf monsters werd geconstateerd (Tabel 3-2). In de loop van het zuiveringsmoeras blijkt deze indicatie voor risico op ontstaan chronische effecten bij rwzi Land van Cuijk en Grou af te nemen. De invloed van het moerassysteem bij rwzi Hapert is onduidelijk, en zou mogelijk zelfs suggereren dat het risico in de loop van het moeras toeneemt.

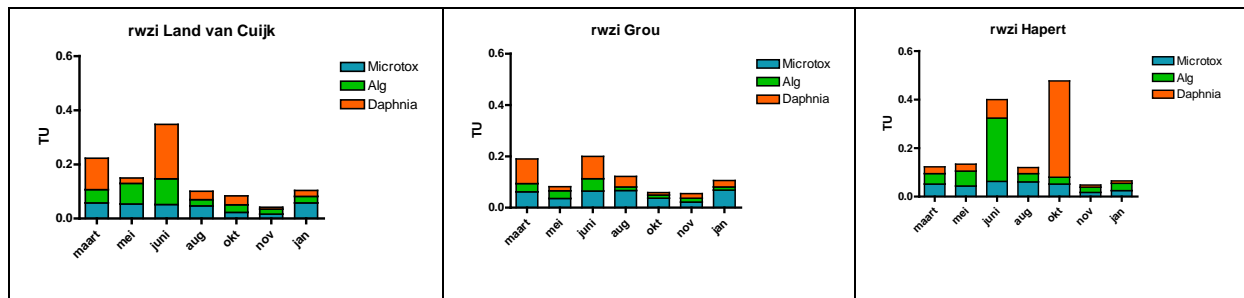
Tabel 3-2 Aantal bioassays per monsters waarbij $TU > 0.05$ is gevonden, en in de onderste rij het aantal monster per positie waarvan minstens een bioassay $TU > 0.05$ aangaf.

	Cuijk				Grou				Hapert			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
mrt	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	1	1
mei	1	2	1	0	1	0	0	0	3	1	1	0
juni	3	2	3	3	2	2	3	3	3	3	1	2
aug	1	1	0	0	2	1	0	1	0	1	1	1
Okt	0	0	1	0	1	1	0	0	2	1	1	1
Nov	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jan	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
TU > 0.05	5 (71%)	5 (71%)	5 (71%)	2 (29%)	5 (71%)	5 (71%)	3 (43%)	3 (43%)	3 (43%)	4 (57%)	5 (71%)	4 (57%)

Variatie in de tijd

De samenstelling en de hoeveelheid effluent dat een rwzi produceert is niet constant. Het wordt sterk beïnvloed door bijvoorbeeld het tijdstip en de weersomstandigheden. Zo wordt er 's nachts per huishouden minder water gebruikt dan overdag en wordt op de meeste rwzi's ook regenwater aangevoerd. Door het regenwater zal het huishoudelijk en eventueel industrieel effluent worden verdund, maar worden tegelijkertijd verontreinigingen aangevoerd. Bovendien is de aanvoer van specifieke stoffen naar de zuivering seizoensafhankelijk, zoals bijvoorbeeld het geval is met zonnebrandcrèmes en insectenwerende middelen in het huishoudelijke afvalwater en onkruidbestrijdingsmiddelen in afspoelend regenwater.

Bij alle drie onderzochte rwzi's lieten de monsters van juni 2010 relatief hoge toxiciteit zien in vergelijking met de andere monsters uit hetzelfde moeras (Figuur 3-26). In rwzi land van Cuijk en Grou bleek de toxiciteit geconcentreerd in de periode maart tot augustus. Gedurende de wintermaanden (november 2010 en januari 2011) waren de monsters uit alle rwzi's het minst toxisch. Bij rwzi Land van Cuijk en Grou was dit ook in oktober al het geval, terwijl bij rwzi Hapert toen relatief hoge toxiciteit werd aangetoond met de daphnia test. De oorzaak achter deze verschillen is niet duidelijk. Er lijkt geen duidelijke relatie met het lozingsdebiet van de rwzi te bestaan.



Figuur 3-26 Toxiciteit van de monsters per rwzi in de tijd. Uitgedrukt zijn de gemiddelde waarden in Toxic Units van de testen uitgevoerd met monsters van posities 1 tot en met 4.

Verschillen tussen monsterposities

Monsterposities 1 tot en met 4 worden door een batch rwzi effluent achtereenvolgens gepasseerd. Idealiter zouden monster genomen op posities 1 tot en met 4 de ontwikkeling van het effluent op zijn weg door het moerassysteem weergegeven. De passage van het volledige moerassysteem neemt echter 2 tot 4 dagen in beslag, terwijl de monsters op alle posities in één moerassysteem binnen twee uur zijn verzameld. Omdat de samenstelling van het effluent in de tijd varieert, kunnen monsters van verschillende posities niet direct onderling worden vergeleken. Het passeren van een verontreinigingsgolf zou kunnen verklaren waarom de toxiciteit bij olopemde bemonstering posities soms lijkt toe te nemen.

Om dit wel mogelijk te maken zal over een periode van enkele weken gecontroleerd bemonsterd moeten worden, en het aldus verkregen mengmonster voor de testen worden gebruikt. In theorie kan dit worden opgevangen door middel van *passive sampling*. Echter, in de praktijk blijkt het bepalen van de waterconcentratie op basis van *passive sampler* data lastig. Wanneer gebruik gemaakt wordt van equilibrium samplers is dit door referentiematerialen toe te voegen redelijk in te schatten. Maar dit stuit op problemen wanneer gebruik gemaakt wordt van 'onverzadigbare' samplers, wat nodig geacht wordt om voldoende materiaal voor bioassays te verzamelen.

Voor het WIPE project is gebruik gemaakt van equilibrium samplers (met referentiestoffen) om de potentie voor bioaccumulatie in de effluenten te bepalen, maar is voor de uitvoering van de bioassays uitgeweken naar de XAD-concentratie methode. Het voordeel van deze methode is dat zij goed beschreven en gestandaardiseerd is en dat onderlinge monsters goed vergelijkbaar zijn. Het nadeel is dat er sprake is van een puntbemonstering.

Om toch een vergelijking te maken tussen de verschillende posities zijn de resultaten per positie samengevoegd. Op deze wijze wordt toch een indicatie verkregen van de invloed van het zuiveringsmoeras op

de toxiciteit. Deze gegevens laten zien dat vooral de hoge pieken in toxiciteit bij het passeren van de zuiveringsmoerassen worden gedempt. Deze indicaties zijn in alle moerassen gevonden: voor de daphnia test was dit het geval bij alle rwzi's, voor de bacterietest bij rwzi Land van Cuijk en rwzi Grou, en voor de algentest bij rwzi Hapert.

3.4.2 Onderzoeksvragen

Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

Geen van de onderzochte monsters was zo toxisch dat er risico bestaat dat er acute effecten zullen optreden. Echter, wanneer het criterium van Durand (2009) wordt gehanteerd dat er bij meer dan 0.05 Toxic Units sprake is van een risico bij chronische blootstelling dan laten de testresultaten zien dat deze grens regelmatig wordt overschreden. Bij rwzi Land van Cuijk en rwzi Grou was dit het geval bij 71% van de monsters die bij de ingang van het moeras werden verzameld als zijnde representatief voor het rwzi effluent zoals dat op het moerassysteem geloosd wordt. Bij rwzi Hapert lag dit percentage lager (43%), maar hier werden wel de sterkste overschrijdingen van de grenswaarde waargenomen. Van de geteste bacteriën, algen en daphnia, bleken vooral de laatste het meest gevoelig.

Draagt met zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

In de zuiveringsmoerassen worden pieken in toxiciteit gedempt. Bij het verlaten van het zuiveringsmoeras ligt het maximale Toxic Units niveau veelal lager dan bij het begin van het moeras. Bij rwzi land van Cuijk en Grou was de frequentie waarmee effluentmonsters beoordeeld werden als 'potentieel risico voor ontstaan chronische effecten' aan het eind van het zuiveringsmoeras gehalveerd ten opzichte van het begin van het moeras. Dit was niet het geval bij rwzi Hapert. Hoewel ook hier afname van toxiciteit werd waargenomen was dit niet voldoende om de relatief hoge overschrijdingen van de risicogrens volledig teniet te doen.

Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Het mechanisme achter het afvlakken van de toxiciteit die in de zuiveringsmoerassen plaatsvindt is niet duidelijk. Hierdoor is het niet mogelijk om specifieke aanbevelingen te formuleren ter optimalisatie van het zuiveringsmoeras. Het is niet uit te sluiten dat de aangenomen afname van de toxiciteit het gevolg is van verdunning van een batch relatief toxisch effluent tijdens het passeren van het moerassysteem. In dit geval is het van belang dat het moerassysteem voldoende volume heeft.

Bijlagen

A. Bacterie luminescentieremmingstest met *Vibrio fischeri* (Microtox®)

Beschrijving

De bacterie luminescentieremmingstest die is toegepast, is bekend onder de merknaam Microtox® Basic test. De test is gebaseerd op blootstelling van de bioluminescerende (lichtproducerende) mariene bacterie *Vibrio fischeri* aan een waterige oplossing. De mate van acute toxiciteit, uitgedrukt als EC50 van een monster, wordt bepaald aan de hand van de remming van de luminescentie geproduceerd door *Vibrio fischeri* blootgesteld aan een concentratiereeks van de teststof.

De gevolgde procedure betreft een breed toegepaste standaard methode die is gebaseerd op Azur Environmental (1998) waarbij gevriesdroogde bacteriën vlak voor blootstelling aan het monster weer worden gereconstitueerd. Een monster wordt ingezet in een verdunningsreeks, waarna na respectievelijk 5, 15 en 30 minuten de lichtemissie wordt gemeten.

Kwaliteitszorg

De kwaliteit van de gebruikte batch bacteriën is gecontroleerd door de gevoeligheid te testen voor de chemische stof fenol, waarvan de toxiciteit bekend is.

Karakteristieken

Testorganisme	<i>Vibrio fischeri</i>
Testduur	30 minuten
Testvolume	1 ml
Aantal replica's	1
Temperatuur	15±2°C
Verdunningswater	Diluent (2%-NaCl)
Test protocol	AZUR Environmental Basic Test (1998)
Referentie toxicant	Fenol
Toxicologische observaties	Remming van luminescentie
Toxicologische parameters	EC ₅₀ (5, 15, 30 minuten), NOEC, LOEC

Statistiek

Voor de bepaling van de EC50 en de 95% betrouwbaarheidsintervallen is gebruik gemaakt van de MicrotoxOmni software (versie 1.18) bijgeleverd bij de meetapparatuur.

NOEC (No observed effect concentration): Hoogste testconcentratie waarbij geen statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de NOEC niet hoger is dan 10% (ECB, 2003).

LOEC (Lowest observed effect concentration): Laagste testconcentratie waarbij een statistisch significant effect aangetoond kan worden (ECB, 2003).

Referenties

AZUR Environmental (1998): Microtox Basic test procedure. Templateid3.pdf

European Chemicals Bureau (2003): Technical Guidance Document on Risk Assessment, Part II. Environmental risk assessment. European Communities, JRC, EUR 20418 EN/2.

ISO (2007): International Standard. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria. Second edition 2007-12-01. ISO 11348-3:2007(E).

B. Zoetwater algengroeiremmingstest met *Pseudokirchneriella subcapitata*

Beschrijving

De groeiremming van algen door blootstelling aan een monster wordt bepaald met de zgn. algen groeiremmingstest volgens ISO 8692 (2004) en OECD 201 (2006) procedures. Een bekende hoeveelheid algen uit een exponentieel groeiende cultuur wordt blootgesteld aan een verdunningsreeks van het monster. Na 24, 48 en 72 uur wordt de groei van de algen fluorometrisch bepaald, waarna een exponentiële groeicurve bepaald kan worden. Een aanpassing van de standaard testprocedure betreft een reductie van het gebruikte volume gebaseerd op Blaise & Vasseur (2005), Peterson et al. (2005) en SCA (2008). De test wordt uitgevoerd in 96 well-microtiter platen, waarbij elke concentratie in achtvoud wordt ingezet met in elke well een totaal volume van 0,25 ml. Algen worden toegevoegd in een startconcentratie van ca. 10.000 cellen/ml (geteld onder een microscoop) en vervolgens doorgemeten met de fluorometer. Daarnaast worden van elke concentratie een aantal wells gevuld zonder algen waardoor correctie voor achtergrondwaarden en kleur mogelijk is. Als effectparameter geldt de procentuele remming van de algengroei ten opzichte van een niet blootgestelde controlegroep.

Kwaliteitszorg

De kwaliteit van de algen wordt bepaald door deze bloot te stellen aan een stof waarvan de toxiciteit bekend is (kaliumdichromaat). Daarnaast moet de groeisnelheid van de algen in de controlegroep boven een vastgestelde waarde liggen.

Karakteristieken

Testorganisme	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (exponentieel groeiende cultuur)
Testduur	72 uur
Testvolume	0,25 ml
Aantal replica's	8
Testkamer	96 wells microtiter plaat
Temperatuur	23±2°C
Verdunningswater	Algenmedium ISO
Test protocol	ISO 8692 en OECD 201 (aangepast voor klein volume)
Referentie toxicant	Kaliumdichromaat
Groeisnelheid controle	Factor 67 $\mu_c > 1,4 \text{ r}^{-1}$
Toxicologische observaties	Inhibitie van groei
Toxicologische parameters	$E_r C_{50}$ (48, 72h), NOEC, LOEC

Statistiek

Voor de berekeningen van de EC50 worden eerst de individuele groeisnelheden van de algen bepaald aan de hand van de kleinste kwadraten methode volgens Weisstein (2008a). De groeisnelheden van de controles worden getoetst aan de randvoorwaarde. De procentuele inhibitie van de concentraties wordt berekend met behulp van de volgende formule:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100\%$$

Waarin: $I_{\mu i}$ = procentuele inhibitie voor elke test concentratie i (%)

μ_i = groeisnelheid van elke test concentratie i ($r-1$)

μ_c = gemiddelde groeisnelheid van de controle ($r-1$)

De EC₅₀ en de betrouwbaarheidsintervallen worden berekend door gebruik te maken van een 'sigmodal dose response curve' met een variabele helling (ISO-TS 20281, 2006). Hierbij wordt uitgegaan van een maximale inhibitie van 100% (correctie negatieve groei: sterfte) en een minimale inhibitie van 0% (gemiddelde blanco). Voor de berekening van de EC₅₀ wordt gebruik gemaakt van de volgende formule:

$$y = \frac{100}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) * Hillslope}}$$

Waarin: EC₅₀ = Concentratie waarbij 50% effect is gevonden (v/v%)
x = Concentratie van de verdunning (v/v%)
y = Specifieke procentuele inhibitie μ (%)
Hillslope = slope van de logistische curve (-)

Zowel de EC₅₀ als de Hillslope zijn onbekende waarden in deze formule en werden bepaald met behulp van de Gaus-Newton algoritme voor niet lineaire regressie. In de Gaus-Newton algoritme werden de onbekende waarden iteratief geschat door gebruik te maken van de Jacobiaan matrix zoals beschreven door Weisstein (2008b).

NOEC (No observed effect concentration): Hoogste testconcentratie waarbij geen statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de NOEC niet hoger is dan 10% (ECB, 2003).

LOEC (Lowest observed effect concentration): Laagste testconcentratie waarbij een statistisch significant effect aangetoond kan worden (ECB, 2003).

Referenties

- Blaise C. & P. Vasseur (2005): Algal microplate toxicity test. In: C. Blaise & J.-F. Férard (eds.), Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Vol. 1. pp. 137-179.
- European Chemicals Bureau (2003): Technical Guidance Document on Risk Assessment, Part II. Environmental risk assessment. European Communities, JRC, EUR 20418 EN/2.
- ISO (2004): International Standard. Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. Second edition 2004-10-01. ISO 8692:2004(E).
- ISO (2006): International Standard. Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. First edition 2006-04-01. ISO/TS 20281:2006(E).
- OECD (2006): OECD Guideline for testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Adopted on 23 March 2006. OECD Test Guideline 201.
- Peterson H.G., N. Nyholm & N. Ruecker (2005): Algal microplate toxicity test suitable for heavy metals. In: C. Blaise & J.-F. Férard (eds.), Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Vol. 1. pp. 243-270.
- SCA (2008): The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the Pseudokirchnerella subcapitata freshwater algal growth inhibition test. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. Standing Committee of Analysts. Environment Agency (National Laboratory Service). Rothley Leicestershire, UK.
- Weisstein, E.W. (2008a): "Least Squares Fitting--Exponential." From MathWorld - A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/LeastSquaresFittingExponential.html> (Aug 5th, 2008)
- Weisstein, E.W. (2008b): "Jacobian." From MathWorld - A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/Jacobian.html> (Aug 13th, 2008)

C. Zoetwater acute immobiliteitstest met de crustacean *Daphnia magna*

Beschrijving

De acute standaard Daphnia test is gebaseerd op ISO 6341 (1998) en OECD 202 (2004), waarbij het gebruikte volume gereduceerd is. De testen zijn uitgevoerd in viervoud waarbij elke concentratie een volume heeft van 4 ml. In elk testsysteem worden 5 juveniele (<24 uur) watervlooien gedurende 48 uur blootgesteld aan een concentratiereeks van het monster. Na 24 en 48 uur wordt gescoord of de watervlooien al dan niet immobiel zijn. Immobiliteit is een indicatie dat het individu sterk verzwakt is of dood.

Kwaliteitszorg

De kwaliteit van de watervlooien werd bepaald door deze bloot te stellen aan een stof waarvan de toxiciteit bekend is (kaliumdichromaat). Tevens werd getoetst of aan het eind van de test >90% van de kreeftachtigen in de blanco's nog mobiel of levend was.

Karakteristieken

Testorganisme	<i>Daphnia magna</i> (<24 uur oud)
Testduur	48 uur
Testvolume	4 ml
Aantal test organismen/replica	5
Aantal replica's	4
Temperatuur	20±2°C
Verdunningswater	DSW (Dutch Standard Water)
Test protocol	ISO 6341 (aangepast voor klein volume)
Referentie toxicant	Kaliumdichromaat
Toxicologische observaties	Immobiliteit
Toxicologische parameters	EC ₅₀ (24, 48h), NOEC, LOEC

Statistiek

De EC₅₀ en de betrouwbaarheidsintervallen zijn berekend door gebruik te maken van een 'sigmodal dose response curve' met een variabele helling (ISO-TS 20281, 2006) ingebouwd in het software programma GraphPad Prism (versie 4.03). Hierbij is uitgegaan van een maximaal effect van 100% en een minimaal effect tussen 0 en 10% (randvoorwaarde blanco). GraphPad Prism maakt gebruik van de volgende formule:

$$y = Bottom + \frac{100 - Bottom}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) * Hillslope}}$$

Waarin: EC₅₀ = Concentratie waarbij 50% effect is gevonden (v/v%)
x = Concentratie van de verdunning (v/v%)
y = Specifieke procentuele effect (%)
Bottom = Minimum procentuele effect (0-10%)
Hillslope = slope van de logistische curve (-)

NOEC (No observed effect concentration): Hoogste testconcentratie waarbij geen statistisch significant effect aangetoond kan worden. Dit wordt afgeleid van de data waarbij geldt dat het effect van de NOEC niet hoger is dan 10% (ECB, 2003).

LOEC (Lowest observed effect concentration): Laagste testconcentratie waarbij een statistisch significant effect aangetoond kan worden (ECB, 2003).

Referenties

European Chemicals Bureau (2003): Technical Guidance Document on Risk Assessment, Part II. Environmental risk assessment. European Communities, JRC, EUR 20418 EN/2.

OECD (2004): OECD Guideline for testing of Chemicals. Daphnia sp., Acute Immobilisation Test. Adopted on 13 April 2004. OECD Test Guideline 202.

ISO (1998): International Standard. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Update ref. no. ISO 6341:1996/Cor.1:1998(E).

ISO (2006): International Standard. Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. First edition 2006-04-01. ISO/TS 20281:2006(E).

STOWA 2008-06 verkenning geneesmiddelen en toxiciteit effluent rwzi's

Stefan Kools 2009: Totaal effluent beoordeling (TEB) RWZI Bath. Grontmij|AquaSense rapport

D. Ruwe data weergegeven in Toxic Units

Hieronder zijn de EC₅₀ resultaten, uitgedrukt in TU, weergegeven met de 95% betrouwbaarheidsintervallen. Aangezien bij sommige testen het omslagpunt effect/geen effect erg scherp was konden de 95% betrouwbaarheidsintervallen niet goed berekend worden. In deze gevallen is (vetgedrukt) de range aangegeven van de van de stappen in de concentratiereeks waartussen 50% effect werd waargenomen.

WIPE monstercode					Microtox TU 30 min			Alg TU 72 uur			Daphnia TU 48 uur			
					CUIJK	EC50	-	+	EC50	-	+	EC50	-	+
C	1.0	/	20100323	X	mrt '10	0.052	0.061	0.044	0.035	0.096	0.024	0.186	0.189	0.183
C	1.0	/	20100510	X	mei '10	0.059	0.080	0.044	0.045	0.048	0.042	0.019	0.019	0.019
C	1.0	/	20100629	X	jun '10	0.051	0.055	0.048	0.104	0.108	0.100	0.244	0.342	0.174
C	1.0	/	20100817	X	aug '10	0.064	0.101	0.041	0.034	0.038	0.031	0.045	0.059	0.035
C	1.0	/	20101005	X	okt '10	0.025	0.068	0.009	0.038	0.040	0.035	0.025	0.096	0.024
C	1.0	/	20101123	X	nov '10	0.017	0.025	0.012	0.021	0.022	0.020	0.011	0.027	0.005
C	1.0	/	20110111	X	jan '11	0.062	0.101	0.038	0.017	0.019	0.015	0.019	0.197	0.002
C	2.0	/	20100323	X	mrt '10	0.050	0.062	0.041	0.036	0.096	0.024	0.076	0.096	0.024
C	2.0	/	20100510	X	mei '10	0.065	0.096	0.043	0.185	0.193	0.177	0.023	0.023	0.022
C	2.0	/	20100629	X	jun '10	0.048	0.065	0.036	0.124	0.132	0.115	0.263	0.284	0.244
C	2.0	/	20100817	X	aug '10	0.062	0.087	0.044	0.031	0.041	0.023	0.031	0.096	0.024
C	2.0	/	20101005	X	okt '10	0.010	0.010	0.010	0.007	0.006	0.024	0.005	0.005	0.005
C	2.0	/	20101123	X	nov '10	0.027	0.038	0.019	0.027	0.029	0.025	0.005	0.005	0.005
C	2.0	/	20110111	X	jan '11	0.062	0.071	0.054	0.038	0.043	0.033	0.022	0.121	0.004
C	3.0	/	20100323	X	mrt '10	0.078	0.089	0.069	0.042	0.044	0.041	0.089	0.092	0.086
C	3.0	/	20100510	X	mei '10	0.062	0.100	0.039	0.040	0.758	0.002	0.026	0.026	0.026
C	3.0	/	20100629	X	jun '10	0.050	0.061	0.041	0.052	0.057	0.047	0.202	0.204	0.200
C	3.0	/	20100817	X	aug '10	0.032	0.150	0.007	0.014	0.017	0.011	0.033	0.096	0.011
C	3.0	/	20101005	X	okt '10	0.027	0.071	0.010	0.033	0.037	0.029	0.062	0.088	0.045
C	3.0	/	20101123	X	nov '10	0.010	0.010	0.010	0.015	0.015	0.014	0.005	0.005	0.005
C	3.0	/	20110111	X	jan '11	0.060	0.162	0.022	0.025	0.027	0.022	0.028	0.067	0.011
C	4.0	/	20100323	X	mrt '10	0.050	0.242	0.010	0.083	0.086	0.079	0.113	3.108	0.004
C	4.0	/	20100510	X	mei '10	0.030	0.075	0.012	0.035	0.036	0.035	0.012	0.012	0.012
C	4.0	/	20100629	X	jun '10	0.059	0.071	0.049	0.100	0.109	0.091	0.093	0.110	0.079
C	4.0	/	20100817	X	aug '10	0.029	0.053	0.013	0.015	0.016	0.013	0.013	0.020	0.009
C	4.0	/	20101005	X	okt '10	0.031	0.041	0.023	0.035	0.037	0.033	0.041	0.106	0.016
C	4.0	/	20101123	X	nov '10	0.010	0.010	0.010	0.014	0.014	0.013	0.005	0.005	0.005
C	4.0	/	20110111	X	jan '11	0.047	0.068	0.033	0.015	0.022	0.011	0.021	0.024	0.006

WIPE monstercode					Microtox TU 30 min			Alg TU 72 uur			Daphnia TU 48 uur			
					GROU	EC50		EC50			EC50			
G	1.0	/	20100322	X	mrt '10	0.055	0.144	0.021	0.035	0.096	0.024	0.051	0.096	0.024
G	1.0	/	20100510	X	mei '10	0.060	0.098	0.037	0.030	0.104	0.008	0.018	0.024	0.006
G	1.0	/	20100628	X	jun '10	0.063	0.087	0.046	0.035	0.037	0.033	0.072	0.096	0.024
G	1.0	/	20100816	X	aug '10	0.111	0.144	0.085	0.027	0.033	0.022	0.071	0.088	0.057
G	1.0	/	20101004	X	okt '10	0.067	0.091	0.049	0.018	0.019	0.017	0.024	0.041	0.014
G	1.0	/	20101122	X	nov '10	0.022	0.053	0.013	0.012	0.012	0.011	0.024	0.024	0.006
G	1.0	/	20110110	X	jan '11	0.049	0.053	0.045	0.010	0.011	0.010	0.023	0.024	0.006
G	2.0	/	20100322	X	mrt '10	0.069	0.081	0.058	0.032	0.181	0.005	0.305	0.326	0.286
G	2.0	/	20100510	X	mei '10	0.030	0.035	0.026	0.028	0.030	0.027	0.026	0.117	0.006
G	2.0	/	20100628	X	jun '10	0.063	0.085	0.047	0.032	0.036	0.029	0.114	0.385	0.096

G	2.0	/	20100816	X	aug '10	0.083	0.131	0.053	0.005	0.005	0.005	0.033	0.282	0.004
G	2.0	/	20101004	X	okt '10	0.056	0.065	0.048	0.017	0.018	0.016	0.005	0.005	0.005
G	2.0	/	20101122	X	nov '10	0.045	0.202	0.010	0.021	0.022	0.020	0.022	0.031	0.016
G	2.0	/	20110110	X	jan '11	0.074	0.095	0.057	0.011	0.012	0.010	0.033	0.096	0.024
G	3.0	/	20100322	X	mrt '10	0.080	0.168	0.038	0.034	0.066	0.017	0.024	0.024	0.024
G	3.0	/	20100510	X	mei '10	0.027	0.031	0.024	0.025	0.028	0.022	0.011	0.012	0.010
G	3.0	/	20100628	X	jun '10	0.067	0.107	0.042	0.068	0.073	0.063	0.100	0.119	0.084
G	3.0	/	20100816	X	aug '10	0.010	0.010	0.010	0.011	0.011	0.011	0.022	0.024	0.006
G	3.0	/	20101004	X	okt '10	0.016	0.182	0.001	0.010	0.010	0.010	0.007	0.024	0.006
G	3.0	/	20101122	X	nov '10	0.010	0.010	0.010	0.014	0.015	0.013	0.019	0.024	0.006
G	3.0	/	20110110	X	jan '11	0.066	0.106	0.041	0.014	0.015	0.013	0.023	0.024	0.006
G	4.0	/	20100322	X	mrt '10	0.044	0.069	0.028	0.027	0.056	0.013	0.005	0.005	0.005
G	4.0	/	20100510	X	mei '10	0.026	0.029	0.023	0.037	0.039	0.036	0.010	0.024	0.006
G	4.0	/	20100628	X	jun '10	0.067	0.084	0.054	0.056	0.060	0.053	0.061	0.081	0.046
G	4.0	/	20100816	X	aug '10	0.064	0.081	0.051	0.013	0.016	0.011	0.039	0.096	0.024
G	4.0	/	20101004	X	okt '10	0.010	0.010	0.010	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
G	4.0	/	20101122	X	nov '10	0.010	0.010	0.010	0.013	0.013	0.012	0.007	0.024	0.006
G	4.0	/	20110110	X	jan '11	0.082	0.109	0.062	0.016	0.018	0.015	0.022	0.024	0.006

WIPE monstercode					Microtox TU 30 min			Alg TU 72 uur			Daphnia TU 48 uur			
					HAPERT	EC50			EC50			EC50		
H	1.0	/	20100510	X	mei '10	0.031	0.013	0.053	0.055	0.058	0.052	0.013	0.096	0.024
H	1.0	/	20100629	X	jun '10	0.096	0.188	0.049	0.260	0.272	0.249	0.148	0.334	0.065
H	1.0	/	20100817	X	aug '10	0.044	0.176	0.011	0.031	0.034	0.029	0.005	0.005	0.005
H	1.0	/	20101005	X	okt '10	0.077	0.086	0.068	0.023	0.024	0.021	0.518	0.646	0.418
H	1.0	/	20101123	X	nov '10	0.010	0.010	0.010	0.017	0.019	0.016	0.005	0.005	0.005
H	1.0	/	20110111	X	jan '11	0.028	0.041	0.020	0.033	0.038	0.028	0.005	0.005	0.005
H	2.0	/	20100323	X	mrt '10	0.042	0.058	0.030	0.034	0.036	0.032	0.028	0.096	0.024
H	2.0	/	20100510	X	mei '10	0.024	0.036	0.017	0.043	0.088	0.021	0.012	0.014	0.011
H	2.0	/	20100629	X	jun '10	0.065	0.067	0.063	0.325	0.347	0.304	0.088	0.097	0.080
H	2.0	/	20100817	X	aug '10	0.063	0.342	0.012	0.032	0.035	0.029	0.029	3.005	0.000
H	2.0	/	20101005	X	okt '10	0.048	0.063	0.037	0.029	0.030	0.028	0.422		
H	2.0	/	20101123	X	nov '10	0.018	0.053	0.013	0.024	0.026	0.022	0.011	0.055	0.002
H	2.0	/	20110111	X	jan '11	0.018	0.190	0.002	0.031	0.042	0.023	0.005	0.005	0.005
H	3.0	/	20100323	X	mrt '10	0.046	0.058	0.037	0.053	0.058	0.049	0.034	0.096	0.024
H	3.0	/	20100510	X	mei '10	0.071	0.080	0.062	0.071	0.084	0.060	0.039	0.046	0.034
H	3.0	/	20100629	X	jun '10	0.038	0.045	0.032	0.193	0.200	0.188	0.029	0.096	0.024
H	3.0	/	20100817	X	aug '10	0.070	0.089	0.055	0.026	0.029	0.024	0.029	0.033	0.026
H	3.0	/	20101005	X	okt '10	0.048	0.060	0.038	0.030	0.033	0.028	0.529	0.552	0.505
H	3.0	/	20101123	X	nov '10	0.015	0.047	0.004	0.016	0.017	0.015	0.005	0.005	0.005
H	3.0	/	20110111	X	jan '11	0.038	0.072	0.020	0.035	0.040	0.031	0.025	0.120	0.005
H	4.0	/	20100323	X	mrt '10	0.069	0.095	0.050	0.042	0.054	0.033	0.021	0.048	0.009
H	4.0	/	20100510	X	mei '10	0.048	0.080	0.029	0.076	0.087	0.067	0.021	0.021	0.021
H	4.0	/	20100629	X	jun '10	0.051	0.053	0.049	0.264	0.275	0.253	0.040	0.054	0.029
H	4.0	/	20100817	X	aug '10	0.064	0.090	0.046	0.046	0.054	0.039	0.038	0.263	0.005
H	4.0	/	20101005	X	okt '10	0.034	0.035	0.033	0.032	0.033	0.030	0.119	0.385	0.096
H	4.0	/	20101123	X	nov '10	0.024	0.027	0.020	0.030	0.038	0.028	0.016	0.024	0.006
H	4.0	/	20110111	X	jan '11	0.017	0.028	0.010	0.020	0.022	0.018	0.005	0.005	0.005

4 Overleving en reproductie van driedoornige stekelbaarzen in rwzi-zuiveringsmoerassen

Edwin Foekema IMARES, afdeling milieu
Gerrit Hoornsman IMARES, afdeling milieu
Arnold Bakker IMARES, afdeling milieu



4.1 Samenvatting

1. Beschrijving van de metingen

Op alle bemonsteringsposities bij alle rwzi's zijn experimentele vijvers (mesocosms) met een inhoud van ca. 2.5 m geplaatst en voorzien van een continue aanvoer van effluent uit het zuiveringsmoeras. In elke mesocosm zijn 5 mannelijke en 10 vrouwelijke volwassen driedoornige stekelbaarzen (F0-generatie) uitgezet. De nakomelingen van deze vissen (de F1-generatie) bleven in de mesocosms. Het volgend voorjaar zijn van deze F1-groep 5 mannen en 10 vrouwen overgeplaatst naar mesocosms met 'schoon' Markermeer water om het reproductiesucces te bepalen. Op deze manier kon worden vastgesteld of het voortplantingssucces van de F1-generatie is beïnvloed doordat deze vissen tijdens geboorte en opgroeien continue blootgesteld zijn geweest aan effluent uit het zuiveringsmoeras. De resterende vissen werden opgeofferd ten bate van de 'genomics' analyse (zie rapport 5) en voor de bepaling van de conditiefactor.

2. Belang van de metingen

Hormoonverstoring van vissen als gevolg van stoffen uit rwzi-effluenten is ook in Nederland aangetoond. In laboratorium onderzoek is vastgesteld dat vissen vooral gevoelig zijn voor dergelijke verstoring wanneer zij worden blootgesteld gedurende de eerste levensfasen. Dit zou dan kunnen leiden tot lichamelijke en gedragsafwijkingen, met verminderd voortplantingssucces tot gevolg. Omdat in zuiveringsmoerassen intrek van vissen niet per definitie onmogelijk is en soms zelfs gestimuleerd wordt, is het van belang om te weten of dit tot ongewenste effecten kan leiden. Het onderzoek is uitgevoerd met de driedoornige stekelbaars, omdat dit deze soort zeer geschikt is voor onderzoek naar hormoonverstoring, een korte levenscyclus heeft en een natuurlijke bewoner van moerassystemen in Nederland kan zijn.

Met de proefopzet wordt de situatie gesimuleerd waarbij volwassen stekelbaarzen de zuiveringsmoerassen binnen trekken en zich daar op verschillende plaatsten voortplanten. De jongen groeien op dezelfde locaties op en verlaten vlak voor het nieuwe paaiseizoen het moeras om zich elders voort te planten.

3. Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De resultaten laten zien dat uitgezette stekelbaarzen op alle posities bij alle rwzi's kunnen overleven en tot voortplanting komen. De hoge sterfte echter die tussen oktober 2010 en april 2011 optrad bij rwzi land van Cuijk op posities 1 tot en met 3 suggereert dat periodiek de effluentkwaliteit de overleving van vissen in gevaar kan brengen, zonder dat de oorzaak van de sterfte kon worden vastgesteld.

In rwzi Grou en Hapert op positie 1 opgegroeide stekelbaarzen bleken zich met succes voort te planten. Verschillen die werden gevonden tussen de verschillend blootgestelde populaties waren voornamelijk terug te voeren op het voedselaanbod en suggereerden geen effect van toxische stoffen in het effluent. Op basis van deze gegevens kan niet worden uitgesloten dat het voortplantingssucces van individuele vissen beïnvloed is door stoffen uit het effluent, echter dit leidde niet tot effecten op de populatie ontwikkeling. Wegens eerder genoemde sterfte bij rwzi land van Cuijk kon hier geen indruk van het reproductiesucces worden verkregen.

4. Draagt het zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

Het in deze studie vastgestelde milieurisico van het effluent lijkt te worden bepaald door periodiek optredende afwijking van de effluentkwaliteit. Hoewel de oorzaak niet is aangetoond zou dit de sterfte onder de stekelbaarzen bij rwzi Land van Cuijk op posities 1 tot en met 3 kunnen verklaren. Op positie 4 vond in dezelfde periode geen noemenswaardige sterfte plaats. Dit zou erop duiden dat het zuiveringsmoeras een dempende werking heeft op toxische pieken.

5. Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Het moerassysteem lijkt een bufferende werking te hebben en verminderd de kans dat effluent van mindere kwaliteit, bijvoorbeeld door tijdelijk disfunctioneren van de zuivering, direct op het oppervlaktewater geloosd wordt. Welke processen bij deze buffering een rol spelen is niet duidelijk, maar in elk geval lijkt het belangrijk dat het zuiveringsmoeras een voldoende lange verblijftijd heeft.

4.2 Achtergrond van de toegepaste meettechnieken

Het vermogen van een (vis)populatie om zich te handhaven wordt uiteindelijk bepaald door het reproductie succes. Dit kan op verschillende manieren worden beïnvloed door externe omstandigheden. Verhoogde sterfte leidt direct tot een reductie van het aantal dieren dat aan het reproductieproces kan deelnemen. Aantasting van groei en/of ontwikkeling zal tot gevolg hebben dat individuen later geslachtsrijp zijn en dan mogelijk minder (levensvatbare) nakomelingen zullen produceren. Veranderingen in (voortplantings)gedrag kunnen ook leiden tot een minder succesvolle voortplanting. In het onderzoek naar de effecten van effluent uit rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's), ligt de focus vooral op aantasting van ontwikkeling en gedrag, waarbij de in het effluent veelvuldig aangetoonde hormoonverstorende stoffen als hoofdoorzaak worden gezien. In laboratorium experimenten is het causale verband tussen blootstelling aan vooral vrouwelijke, hormonen en vervrouwelijking van mannelijke vissen duidelijk aangetoond. De meest opvallende effecten zijn dan de productie van het vrouwelijke dooierewit vitellogenine (VTG) door mannelijke vissen, de vorming van deels vrouwelijke gonaden (intersex) en verandering van het mannelijk gedrag. De sterkste effecten worden gemeten wanneer de hormoonverstoring ontstaat tijdens de ontwikkeling van de visembryo's tot een juveniele vis ((Hahlbeck, Griffiths et al. 2004). Verstoring van de hormoonhuishouding tijdens deze levensfase kan leiden tot irreversibele veranderingen in de fysiologie van de vis, die later tot uitdrukking kunnen komen. Bijvoorbeeld in een verminderd voortplantingssucces (Maunder, Matthiessen et al. 2007), (Coe, Soffker et al. 2010; Harris, Hamilton et al. 2011; Sebire, Katsiadaki et al. 2011).

Ook in het Nederlandse oppervlaktewater zijn vissen aangetroffen met aanwijzingen van een verstoorde hormoonhuishouding. In vergelijking met het Verenigd Koninkrijk ((Tyler and Jobling 2008) lijkt het effect van hormoonverstorende stoffen op Nederlandse vispopulaties beperkt. Binnen het LOES project werd aangetoond dat brasems van verschillende locaties verhoogde VTG gehalten in het bloed hadden. De hoogste waarden werden gemeten in het bloedplasma van vissen uit het riviertje de Dommel, stroomafwaarts van het lozingspunt van rwzi Eindhoven. Dit was de enige locatie waar uit histologisch onderzoek een aanzienlijk percentage (33–43 %) intersex werd vastgesteld (Vethaak et al 2002). De Dommel kan dan ook als worst-case situatie worden beschouwd omdat zeker gedurende de zomermaanden het aandeel effluent in deze regenrivier hoog kan zijn.

Het is onduidelijk in hoeverre het voortplantingssucces van deze en andere populaties door deze hormoonverstoring wordt beïnvloed. Dit is in het veld moeilijk vast te stellen doordat de conditie en voortplanting van vispopulaties door veel factoren worden beïnvloed ((Ali and Wootton 1999; Pottinger, Cook et al. 2011; Pottinger, Cook et al. 2011) en er zelden sprake is van geïsoleerde populaties.

Nog sterker dan de bovengenoemde rivier de Dommel kan een waterharmonica beschouwd worden als een worst-case situatie. Het water in de harmonica bestaat immers voor 100% uit rwzi-effluent en wordt hooguit verdund tijdens regenval. Dit zou in potentie een negatief effect kunnen hebben op vispopulaties die zich in de waterharmonica bevinden en/of voortplanten zoals beoogd wordt met de bij rwzi Grou aangelegde paaivijver. Om dit te onderzoeken zijn in het project WIPE stekelbaarsjes blootgesteld in kunstmatige vijvers. Omdat vooral blootstelling tijdens de eerste levensfase voor hormoonverstoring van belang is, was het onderzoek vooral gericht op het voortplantingssucces van de tweede (F1) generatie. Dus van de vissen die geboren en opgegroeid zijn onder continue blootstelling van het rwzi effluent.

Voor de driedoornige stekelbaars is gekozen omdat het een inheemse Nederlandse soort is die ook van nature goed in moerassystemen kan overleven. De stekelbaars heeft een korte generatietijd en is betrekkelijk eenvoudig te houden en tot voortplanting te brengen. Bovendien heeft deze soort een complex territorium en voortplantingsgedrag dat gevoelig is voor hormonale verstoring. Om deze reden wordt de stekelbaars veelvuldig gebruikt als model organisme in onderzoek naar hormoonverstorende stoffen ((Hahlbeck, Griffiths et al. 2004; Hahlbeck, Katsiadaki et al. 2004; Maunder, Matthiessen et al. 2007; Allen, Katsiadaki et al. 2008; Sebire, Katsiadaki et al. 2011).



Figuur 4-1 Een mannelijke stekelbaars in paakleed (roodgekleurd) tussen 7 vrouwelijke stekelbaarzen, waarvan sommige zichtbaar kuit dragen, gefotografeerd in één van de mesocosms in Den Helder in mei 2011.

4.3 Materiaal en methoden

4.3.1 Algemene proefopzet

Op alle vier de bemonsteringsposities bij elke rwzi werd een polyester bak geplaatst met een diameter van ca. 2 m en een diepte van ca. 1 m (volume ca. 2.5 m³). Op die posities die vrij toegankelijk zijn voor publiek werden de bakken binnen kooien geplaatst. De randen van bakken zonder kooi waren bespannen met koorden om te voorkomen dat (visetende)vogels de bakken zouden bezoeken.

Elke bak werd continue doorspoeld met water dat op de bemonsteringspositie uit het zuiveringsmoeras werd gepompt met een debiet van ca. 60 l/uur. Het water in de bakken werd continue belucht door twee beluchtingspompjes om zuurstofloosheid te voorkomen. In elke bak werden een vijftal aan de onderzijde verzwaarde bossen waterplanten (aarvederkruid, *Myriophyllum spicatum*) geplaatst om schuil- en nestgelegenheid te creëren voor de 5 mannelijke en 10 vrouwelijke adulte driedoornige stekelbaarsjes die als laatste in elke bak werden uitgezet. Het lopen van de lucht en waterpompjes werd enkele malen per week gecontroleerd door medewerkers van de desbetreffende rwzi, die tevens instructies had gekregen om de aanwezigheid van dode vissen te noteren en bij meer dan een individueel geval contact op te nemen met IMARES.



Figuur 4-2 Mesocosms opgesteld bij rwzi Land van Cuijk op posities 1 en 4.

4.3.2 Seizoen 2009-2010

Alle stekelbaarzen die bij de verschillende rwzi's werden uitgezet zijn als één batch gevangen in het brakke water juist na de sluizen van Den Helder. Het betrof adulte stekelbaarzen die vanuit zee migreerden om zich in zoetwater voort te planten. Direct na de vangst zijn zij naar een vijver bij het laboratorium van IMARES in Den Helder getransporteerd alwaar zij in enkele dagen werden geacclimatiseerd aan zoetwater. In mei van het jaar 2009 werden de bakken voorzien van 5 mannelijke en 10 vrouwelijke stekelbaarzen.

In oktober 2009 werden de bakken bemonsterd en zijn de aanwezige jongen (F1-generatie) en ouderdieren (F0-generatie) uit de bakken verzameld. Per bak werden de 40 grootse jongen teruggeplaatst, met de intentie dat deze het volgend voorjaar de volgende generatie (F2-generatie) zouden produceren. De resterende jongen werden geteld, gemeten en gewogen. Zodat de conditiefactor (CF) kon worden bepaald volgens de formule ($CF = \text{gewicht} / \text{Lengte}^3$; {Chellappa, 1995 #12}). Uit de resultaten werd duidelijk dat er in de meeste bakken sprake was van groeiachterstand als gevolg van overbevolking met jongen. Om te voorkomen dat de reproductie in 2010 vooral door deze groeiachterstand zou worden bepaald werd besloten het experiment met enkele aanpassingen in het voorjaar 2010 opnieuw in te zetten.

4.4 Seizoen 2010-2011

In het voorjaar van 2010 werden de bakken schoongemaakt en opnieuw bezet met waterplanten en 5 mannelijke en 10 vrouwelijke stekelbaarzen afkomstig van een nieuwe batch gevangen in het voorjaar 2010 wederom achter de sluizen van Den Helder.

Om overbevolking te voorkomen zijn de ouderdieren ditmaal in juli uit de bakken verwijderd, zodat er geen nieuwe nesten meer konden worden geproduceerd. Tegelijkertijd is toen het aantal jongen per bak teruggebracht naar ca. 80 individuen. In oktober werden de bakken schoongemaakt en zijn de jongen geteld. In april 2011 zijn de bakken voor de laatste maal bemonsterd, waarbij alle aanwezige stekelbaarzen werden verzameld.

Op grond van uiterlijke kenmerken werden de vissen verdeeld in 'man' (eerste aanzet paaikleed), 'vrouw' (eivorming) en 'onbekend'. Per bak werden vervolgens de volgende groepen gecreëerd (indien voldoende individuen aanwezig):

- 10 mannen en 10 vrouwen werden na narcotisering, gedood, gemeten en gewogen waarna de lever werd uitgerepareerd, gewogen en geconserveerd in RNA-later voor genomics onderzoek (zie hoofdstuk 5).
- 5 mannen en 10 vrouwen werden naar Den Helder getransporteerd voor het reproductieonderzoek
- Eventueel resterende vissen werden na narcotisering, gedood en geconserveerd in formaldehyde voor eventueel histopathologisch onderzoek.



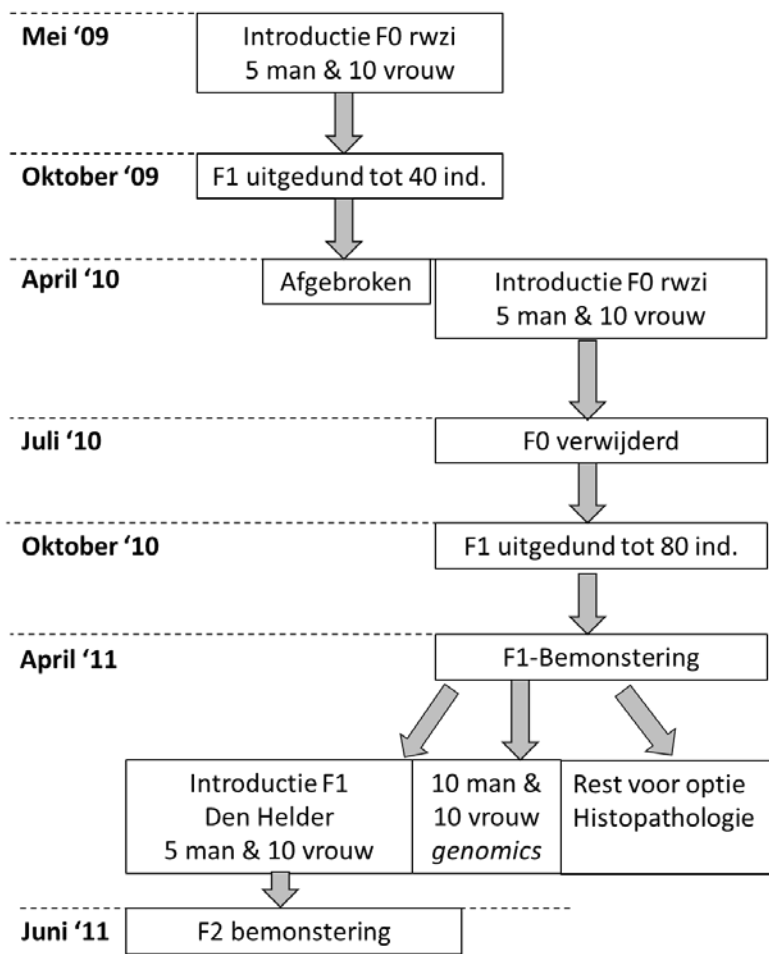
Figuur 4-3 *Overzicht van de mesocosms in Den Helder waarin de F1-generatie uit de verschillende zuiveringsmoerassen werd gehouden om onder gelijke omstandigheden het voortplantingssucces te bepalen.*

De vissen die geselecteerd waren voor het reproductieonderzoek werden op het buitenterrein van IMARES in Den Helder ondergebracht in polyesterbakken van hetzelfde type als waarin zij bij de rwzi's verbleven (Figuur 4-3). De bakken waren voorzien van een laag schoon sediment voorzien met waterplanten en werden continue belucht met perslucht. Zij werden continue doorspoeld (ca. 60 L/h) met water afkomstig uit het Markermeer dat gecirculeerd werd via een centraal verzamelpunt. Op deze wijze werd verzekerd dat de waterkwaliteit in alle bakken vergelijkbaar was.

Driemaal per week werd aan elke bak een gelijke hoeveelheid levende watervlooien, afkomstig uit een kunstmatige vijver toegevoegd als aanvulling op het voedsel dat de bakken zelf genereren in de vorm van insectenlarven en wormen.

Op 7 juni 2011 zijn de bakken leeggepompt en werden alle aanwezige vissen verzameld, genarcotiseerd, gedood, geteld en gemeten.

Het tijdspad van de experimenten tussen 2009 en 2011 is schematisch weergegeven in Figuur 4-4.



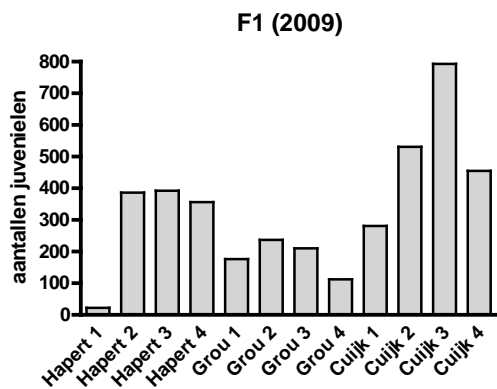
Figuur 4-4 Schematische weergave van het tijdspad van de blootstellingsexperimenten met stekelbaarzen

4.5 Resultaten

4.5.1 Seizoen 2009-2010

Bij de bemonstering in oktober 2009 werden in alle bakken F1-stekelbaarzen aangetroffen. De aantallen per bak vertoonden een grote variatie met als maximum aantal 793 exemplaren op positie Cuijk 3 (Figuur 4-5). Op positie Hapert 1 bevatte de bak slechts 22 F1-stekelbaarzen. Bij de bemonstering werden in deze bak echter ook een vijftal siervissen (goudvariant van de rietvoorn) van elk ca. 15 cm gevangen. Deze vissen, die moeten zijn ingezet door een lokale 'grappenmaker', hebben hoogstwaarschijnlijk een groot deel van de jonge stekelbaarzen opgegeten.

In de overige drie bakken op locatie Hapert werden tussen 356 en 386 F1-stekelbaarzjes aangetroffen, op locatie Grou varieerde dit aantal tussen 112 en 237. Op locatie Cuijk werden de hoogste dichtheden gevonden van minimaal 281 en maximaal 793 individuen.

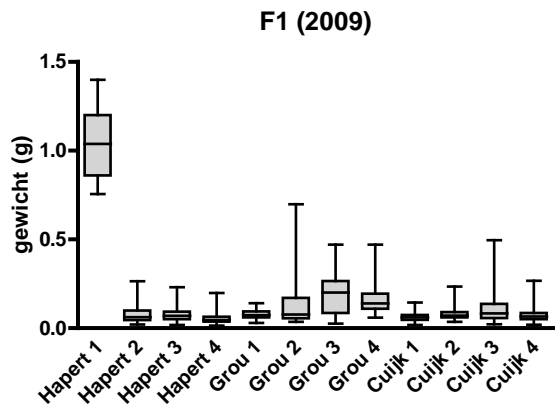


Figuur 4-5 Aantallen jonge (F1-generatie) stekelbaarsjes per bak tijdens de bemonstering in oktober 2009

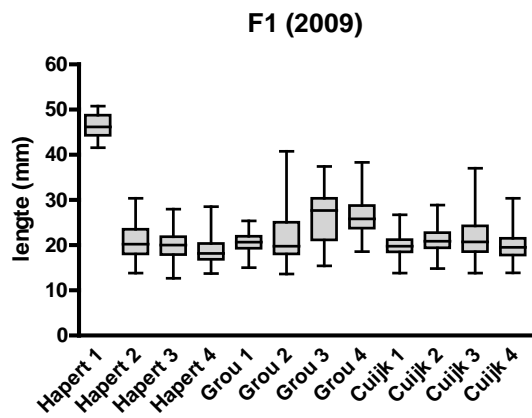
De aangetroffen visjes waren over het algemeen klein met een lichaamslengte tussen 20 en 30 mm bij een gewicht van rond 0.1 gram. Hapert 1 vormde hierop een uitzondering met stekelbaarsjes die bijna twee maal zo groot (Figuur 4-7) en tienmaal zwaarder (Figuur 4-6) waren dan in de andere bakken.

In de bakken waar minder dan 250 juvenielen werden aangetroffen blijkt een relatie te bestaan tussen de aantallen vissen en de lichaamslengte (Figuur 4-8). Hoe lager de dichtheid hoe groter de vissen. Bij dichtheden boven de 250 was deze dichtheidsafhankelijkheid niet meer zichtbaar en waren alle vissen relatief klein.

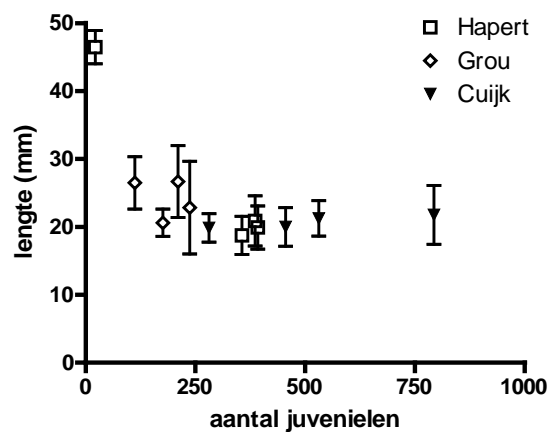
De mediane conditiefactor ligt op alle locaties globaal tussen 0.5 en 1 en vertoont geen relatie met de dichtheden en/of de grootte van de vissen. In deze fase van het leven/seizoen wordt alle energie aangewend voor groei. Omdat nog geen vetreserves worden aangelegd of geïnvesteerd wordt in de productie van voortplantingsproducten, blijven de vissen mager. Dit komt tot uiting in een relatief lage conditiefactor. Deze gegevens suggereren dat de groei van de F1-generatie in elk bakken, mogelijk met uitzondering van Hapert 1, geremd werd door voedselgebrek.



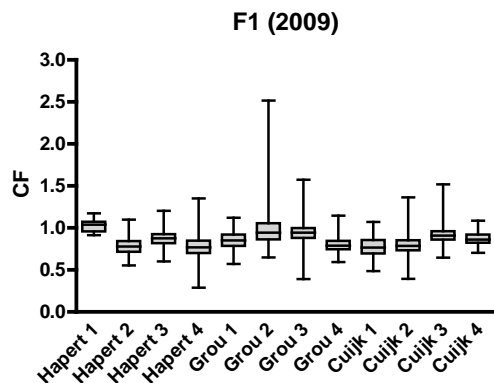
Figuur 4-6 Lichaamsgewicht van de jonge (F1-generatie) stekelbaarsjes per bak tijdens de bemonstering in oktober 2009



Figuur 4-7 Lichaamslengte van de jonge (F1-generatie) stekelbaarsjes per bak tijdens de bemonstering in oktober 2009



Figuur 4-8 Lichaamslengte van de F1 stekelbaarzen op oktober 2009 uitgezet als functie van de dichtheid.



Figuur 4-9 Conditiefactoren van de jonge (F1-generatie) stekelbaarsjes per bak tijdens de bemonstering in oktober 2009

4.5.2 Seizoen 2010-2011

F1-generatie

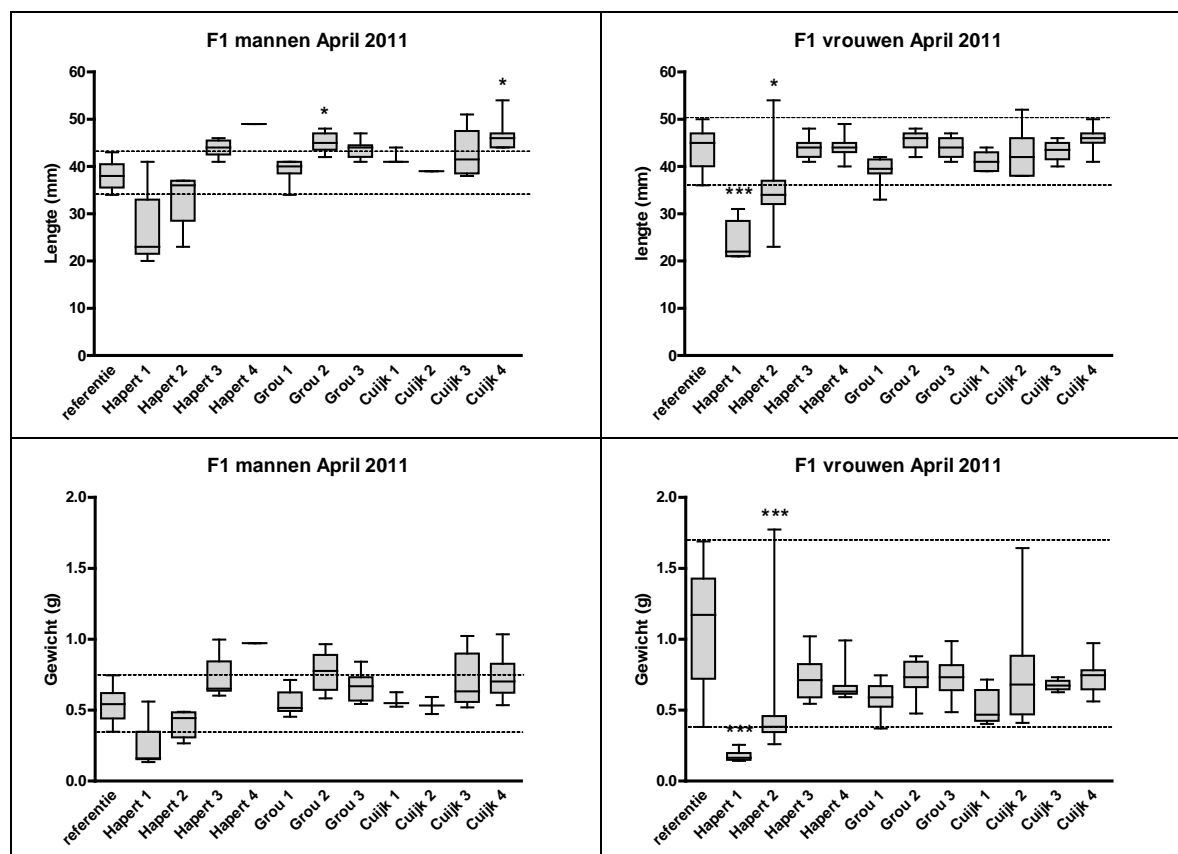
Nadat in Juli 2010 de ouderdieren waren verwijderd en het aantal jongen was teruggebracht naar ca. 80 individuen werden de bakken in oktober van datzelfde jaar bemonsterd. In de meeste bakken werden tenminste 59 stekelbaarsjes aangetroffen. Uitzonderingen hierop waren Hapert 1, Hapert 4 en Cuijk 1 waar de overleving sinds juli minder was (Tabel 4-1). Op positie Grou 4 was door een technisch mankement de elektriciteitsvoorziening uitgevallen en bleken helemaal geen vissen meer in leven. In geen van de bakken is, anders dan incidenteel, sterfte van de vissen gesignaleerd.

Tijdens de laatste bemonstering in April 2011 lag het overlevingspercentage sinds oktober 2010 voor de meeste bakken boven 70%. Opvallend lage overleving (10-26%) werd gevonden op posities Cuijk 1, 2 en 3. Terwijl op positie 4 de sterfte nihil was. Ook op positie Hapert 2 was de overleving met 45% lager dan in de meeste bakken.

Wanneer alle vissen uit alle bakken worden samengenomen was het aandeel mannen, vrouwen en vissen met (nog) niet ontwikkelde uiterlijke geslachtskenmerken gelijk verdeeld. Per bak lag deze verdeling anders. Op posities Hapert 4 en Cuijk 1 kon het geslacht van de vissen niet worden bepaald op basis van uiterlijke kenmerken. Van Hapert 2 en Cuijk 2, 3 en 4 was de sexe van alle vissen te bepalen. De man/vrouw verdeling varieerde van bijvoorbeeld 19/81% in Hapert 2 tot 70/30% in Cuijk 3, zonder dat er een duidelijke relatie zichtbaar was met de locatie of positie.

Tabel 4-1 Aantallen F1-stekelbaarzen per bak in juli 2010, in oktober 2010 en in april 2011 en de verdeling van de geslachten op basis van uiterlijke kenmerken tijdens de bemonstering in april 2011. '≈' betekent dat de aantallen betrouwbaar geschat zijn.

	Juli 2010 Aantal	Okt 2010 Aantal	April 2011 Overleving	April 2011 sexe verdeling		
				Man	Vrouw	Onduidelijk
Referentie	≈80	59	56 (95%)	63%	38%	0%
Hapert 1	≈80	50	39 (78%)	38%	13%	49%
Hapert 2	≈80	80	36 (45%)	19%	81%	0%
Hapert 3	≈80	60	57 (95%)	63%	25%	30%
Hapert 4	≈80	30	28 (93%)	0%	0%	100%
Grou 1	≈80	80	71 (89%)	25%	25%	49%
Grou 2	≈80	66	66 (100%)	24%	26%	50%
Grou 3	≈80	79	56 (71%)	27%	36%	73%
Grou 4	≈80	0	nvt	nvt	nvt	nvt
Cuijk 1	≈80	≈35	9 (≈26%)	0%	0%	100%
Cuijk 2	≈80	≈70	7 (≈10%)	14%	86%	0%
Cuijk 3	≈80	≈70	10 (≈14%)	70%	30%	0%
Cuijk 4	≈80	≈70	74 (≈106%)	35%	65%	0%

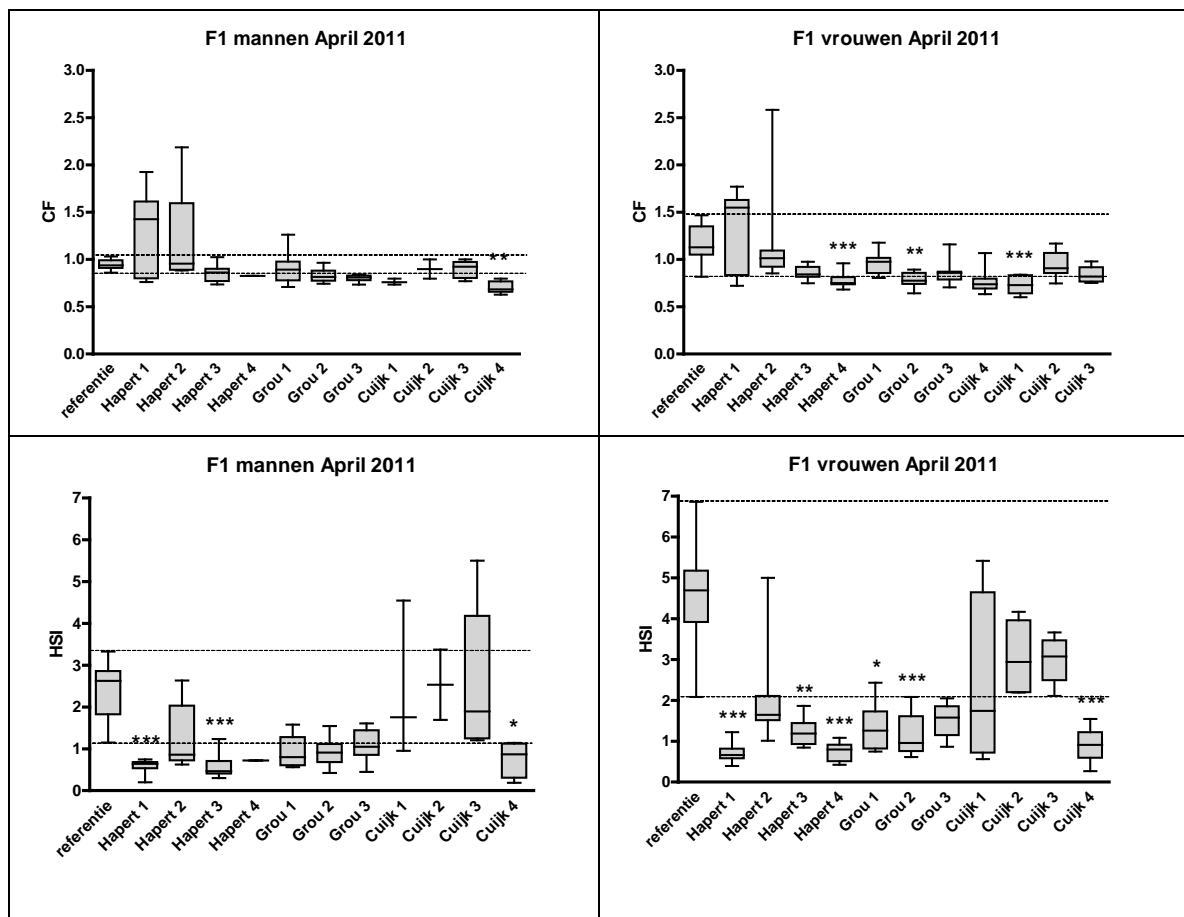


Figuur 4-10: Lengte (boven) en gewicht (onder) van de F1-stekelbaarzen in April 2011. De horizontale lijnen geven de range van de waarnemingen in de referentie bak weer. Significante verschillen met de referentiebak zijn aangegeven met '*' ($p < 0.05$), '**' ($p < 0.01$) en '***' ($p < 0.001$)

De lengte van de meeste F1-stekelbaarzen in april 2011 lag tussen 35 en 50 mm (Figuur 4-10). In de referentie bak waren de vrouwelijke vissen met een gemiddelde lengte van 44 mm significant groter dan de mannelijke (38 mm). In alle andere bakken waren lengte van mannelijke en vrouwelijke vissen gelijk. Op posities Hapert 1 en Hapert 2 waren de vissen gemiddeld kleiner dan in de referentie bak. Dit verschil was voor de vrouwelijke vissen statistisch significant. Voor alle overige bakken lagen de lengtes van de vrouwelijke vissen in de zelfde range als in de referentie bak.

De lengte van de mannelijke vissen bleef in 7 van de 11 rwzi-bakken aan de bovengrens te liggen van de waarden uit de referentie bak. In Cuijk 4 en Grou 2 was dit ook statistisch significant. Uitzonderingen hierop waren Grou 1 en Cuijk 2, waarvan de lengte in dezelfde range lag als in de referentie en de hierboven reeds genoemde bakken Hapert 1 en Hapert 2.

Het gewicht van de mannen lag rond de 0.5 g per individu en verschilde niet significant tussen de rwzi bakken en de referenties (Figuur 4-10). Bij de vrouwen bestonden grote verschillen in lichaamsgewicht tussen individuen en bakken. Dit is het gevolg van verschillen in de ontwikkeling van kuit tussen individuele vissen, waardoor het lichaamsgewicht met een factor twee of meer kan toenemen. Dit leidt in de referentiebak tot een brede range in lichaamsgewichten van 0.5 tot 1.7 gram. Ondanks deze brede range zijn de vissen uit de bakken Hapert 1 en Hapert 2 significant lichter.



Figuur 4-11: *Conditie factor* ($CF = \text{gewicht} / \text{lengte}^3 \times 10^5$) en *hepatosomatische index* ($HSI = \text{levergewicht} \times 100 / \text{lichaamsgewicht}$) van de F1-stekelbaarzen in April 2011

De conditiefactor van de mannen uit de referentiebak lag rond de 1 en vertoonde nauwelijks spreiding tussen individuen (Figuur 4-11). Ook in de meeste andere bakken was de spreiding zeer gering. Uitzonderingen waren Hapert 1 en 2, waarbij vissen met een relatief hoge conditiefactor een grotere spreiding veroorzaakten, echter zonder dat dit tot significante verschillen met de referentie vissen leidde. De waarden van alle andere bakken bevonden zich tegen de ondergrens van de referentie. In bak Cuijk 4 was de conditiefactor van de mannelijke stekelbaarzen significant lager dan in de referentie bak.

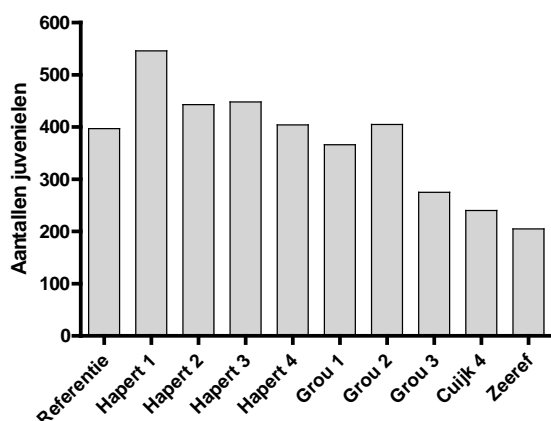
Ook bij de vrouwelijke vissen lag het merendeel van de conditiefactoren tegen de ondergrens van de waarden uit de referentie bak. Net als bij de mannen was de variatie tussen individuele vissen in Hapert 1 en Hapert 2 het grootst. Vissen uit Hapert 4, Grou 2 en Cuijk 1 hadden een significant lagere conditiefactor ten opzichte van de referentiebak.

De lever somatische index (hepatosomatische index: HSI, Figuur 4-11) vertoonde een sterke variatie tussen individuele vissen en bakken. De waarden gemeten bij de mannen en zeker bij de vrouwen uit de referentiebak waren relatief hoog. Dit werd in de bakken Cuijk 1, 2 en 3 en in minder mate Hapert 2, min of meer geëvenaard. In alle andere bakken lag de HSI op een lager niveau. Dit verschil was voor de vrouwelijke vissen in al deze bakken significant. In Hapert 1, Hapert 3 en Hapert 4 was dit ook voor de mannelijke vissen het geval.

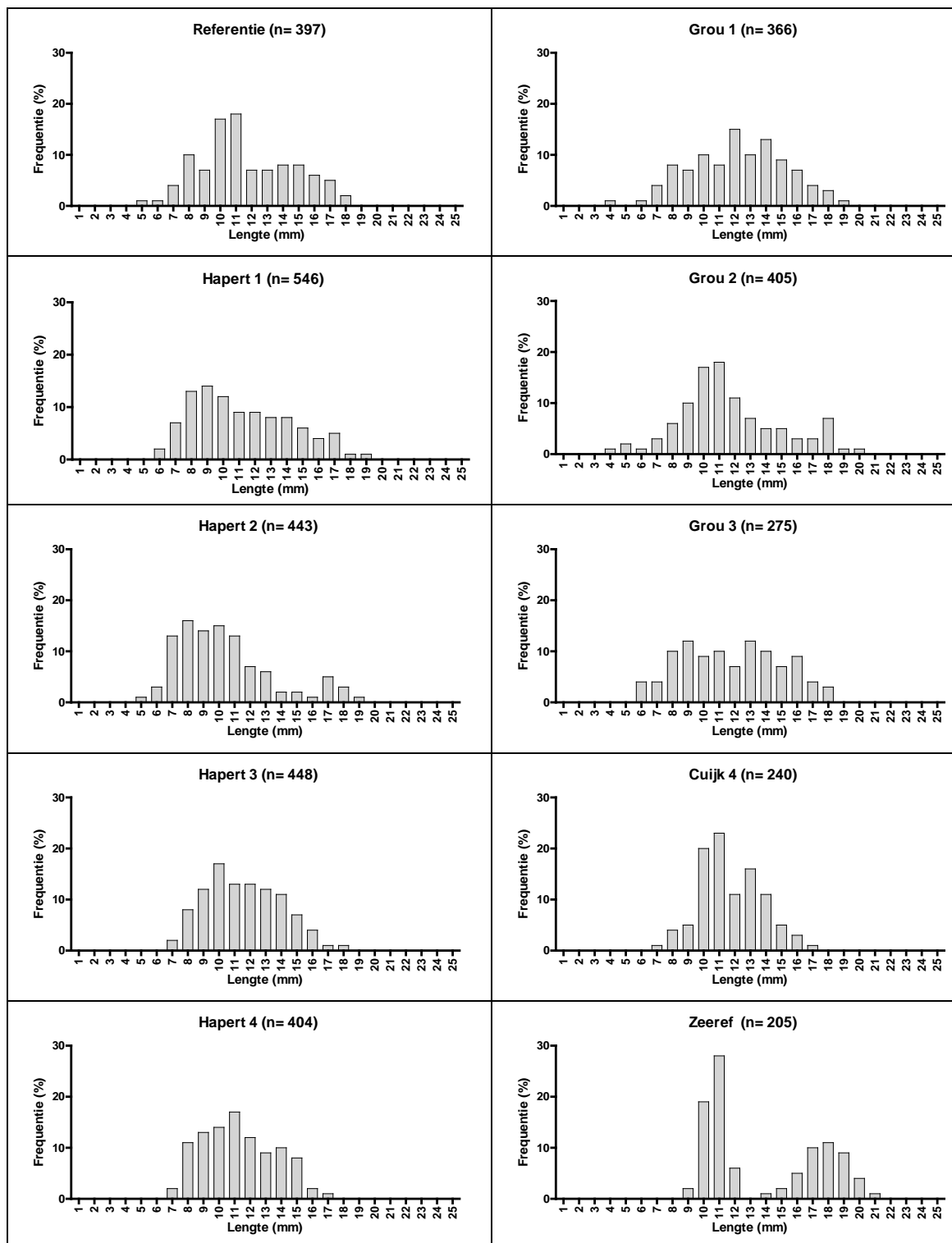
F2-generatie

De F1-vissen die waren uitgezet in Den Helder plantten zich in alle bakken met succes voort. De aantallen jongen (F2-generatie) die bij de eindbemonstering in juni 2011 per bak werden aangetroffen varieerden van 205 (Zeeref) tot ruim 546 (Hapert 1) exemplaren (Figuur 4-12).

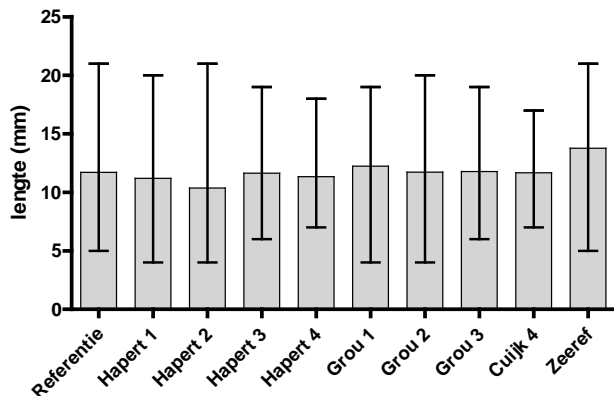
In de lengte frequentieverdeling van de jongen zijn verschillende cohorten (pieken) te herkennen (Figuur 4-13). Echter, deze cohorten overlappen sterk, waardoor het niet mogelijk is om uit deze gegevens een betrouwbare indruk te krijgen van het aantal nesten dat per bak is opgegroeid. In elk geval is uit observaties duidelijk dat er in alle bakken meerdere nesten zijn uitgekomen. Dit proces ging door tot op het moment dat de bakken werden bemonsterd en in veel bakken werden dan ook vislarven aangetroffen die bij een lengte van ca. 4 mm net het nest hadden verlaten. De grootste vissen hadden een lengte van ca. 2 cm. Er waren geen verschillen tussen de lengte van de vissen in de verschillende bakken (Figuur 4-14).



Figuur 4-12 Aantallen in de mesocosms aanwezige juveniele (F2-generatie) stekelbaarzen in juni 2011



Figuur 4-13: Relatieve lengte-frequentie histogrammen van de in de mesocosms aanwezige juveniele (F2-generatie) stekelbaarzen in juni 2011



Figuur 4-14 Gemiddelde, minimum en maximum lengte van de juveniele (F2) stekelbaarzen in de verschillende mesocosms in juni 2011.

4.6 Discussie

Op alle posities bij alle rwzi's bleken de F0-stekelbaarzen in staat zich succesvol voort te planten. Dit was zowel in 2009 als in 2010 het geval. Tijdens het 2009-2010 experiment werden geen aanwijzingen gevonden dat de effluentkwaliteit een directe negatieve invloed had op de overleving van de jongen (de F1-generatie). De hoeveelheid beschikbaar voedsel in de bak was hoogstwaarschijnlijk de meest kritische factor die de conditie van de F1-generatie in 2009 bepaalde. Het voedselaanbod op een kritische moment is dan ook hoogstwaarschijnlijk de oorzaak van de verschillen in de aantallen F1-vissen die in oktober 2009 in de bakken werden aangetroffen. Dit zou erop duiden dat het voedselaanbod bij rwzi Grou lager is geweest dan bij rwzi Hapert en Cuijk. Er zijn echter geen metingen gedaan waardoor dit geverifieerd kan worden. Door de sterfte die tijdens dit kritische moment moet zijn opgetreden, konden de overlevende vissen profiteren, waardoor de lengte van de F1-vissen in oktober 2010 groter is naarmate er minder overlevenden zijn.

In de periode 2010-2011 was de overleving van de F1-generatie in een aantal bakken beperkt. Op positie Grou 4 was dit het gevolg van haperende technische installatie, waardoor waarschijnlijk zuurstofgebrek is opgetreden. Op posities Cuijk 1, 2 en 3 werd ook hoge sterfte waargenomen tussen oktober 2010 en april 2011, terwijl zich hier geen technische problemen voordeden. Het gegeven dat de sterfte vergelijkbaar is op posities 1, 2 en 3 en zich op positie 4 niet meer voordoet, doet vermoeden dat de oorzaak vanuit de rwzi is aangevoerd. De monitoringgegevens van de effluentkwaliteit geven echter geen aanwijzingen dat de zuivering in die periode minder heeft gefunctioneerd. Op positie 4 doet de sterfte zich niet meer voor. Dit zou erop duiden dat de oorzaak in de loop door het zuiveringsmoeras is verdund of verdwenen. Een soortgelijke afvlakking van toxische pieken bij passage door het zuiveringsmoeras is ook met de in-vivo testen aangetoond (zie Hoofdtuk 4).

De conditie van de F1-vissen die tijdens de bemonsteringen werden aangetroffen was ogenschijnlijk goed. Op basis van uiterlijke kenmerken zijn nergens groeifwijkingen, misvormingen of indicaties van ziekte of parasitaire infecties aangetroffen. Histopathologisch onderzoek naar meer verborgen gebreken vormde geen onderdeel van de studie.

De conditiefactor van de meeste F1-vissen, lag in oktober 2010 iets lager dan in april 2011 maar bereikte zelden waarden boven 1. Voor mannelijke driedoornige stekelbaarzen uit het veld zijn conditiefactoren gerapporteerd die gedurende een jaar variëren tussen 1.2 en 1.4 (Chellappa, Huntingford et al. 1995). Dit geeft aan dat 'onze' vissen in het algemeen minder goed doorvoed waren dan deze vissen. Uitzonderingen hierop vormden een deel van de vissen van posities Hapert 1 en Hapert 2 waar door de mannen in april 2011 wel vergelijkbare conditiefactoren bereikt werden. Opvallend is dat de vissen op deze posities relatief klein waren. Mogelijk

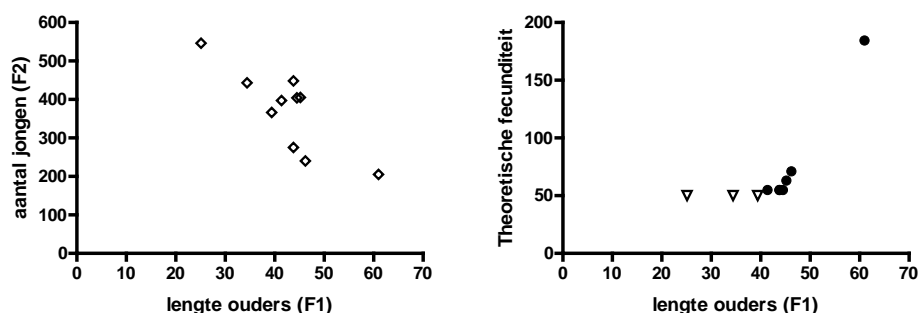
waren zij hierdoor eerder in staat de conditiefactor te verhogen bij een gelimiteerd voedselaanbod dan grotere exemplaren.

De leversomatische-index (HSI) kan worden beschouwd als indicatief voor de energiereserve van de vis ((Chellappa, Huntingford et al. 1995),(Rinchar and Kestemont 2003). ((Chellappa, Huntingford et al. 1995) vonden HSI-waarden in mannelijke stekelbaarzen uit het veld die varieerden tussen 2 en 3, wat goed overeenkomt met de mannen uit de referentie bak in april 2011. De waarden voor de vrouwelijke referentie vissen lag nog een factor twee hoger. Vergelijkbare hoge HSI-waarden werden ook gevonden bij de vissen van posities Cuijk 1, 2 en 3. Op de andere posities waren de waarden (vaak significant) lager. Ook dit vormt een aanwijzing dat er sprake is geweest van een beperkt voedselaanbod. In de referentie bak werden de vissen met watervlooiën en muggenlarven (bij)gevoerd, in alle andere bakken waren zij aangewezen op voedsel dat met het effluent werd aangevoerd of in de bak zelf geproduceerd werd. Door de hoge sterfte die had plaatsgevonden op posities Cuijk 1, 2 en 3 ontstonden voor de overlevenden betere voedselcondities. Dit zal vooral het geval zijn geweest vanaf het moment dat de watertemperatuur in het voorjaar begon op te lopen. Blijkbaar bestond deze situatie op het moment van bemonsteren in april nog niet zo lang dat dit leidde in een betere conditiefactor voor deze vissen.

De F1-generatie bleek zich in alle gevallen met succes voort te planten in de bakken in Den Helder. Blijkbaar had blootstelling aan het effluent uit de zuiveringsmoerassen vanaf de geboorte het vermogen van de populatie om zich voort te planten niet aangetast. Hoewel er duidelijke verschillen bestaan tussen de aantallen jongen in de verschillende bakken zijn deze niet direct te relateren aan rwzi's of posities in het zuiveringsmoeras.

Zoals bij de meeste vissen, is het aantal eieren dat per vrouwtje geproduceerd kan worden (de fecunditeit) ook bij de stekelbaars positief gecorreleerd met de lengte/gewicht van de vis. Volgens een voor de driedoornige stekelbaars opgestelde formule (Wootton 1973) mag verwacht worden dat de vrouwtjes (gemiddelde lengte 24-46 mm) uit de verschillende bakken met vissen uit de rwzi's en de referentie, tussen de 50 en 100 eieren per legsel geproduceerd hebben. De grotere vissen uit de Zee referentie bak (gemiddelde lengte 60 mm) zouden per legsel tweemaal zoveel eieren produceren. Op basis van deze aantallen en de lengte-frequentie verdelingen van de jongen kan worden geconcludeerd dat in alle bakken sprake is geweest van meerdere legfels.

De aantallen jongen die in de bakken bij de eindbemonstering zijn aangetroffen waren echter geen afspiegeling van de theoretische fecunditeit van de ouders, maar bleken juist negatief gecorreleerd met de lengte van de oudervissen (Figuur 4-15). Dit duidt waarschijnlijk op predatie van de jongen door de ouderdieren. Ongeacht de grootte van de ouders zullen de jongen het door vader beschermde nest verlaten bij een lengte van ca 3-4 mm. Totdat zij bepaalde lengte hebben bereikt vormen de jongen vanaf dat moment een potentiële prooi voor de in dezelfde bak aanwezige volwassen stekelbaarzen. Naarmate deze volwassen vissen groter zijn, duurt het langer voordat de jongen een 'oneetbare' formaat bereikt hebben. De periode waarin de jonge visjes een potentiële prooi vormen neemt dus toe met de lengte van de volwassen vissen in de bak.



Figuur 4-15 Relatie tussen het aantal in de bakken aanwezige jongen (F2 generatie; figuur links) en de theoretische fecunditeit (figuur rechts) en de gemiddelde lengte van de ouders (F1 generatie).

De verschillen in aantallen jongen die tussen de bakken bestaan zijn dus niet te koppelen aan de blootstelling van de oudervissen bij de verschillende rwzi's. Uiteraard moet hierbij de aantekening worden gemaakt dat van rwzi Cuijk alleen van positie 4 voldoende oudervissen aanwezig waren om het reproductiesucces te onderzoeken. In elk geval kan gesteld worden dat blootstelling aan het effluent op positie 4 in geen van de zuiveringsmoerassen leidt tot meetbare verschillen in het voortplantingssucces van de populatie.

Hiermee is niet gezegd dat de blootstelling geen effect op individuele vissen heeft gehad. In studies met blankvoorn (*Rutilus rutilus*) is aangetoond dat mannelijk vissen die onder invloed van blootstelling aan rwzi-effluent lichte vervrouwelijking vertoonden nog normaal aan het reproductieproces deelnamen. Pas bij de gevolgen van sterke hormoonverstoring werd het reproductiesucces aangetast (Lange, Paull et al. 2011). Vanwege individuele verschillen in gevoeligheid en blootstelling zullen er binnen een populatie altijd verschillen blijven bestaan tussen sterk en minder sterk aangetaste individuen. De meer aangetaste individuen zullen een geringer aandeel hebben in het reproductie succes van de populatie, zeker wanneer zij moeten concurreren met niet aangetaste geslachtsgenoten (Harris, Hamilton et al. 2011) (Coe, Soffker et al. 2010).

Op deze manier is een populatie in staat aantasting door bijvoorbeeld hormoon verstorende stoffen te compenseren. Bovendien spelen in de veldsituatie, waarvan de mesocosms een afspiegeling vormden, vele andere factoren een rol waardoor subtiele effecten die in een laboratorium kunnen worden waargenomen niet tot meetbare consequenties leiden.

4.7 Conclusies en aanbevelingen

Suggesteren de metingen een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De gecombineerde gegevens van onderzoeksperioden 2009-2010 en 2010-2011 laten zien dat uitgezette stekelbaarzen op alle posities bij alle rwzi's kunnen overleven en tot voortplanting komen. De hoge sterfte echter die tussen oktober 2010 en april 2011 optrad bij rwzi land van Cuijk op posities 1 tot en met 3 suggereert dat periodiek de effluentkwaliteit de overleving van vissen in gevaar kan brengen, zonder dat de oorzaak van de sterfte kon worden vastgesteld.

In rwzi Grou en Hapert op positie 1 opgegroeide stekelbaarzen bleken zich met succes voort te planten. Verschillen die werden gevonden tussen de verschillende blootgestelde populaties waren voornamelijk terug te voeren op het voedselaanbod en suggereerden geen effect van toxische stoffen in het effluent. Op basis van deze gegevens kan niet worden uitgesloten dat het voortplantingssucces van individuele vissen beïnvloed is door stoffen uit het effluent, echter dit leidde niet tot effecten op de populatie ontwikkeling. Wegens eerder genoemde sterfte bij rwzi land van Cuijk kon hier geen indruk van het reproductiesucces worden verkregen.

Draagt met zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

Het in deze studie vastgestelde milieurisico van het effluent lijkt te worden bepaald door periodiek optredende afwijking van de effluentkwaliteit. Hoewel de oorzaak niet is aangetoond zou dit de sterfte onder de stekelbaarzen bij rwzi Land van Cuijk op posities 1 tot en met 3 kunnen verklaren. Op positie 4 vond in dezelfde periode geen noemenswaardige sterfte plaats. Dit zou erop duiden dat het zuiveringsmoeras een dempende werking heeft op toxische pieken.

Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Het moerassysteem lijkt een bufferende werking te hebben en verkleint de kans dat effluent van mindere kwaliteit, bijvoorbeeld door tijdelijk disfunctioneren van de zuivering, direct op het oppervlaktewater geloosd wordt. Welke processen bij de buffering een rol spelen is niet duidelijk, maar in elk geval lijkt het belangrijk dat het zuiveringsmoeras een voldoende lange verblijftijd heeft.

4.8 Referenties

- Ali, M. and R. J. Wootton (1999). "Effect of variable food levels on reproductive performance of breeding female three-spined sticklebacks." *Journal of Fish Biology* 55(5): 1040-1053.
- Allen, Y. T., I. Katsiadaki, et al. (2008). "Intercalibration exercise using a stickleback endocrine disrupter screening assay." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(2): 404-412.
- Chellappa, S., F. A. Huntingford, et al. (1995). "CONDITION FACTOR AND HEPATOSOMATIC INDEX AS ESTIMATES OF ENERGY STATUS IN MALE 3-SPINED STICKLEBACK." *Journal of Fish Biology* 47(5): 775-787.
- Coe, T. S., M. K. Soffker, et al. (2010). "Impacts of Early Life Exposure to Estrogen on Subsequent Breeding Behavior and Reproductive Success in Zebrafish." *Environmental Science & Technology* 44(16): 6481-6487.
- Hahlbeck, E., R. Griffiths, et al. (2004). "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption - I. Sexual differentiation." *Aquatic Toxicology* 70(4): 287-310.
- Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, et al. (2004). "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption - II - kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction." *Aquatic Toxicology* 70(4): 311-326.
- Harris, C. A., P. B. Hamilton, et al. (2011). "The Consequences of Feminization in Breeding Groups of Wild Fish." *Environmental Health Perspectives* 119(3): 306-311.
- Lange, A., G. C. Paull, et al. (2011). "Implications of Persistent Exposure to Treated Wastewater Effluent for Breeding in Wild Roach (*Rutilus rutilus*) Populations." *Environmental Science & Technology* 45(4): 1673-1679.
- Maunder, R. J., P. Matthiessen, et al. (2007). "Impaired reproduction in three-spined sticklebacks exposed to ethinyl estradiol as juveniles." *Biology of Reproduction* 77(6): 999-1006.
- Pottinger, T. G., A. Cook, et al. (2011). "Effects of sewage effluent remediation on body size, somatic RNA: DNA ratio, and markers of chemical exposure in three-spined sticklebacks." *Environment International* 37(1): 158-169.
- Pottinger, T. G., A. Cook, et al. (2011). "Indices of stress in three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* in relation to extreme weather events and exposure to wastewater effluent." *Journal of Fish Biology* 79(1): 256-279.
- Rinchar, J. and P. Kestemont (2003). "Liver changes related to oocyte growth in roach, a single spawner fish, and in bleak and white bream, two multiple spawner fish." *International Review of Hydrobiology* 88(1): 68-76.
- Sebire, M., I. Katsiadaki, et al. (2011). "Short-term exposure to a treated sewage effluent alters reproductive behaviour in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)." *Aquatic Toxicology* 105(1-2): 78-88.
- Tyler, C. R. and S. Jobling (2008). "Roach, Sex, and Gender-Bending Chemicals: The Feminization of Wild Fish in English Rivers." *Bioscience* 58(11): 1051-1059.
- Vethaak, A.D.; Rijs, G.B.J.; Schrap, S.M.; Ruiter, H.; Gerritsen, A.; Lahr, J. (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the netherlands. RIZA/RIKZ-report, 2002(1). RIZA: Lelystad. ISBN 9036954010
- Wootton, R. J. (1973). "FECUNDITY OF 3-SPINED STICKLEBACK, *GASTEROSTEUS-ACULEATUS* (L)." *Journal of Fish Biology* 5(6): 683-688.

Bijlage: Lengte, lichaams- , levergewicht en sexe op basis van inwendige organen van de F1 stekelbaarzen in april 2011, gebruikt voor het genomics onderzoek (muv Zeeref).

Positie Hapert 1		8-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
1	22	0.166	1	V
2	22	0.155	1	M
3	21	0.164	1	V
4	31	0.215	2	V
5	22	0.163	1	M
6	22	0.164	2	V
7	24	0.193	1	M
8	21	0.146	1	V
9	40	0.502	1	M
10	41	0.56	4	M
11	23	0.184	1	M
12	21	0.157	1	M
13	20	0.154	1	M
14	21	0.152	1	V
15	24	0.181	1	V
16	21	0.15	1	V
17	30	0.255	1	V
18	26	0.134	1	M
19	23	0.153	1	M
20	27	0.142	1	V

Positie Hapert 2		8-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
1	37	0.481	3	M
2	36	0.469	4	M
3	36	0.418	6	M
4	34	0.347	3	M
5	36	0.398	6	V
6	54	1.773	22	V
7	37	0.488	4	M
8	38	0.507	13	V
9	34	0.357	7	V
10	33	0.382	6	V
11	34	0.396	4	V
12	33	0.364	6	V
13	23	0.266	7	M
14	24	0.357	6	V
15	34	0.409	7	V
16	43	0.74	12	V
17	23	0.26	13	V
18	31	0.31	7	V
19	33	0.331	5	V

Positie Hapert 3		8-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
1	44	0.659	3	M
2	44	0.627	3	M
3	45	0.825	11	V
4	45	0.847	5	M
5	44	0.652	3	M
6	42	0.644	3	M
7	43	0.649	8	M
8	46	0.997	3	M
9	46	0.84	3	M
10	41	0.602	5	M
11	45	0.768	9	V
12	41	0.545	8	V
13	43	0.648	6	V
14	44	0.831	7	V
15	48	1.02	19	V
16	43	0.654	8	V
17	41	0.589	7	V
18	44	0.712	8	V
19	42	0.554	8	V
20	44	0.792	7	V

Positie Hapert 4		8-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
1	43	0.646	7	V
2	49	0.992	7	V
3	49	0.972	7	M
4	47	0.708	3	V
5	44	0.627	5	V
6	40	0.614	5	V
7	45	0.671	7	V
8	42	0.591	3	V
9	43	0.62	5	V
10	43	0.597	4	V
11	44	0.631	3	V
12	45	0.657	6	V

Positie Cuijk 1		5-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
C1.1	41	0.55	25	M
C1.2	41	0.57	5	V
C1.3	39	0.443	24	V
C1.4	44	0.626	11	M
C1.5	41	0.49	19	V
C1.6	44	0.715	4	V
C1.7	42	0.445	10	V
C1.8	41	0.524	5	M
C1.9	39	0.403	5	V

Positie Cuijk 2		5-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
C2.1	52	1.643	36	V kuit
C2.2	39	0.593	20	M
C2.3	46	0.883	35	V kuit
C2.4	42	0.792	33	V
C2.5	38	0.410	9	V kuit
C2.6	41	0.609	14	V
C2.7	38	0.469	18	V
C2.8	42	0.680	20	V
C2.9	39	0.473	8	M

Positie Cuijk 1		5-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
C1.1	41	0.55	25	M
C1.2	41	0.57	5	V
C1.3	39	0.443	24	V
C1.4	44	0.626	11	M
C1.5	41	0.49	19	V
C1.6	44	0.715	4	V
C1.7	42	0.445	10	V
C1.8	41	0.524	5	M
C1.9	39	0.403	5	V

Positie Cuijk 2		5-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
C2.1	52	1.643	36	V kuit
C2.2	39	0.593	20	M
C2.3	46	0.883	35	V kuit
C2.4	42	0.792	33	V
C2.5	38	0.410	9	V kuit
C2.6	41	0.609	14	V
C2.7	38	0.469	18	V
C2.8	42	0.680	20	V
C2.9	39	0.473	8	M

Positie Cuijk 3		5-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
C3.1	43	0.664	8	M
C3.2	40	0.627	18	V
C3.3	51	1.023	21	M
C3.4	39	0.594	17	M
C3.5	38	0.52	9	M
C3.6	46	0.732	24	V
C3.7	44	0.774	10	M
C3.8	40	0.6	33	M
C3.9	44	0.664	14	V
C3.10	43	0.682	25	V

Positie Cuijk 4		5-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
C4.1	46	0.754	7	V
C4.2	45	0.746	5	V
C4.3	48	0.751	2	V
C4.4	47	0.702	8	M
C4.5	50	0.922	10	V
C4.6	47	0.808	11	V
C4.7	46	0.647	10	V
C4.8	47	0.658	6	V
C4.9	45	0.64	6	V
C4.10	44	0.645	5	V
C4.11	54	1.035	9	M
C4.12	44	0.654	2	M
C4.13	45	0.622	7	M
C4.14	41	0.562	5	V
C4.15	47	0.827	9	M
C4.16	47	0.752	2	V
C4.17	45	0.646	9	V
C4.18	44	0.535	1	M
C4.19	46	0.746	4	M
C4.20	45	0.972	5	V

Positie Grou 1		8-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
G1.1	33	0.37	9	V
G1.2	34	0.496	3	M
G1.3	40	0.509	4	M
G1.4	41	0.634	10	M
G1.5	41	0.524	7	M
G1.6	39	0.499	3	M
G1.7	40	0.454	3	M
G1.8	41	0.616	5	M
G1.9	40	0.535	4	V
G1.10	39	0.543	6	M
G1.11	40	0.64	11	V
G1.12	41	0.713	4	M
G1.13	42	0.745	10	V
G1.14	39	0.573	10	V
G1.15	41	0.602	9	V
G1.16	38	0.489	6	M
G1.17	42	0.596	7	V
G1.18	39	0.585	5	V
G1.19	39	0.699	6	V
G1.20	38	0.511	4	V

Positie Grou 2		8-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
G2.1	45	0.812	6	M
G2.2	48	0.965	6	M
G2.3	45	0.878	8	M
G2.4	44	0.713	3	M
G2.5	42	0.583	9	M
G2.6	46	0.683	5	V
G2.7	44	0.661	5	V
G2.8	46	0.776	6	M
G2.9	48	0.901	11	M
G2.10	42	0.476	5	V
G2.11	44	0.655	4	V
G2.12	46	0.869	14	V
G2.13	43	0.591	6	M
G2.14	44	0.664	6	V
G2.15	46	0.842	15	V
G2.16	48	0.88	11	V
G2.17	47	0.768	16	V
G2.18	47	0.773	6	V
G2.19	45	0.692	7	M
G2.20	44	0.732	7	V

Positie Grou 3		8-Apr-11		
code	lengte (mm)	gewicht (g)	gewicht lever (mg)	sexe
G3.1	44	0.668	7	M
G3.2	47	0.841	7	M
G3.3	41	0.559	9	M
G3.4	44	0.703	9	M
G3.5	46	0.761	12	V
G3.6	42	0.573	5	M
G3.7	42	0.544	7	M
G3.8	41	0.486	5	V
G3.9	45	0.762	7	M
G3.10	44	0.672	3	M
G3.11	43	0.646	12	V
G3.12	44	0.732	15	V
G3.13	47	0.817	16	V
G3.14	41	0.612	7	V
G3.15	42	0.623	10	M
G3.16	46	0.796	10	V
G3.17	44	0.987	16	V
G3.18	43	0.693	6	V
G3.19	42	0.64	11	V
G3.20	47	0.891	14	V

Referentie code	lengte (mm)	11-Apr-11		sexe
		gewicht (g)	gewicht lever (mg)	
R1	39	0.555	11	M
R2	37	0.482	14	M
R3	36	0.481	16	M
R4	41	0.686	18	M
R5	41	0.760	42	V
R6	38	0.542	9	M
R7	34	0.348	4	M
R8	35	0.400	11	?
R9	40	0.551	14	M
R10	36	0.381	14	V
R11	46	1.428	67	V kuit
R12	48	1.326	91	V kuit
R13	40	0.672	34	V
R14	47	1.172	50	V
R15	40	0.720	15	V
R16	47	1.429	74	V
R17	45	1.174	46	V
R18	43	0.745	21	M
R19	50	1.689	79	V kuit
R20	44	0.874	45	V

Zeeref code	lengte (mm)	18-Apr-11		sexe
		gewicht (g)	gewicht lever (mg)	
Zeeref 1	66	3.09	niet bepaald	M
Zeeref 2	61	2.81	niet bepaald	M
Zeeref 3	62	2.61	niet bepaald	M
Zeeref 4	64	3.09	niet bepaald	M
Zeeref 5	56	2.02	niet bepaald	M
Zeeref 6	57	2.16	niet bepaald	M
Zeeref 7	61	2.54	niet bepaald	M
Zeeref 8	61	2.73	niet bepaald	M
Zeeref 9	51	1.52	niet bepaald	M
Zeeref 10	57	2.12	niet bepaald	M
Zeeref 11	66	3.27	niet bepaald	V
Zeeref 12	64	3.78	niet bepaald	V kuit
Zeeref 13	64	3.12	niet bepaald	V
Zeeref 14	68	3.86	niet bepaald	V
Zeeref 15	64	2.85	niet bepaald	V
Zeeref 16	67	3.98	niet bepaald	V kuit
Zeeref 17	60	2.37	niet bepaald	V
Zeeref 18	62	3.14	niet bepaald	V
Zeeref 19	59	2.57	niet bepaald	V
Zeeref 20	68	3.98	niet bepaald	V kuit

5 Rol van micro-organismen in rwzi-zuiveringsmoerassen bij de afbraak van estrogenen

Alette Langenhoff¹

Deltares, Utrecht

Met medewerking van

Jasperien de Weert¹

Deltares, Utrecht

Habiba Mizab¹

Deltares, Utrecht

Hans van de Berg²

Wageningen University, Department of Toxicology

Tinka Murk²

Wageningen University, Department of Toxicology



5.1 Samenvatting

1. Beschrijving van de experimenten

In afbraakexperimenten op laboratoriumschaal is het belang van de microbiële activiteit bij de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Cuijk onderzocht. De zuiveringsefficiëntie is in dit geval gebaseerd op de afname van de nonylphenol concentratie of de oestrogene activiteit gedurende de experimenten.

De microbiële omzetting van nonylphenol is onderzocht in batchexperimenten (Figuur 5-1) met sediment en moeraswater uit het zuiveringsmoeras in Grou (punt 3; okt. 2009). Nonylphenol is toegevoegd in een eindconcentratie van 2,5 mg/l en gedurende de incubatie is op verschillende tijdstippen de nonylphenol concentratie geanalyseerd, afhankelijk van het verloop van de afbraakprocessen.



Figuur 5-1 *Uitgevoerde batchexperimenten*

De afname van de oestrogene activiteit is ook in laboratorium experimenten uitgetest. Hiervoor is in batchflesjes sediment en moeraswater uit de 4 verschillende punten van de drie zuiveringsmoerassen gebruikt en schuddend geïncubeerd bij 20°C. Er zijn zogenaamde opofferingsexperimenten uitgevoerd; dit betekent dat voor elk analysetijdstip de gehele inhoud van een flesje is gebruikt voor de analyse van de slurry in een flesje. Gedurende de incubatie is op verschillende tijdstippen de inhoud van enkele flesjes voor de opwerking voor de analyses. Vervolgens zijn de extracten geanalyseerd op hun oestrogene activiteit mbv de ERLuc assay.

2. Belang van de experimenten en metingen

Hoewel (xeno)oestrogenen in een RWZI over het algemeen effectief (>90%) worden verwijderd, zijn de stoffen in het effluent doorgaans nog aantoonbaar. Uit onderzoek van Deltares / WUR is gebleken dat onder invloed van microbiële activiteit onder aerobe condities oestrogene verbindingen kunnen worden afgebroken (de Weert et al, 2008). De in dit project uitgevoerde experimenten geven inzicht in de rol van micro organismen bij de omzetting van oestrogene verbindingen in het zuiveringsmoeras.

Het voordeel van het verblijf van het effluent in het moeras is dat het zuurstofgehalte hierin tijdens het verblijf in het zuiveringsmoeras toeneemt en er een langere verblijftijd is dan in de zuiveringsinstallatie (evt. mede door adsorptie aan sediment). Hierdoor lijken de condities in zuiveringsmoerassen gunstig voor de afbraak van de oestrogene stoffen, waardoor de oestrogene activiteit van het effluent afneemt.

Het doel van dit onderzoek is tweeledig:

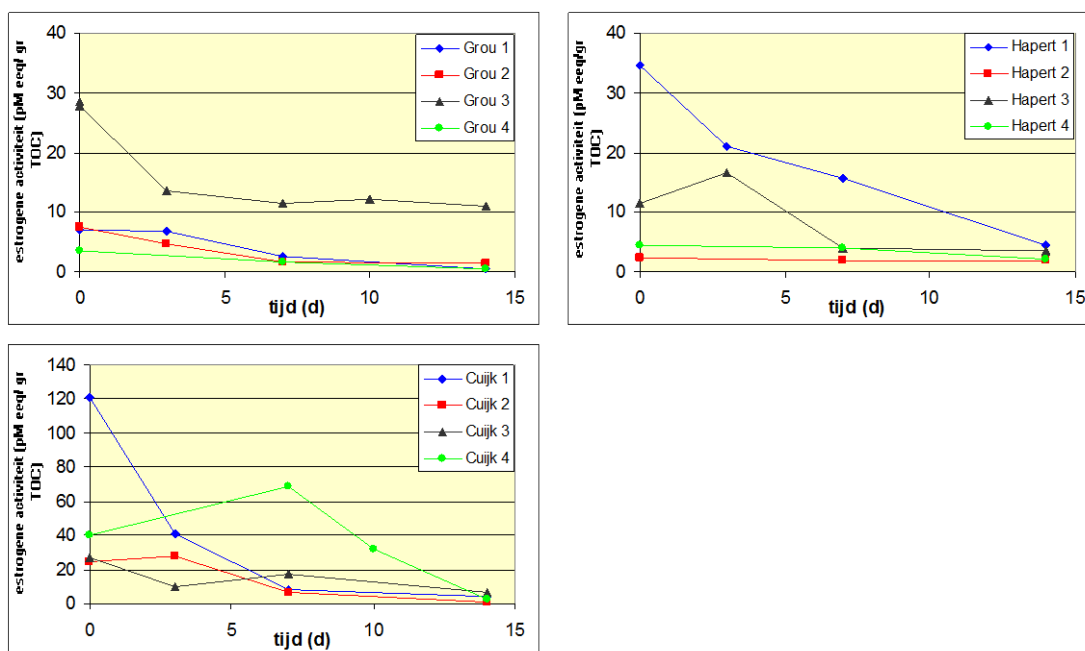
1. Identificeren van het belang van microbiële activiteit bij de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Land van Cuijk;
2. Ontwikkelen van methoden die de microbiële zuivering in moerassystemen stimuleren.

3. Suggesteren de experimenten een (milieu)risico van de rwzi-effluenten?

De resultaten tonen aan dat het water en sediment van de zuiveringsmoerassen een hoge concentratie aan oestrogene activiteit hebben bij punt 1 van het moeras, direct na het lozingspunt van de RWZI. Dit impliceert een zeker risico van het moeras.

4. Draagt het zuiveringsmoeras bij aan de vermindering van het milieurisico van het effluent?

Het verblijf in een zuiveringsmoeras heeft een positieve invloed op de afname van de oestrogene activiteit, want de gemeten activiteit is in de moerassen n punt 1 hoger dan in punt 4. Dit geeft aan dat het zuiveringsmoeras bijdraagt aan een afname van de oestrogene activiteit van het moeras. Dit kan een combinatie zijn van microbiële omzetting en adsorptie aan het sediment. De omzetting van deze verbindingen door micro organismen speelt hierin een belangrijke rol, zoals is gebleken uit de uitgevoerde experimenten, zie Figuur 5-2.



Figuur 5-2 Oestrogene activiteit/g TOC in de tijd in batch experimenten met materiaal van Grou, Hapert en Land van Cuijk.

Uit de uitgevoerde experimenten naar de afbraak van oestrogene activiteit in batches met materiaal uit de verschillende punten van de zuiveringsmoerassen in Grou, Hapert en Cuijk kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

Uit de experimenten met nonylphenol volgt dat nonylphenol binnen 2 weken volledig is omgezet en deze afbraaksnelheid is vergelijkbaar met de afname van de oestrogene activiteit in batch experimenten met materiaal van Grou, Hapert en Land van Cuijk.

De initiële oestrogene activiteit in een mengsel van sediment en moeraswater varieert per zuiveringsmoeras en de hoogste oestrogene activiteit is aangetroffen in een mengsel van sediment en moeraswater uit Cuijk. In alle zuiveringsmoerassen is microbiële activiteit aanwezig, en deze afbraakpotentie heeft een positieve invloed heeft op de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Cuijk en daardoor een vermindering van de milieurisico's van het effluent. De omzetting van de oestrogene activiteit vindt vooral plaats gedurende de eerste week van incubatie, in meerdere incubaties met materiaal uit de moerassen is de oestrogene activiteit in 4 tot 7 dagen volledig afgenomen. Daarnaast is de aanwezigheid van voldoende

zuurstof van belang voor de omzetting van de oestrogenen verbindingen en de afname van de milieurisico's van het effluent.

5. Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

In een zuiveringsmoeras is de aanwezigheid van voldoende zuurstof voor de aerobe omzetting van de aanwezige oestrogene verbindingen. Vanwege de omzettingssnelheid is een verblijftijd van 4 tot 7 dagen voldoende voor de omzetting van de grootste concentratie aan aanwezige oestrogene verbindingen.

Omdat de oestrogene verbindingen voor een groot gedeelte in het moerassediment aanwezig zijn, is het belangrijk om te zorgen dat ze daaruit worden vrijgemaakt en vervolgens worden omgezet. De optimale condities hiervoor zijn een moeras met een dunne sedimentlaag wat regelmatig "opgewerveld" wordt, zodat de oestrogene verbindingen vanuit het moerassediment desorberen naar de waterfase. Dit zou in de sedimentvijver kunnen plaatsvinden, het begin van het zuiveringsmoeras. Vervolgens kunnen de vrijgekomen oestrogene verbindingen worden omgezet in de aerobe waterfase. Om voldoende zuurstof in de waterfase te hebben is een ondiep moeras het gunstigste.

5.2 Principe van de toegepaste experimenten en meettechnieken

Hoewel (xeno)oestrogenen in een RWZI over het algemeen effectief (>90%) worden verwijderd, zijn de stoffen in het effluent doorgaans nog aantoonbaar. Uit onderzoek van Deltares / WUR is gebleken dat onder invloed van microbiële activiteit onder aerobe condities oestrogene verbindingen kunnen worden afgebroken (de Weert et al, 2008).

Het voordeel van het verblijf van het effluent in het moeras is dat het zuurstofgehalte hierin tijdens het verblijf in het zuiveringsmoeras toeneemt en er een langere verblijftijd is dan in de zuiveringsinstallatie (evt. mede door adsorptie aan sediment). Hierdoor lijken de condities in zuiveringsmoerassen gunstig voor de afbraak van de oestrogene stoffen, waardoor de oestrogene activiteit van het effluent afneemt.

Het doel van dit onderzoek is tweeledig:

- I. Identificeren van het belang van microbiële activiteit bij de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Land van Cuijk;
- II. Ontwikkelen van methoden die de microbiële zuivering in moerassystemen stimuleren.

Deelvragen hierbij zijn:

1. Is er in het zuiveringsmoeras afbraakpotentie aanwezig en is deze aantoonbaar in batchexperimenten in het laboratorium?
2. Varieert de afbraakpotentie per moeras en waarom?
3. Is de afbraakpotentie te stimuleren?

De resultaten uit dit onderzoek kunnen vervolgens worden gebruikt bij het opstellen van richtlijnen voor een optimale inrichting van zuiveringsmoerassen.

5.3 Materiaal en methoden

5.3.1 Batchexperimenten; aerobe afbraak van nonylphenol

De batchexperimenten zijn in duplo uitgevoerd in 250 ml serumflesjes met 20 g sediment (natgewicht) en 90 ml moeraswater uit het zuiveringsmoeras in Grou (punt 3; okt 2009) en afgesloten met een viton stop (Figuur 5-3). Vervolgens is nonylphenol toegevoegd vanuit een stockoplossing tot een eindconcentratie van 2,5 mg/l en zijn de batches schuddend geïncubeerd bij 20°C. Gedurende de incubatie is op verschillende tijdstippen de nonylphenol concentratie geanalyseerd, afhankelijk van het verloop van de afbraakprocessen.



Figuur 5-3 Uitgevoerde batchexperimenten

5.3.2 Batchexperimenten; aerobe afbraak van oestrogene activiteit

De batchexperimenten zijn uitgevoerd in duplo in 250 ml serumflesjes met sediment en water afkomstig van de 4 verschillende punten van de drie zuiveringsmoerassen. In de batches is 3 g sediment (natgewicht) en 50 ml moeraswater gebruikt en vervolgens zijn de flesjes afgesloten met een viton stop en schuddend geïncubeerd bij 20°C. In eerste instantie waren slechts een aantal punten per zuiveringsmoeras ingezet (monsters van december 2009), waarbij alleen t=0 en t=13 dagen (eind) werden gemeten. Bovendien werd 2 ml slurry uit de batches genomen voor de bepaling van de oestrogene activiteit. Omdat het aantal tijdstippen te weinig bleek en het lastig was om een representatief deelmonster te nemen uit deze slurry batches, zijn vervolgens nieuwe experimenten ingezet met vers materiaal van alle vier de bemonsteringspunten van de drie zuiveringsmoerassen (januari 2011). Er zijn zogenaamde opofferingsexperimenten uitgevoerd; dit betekent dat voor elk analysetijdstip de gehele inhoud van een flesje is gebruikt voor de analyse van de slurry in een flesje. Gedurende de incubatie is op verschillende tijdstippen de inhoud van enkele flesjes voor de opwerking voor de analyses. De meeste tijdstippen zijn in enkelvoud geanalyseerd en in sommige gevallen is ook het duplo monster geanalyseerd.

5.3.3 Analyses

Nonylphenol is geanalyseerd op een GC-MS, uitgerust met een CP-Sil 8 CB low-bleed/MS kolom. Injectie op de GC vond plaats vanuit een vial met het slurymonster via een solid-phase microextraction (SPME) injectie met een polyacrylaat fiber (de Weert et al, 2008).

Het gehalte aan totaal organisch koolstof (TOC) in de sedimentmonsters is bepaald via een meting aan het totaal organisch koolstof voor en na uitstoken bij 550°C met de LECO CS analyser.

De oestrogene activiteit is bepaald met een ER-Luc assay. Hiervoor is de volledige inhoud van een batch geëxtraheerd en opgewerkt volgens de onderstaande stappen:

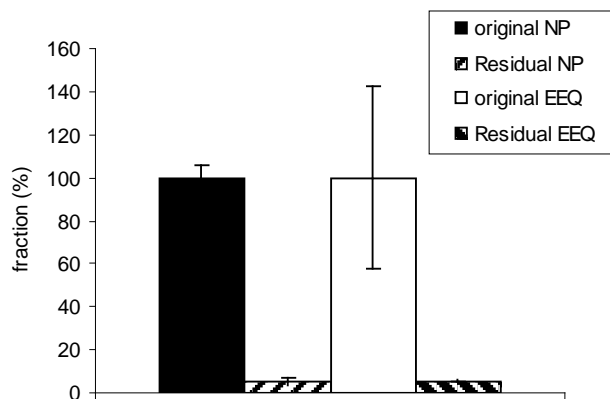
1. De inhoud van een geheel batchflesje wordt geëxtraheerd met 20 ml aceton en 27 ml petroleumether (PE) + 3 ml diethylether (DEE) en afgesloten met septum + crimp cap en 2 uur geschud (125 rpm);
2. Aceton en PE+DEE worden gescheiden in een voorgespoelde scheidtrechter (met aceton en PE) door toevoeging van ca. 100 ml kraanwater;
3. Het extract wordt watervrij gemaakt door spoelen over voorgespoelde natriumsulfaat;
4. Voor ontzaveling wordt voorgespoelde kopergranulaat (met aceton, PE+DEE) aan het natriumsulfaat toegevoegd (200 mg kopergranulaat per ml extract dus voor 30 ml extract ca 6 g kopergranulaat);
5. De extracten worden ingedampt met stikstofgas in een Vaporup op 35°C tot ca. 0,5 ml.

Vervolgens wordt aan de extracten de oestrogene activiteit bepaald via de ER-Luc assay (de Weert et al, 2008). De oestrogene activiteit wordt uitgedrukt in estradiol equivalenten (EEQ).

5.4 Resultaten en Discussie

5.4.1 Batchexperimenten; aerobe afbraak van nonylphenol

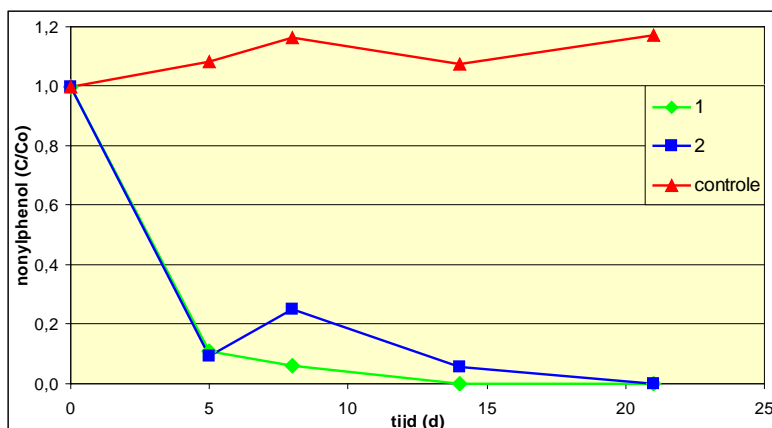
Het uitgevoerde onderzoek had tot doel om de het belang van microbiële omzettingsactiviteit bij de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Land van Cuijk na te gaan. In eerder onderzoek is aangetoond dat de oestrogene activiteit in batchexperimenten afneemt als gevolg van microbiële omzetting. Daarnaast werd aangetoond dat nonylphenol gebruikt kan worden als indicator om de oestrogene activiteit van het monster vast te stellen, en de microbiële omzettingspotentie van de oestrogene verbindingen in te schatten (de Weert et al, 2008), zie Figuur 5-4.



Figuur 5-4 Nonylphenol concentraties (NP) en oestrogene activiteit op $t=0$ en na aerobe incubatie in een batchexperiment, uit de Weert et al, 2008.

In het beschreven experiment bleek de afname van nonylphenol een maat te zijn voor de afname aan oestrogene activiteit in het gebruikte sediment, dat afkomstig was uit een zijtak van de Ebro rivier in Spanje. Analyse van nonylphenol is goedkoper en sneller dan het uitvoeren van een in-vitro bioassay voor hormoonverstoring. Het volgen van de omzetting van nonylphenol is hierdoor een goed alternatief om de omzetting van de oestrogene activiteit te volgen. In het beschreven onderzoek is slechts met een type sediment gewerkt, zodat nog niet kon worden vastgesteld of het gebruik van nonylphenol als indicator voor de oestrogene activiteit ook in andere sedimenten geldt.

Met materiaal uit punt 3 in Grou zijn afbraakexperimenten naar de afbraak van toegevoegd nonylphenol uitgevoerd om inzicht te krijgen in de afbraakcapaciteit van nonylphenol en estrogene verbindingen in het moeras (Figuur 5-5).



Figuur 5-5 Afbraak nonylphenol in batches met materiaal van Grou, punt 3.

Uit de figuur volgt dat nonylphenol snel omgezet wordt, binnen 1 tot 2 weken is vrijwel alle toegevoegde nonylphenol omgezet. De grote headspace zorgde voor de aanwezigheid van voldoende zuurstof gedurende het experiment. In de steriele controle blijft de concentratie constant, wat aantoont dat de afname van nonylphenol in de andere batches het gevolg is van microbiële afbraak.

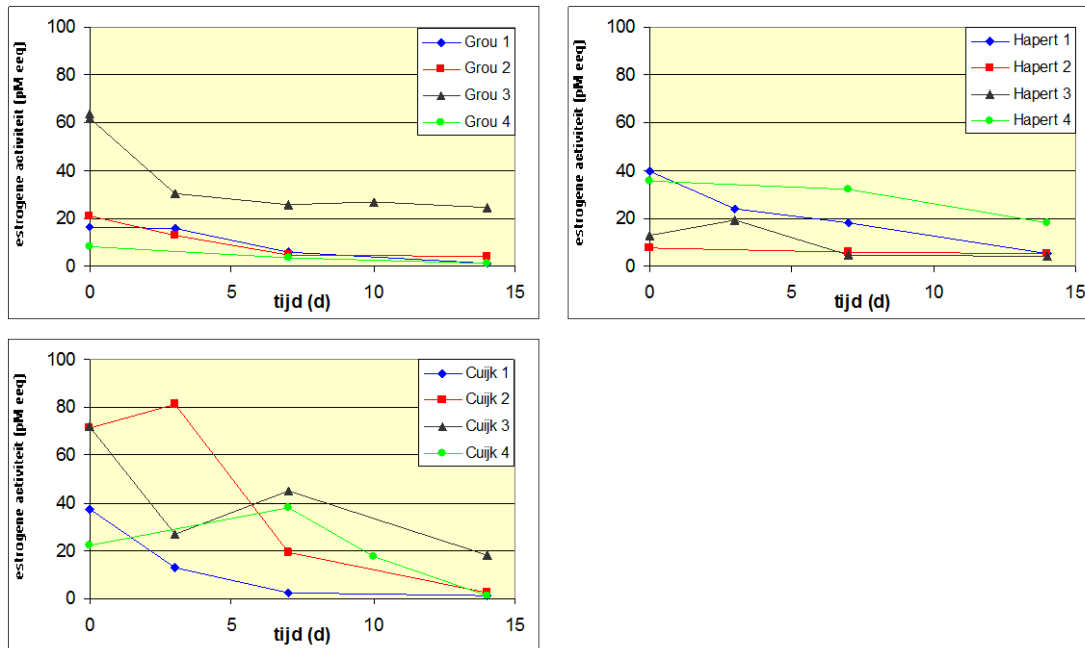
De vervolgstap om te kijken of dit gekoppeld is aan de afname van oestrogene activiteit in de batches en na te gaan of nonylphenol gebruikt kan worden als indicator voor de afname van nonylphenol is niet uitgevoerd. Dit komt doordat na een uitgebreide discussie in het consortium is besloten om nonylphenol niet te gebruiken als indicator voor oestrogene activiteit. De reden hiervoor was dat nonylphenol nauwelijks aanwezig in de sedimenten van de drie zuiveringsmoerassen en de verwachting is dat dit in Nederland geen grote rol zal spelen in RWZIs en zuiveringsmoerassen¹. Daarnaast kan nonylphenol geschikt zijn voor het uittesten van de microbiële activiteit en het beïnvloeden daarvan, maar wilden we ook het totale effect bepalen van microbiële afbraak op de oestrogene activiteit in plaats van een enkele chemische analyse om de concentratie nonylphenol te bepalen. Vandaar dat gekozen is voor vervolggelaxperimenten naar de afname van de aanwezige oestrogene activiteit in de tijd.

5.4.2 Batchexperimenten; aerobe afbraak van oestrogene activiteit

Bij het eerste batchexperiment voor de bepaling van de oestrogene activiteit werden op t=0 en t= 13 dagen deelmonsters in duplo genomen en gemeten. De verschillen tussen de duplo's waren in sommige gevallen erg groot en de verschillende moerassen lieten ook andere afbraakprofielen zien. Soms vond er een afname van de oestrogene activiteit plaats, dan weer een toename. Waarschijnlijk kwam deze grote variatie door de monsternamen vanuit de batches. Er werd namelijk een deelmonster genomen vanuit een slurry en dat bleek in dit geval onvoldoende reproduceerbaar te zijn. Daarnaast had onduidelijkheid over de opwerkingsprocedure voor de ERLuc assay tussen de WUR en Deltares tot extra handelingen geleid, wat niet optimaal is geweest voor het eindresultaat.

¹ Onlangs is een Greenpeace rapport verschenen (Dirty Laundry 2, aug 2011) waaruit blijkt dat nonylphenol ethoxylaten zijn aangetroffen in kleding gekocht in Nederlandse winkels. Het gebruik van nonylphenol ethoxylaten voor kledingproductie is in Europa verboden, maar wordt ondermeer in China gebruikt bij het maken van kleding. Eerder onderzoek toonde aan dat Chinese rivieren en meren worden vergiftigd met nonylphenol en nonylphenol ethoxylaate (Dirty Laundry, juli 2011). Het nonylphenol ethoxylaate dat is aangetroffen in kleding in Europa komt door het wassen van deze kleding in RWZIs terecht, waar ze worden omgezet naar nonylphenol.

De resultaten van de eerste experimenten gaven voldoende aanleiding om het experiment nogmaals uit te voeren, met daarbij aandacht voor de bemonstering en de opwerking. Per locatie zijn alle vier de monsterpunten ingezet met vers sediment en water uit de moerassen en zijn er op meerdere tijdstippen gedurende de incubatie monsters genomen en geanalyseerd op hun oestrogene activiteit (Figuur 5-6). De oestrogene activiteit wordt uitgedrukt in oestradiol equivalenten.



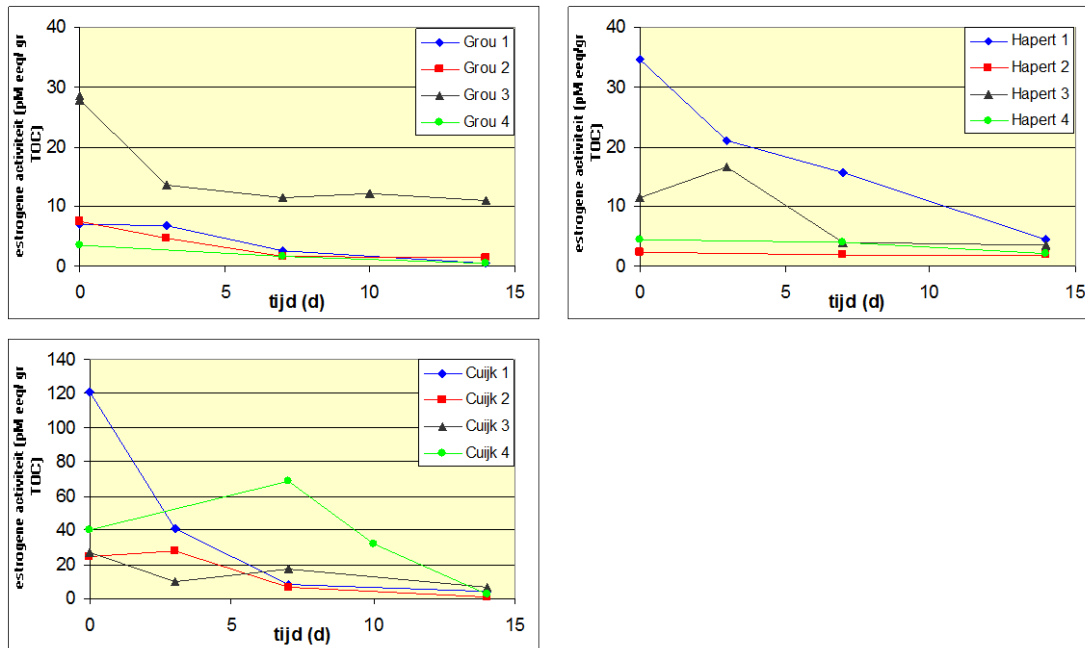
Figuur 5-6 Oestrogene activiteit in pM EEQ in de tijd in batchexperimenten met materiaal van Grou, Hapert en Land van Cuijk.

In de figuren is te zien dat in alle gevallen de oestrogene activiteit gedurende de aerobe incubaties afneemt. Dit betekent dat onder aerobe condities de oestrogene verbindingen in het effluent en moerassediment worden afgebroken.

Op t=0 is er nogal variatie in de oestrogene activiteit tussen de verschillende zuiveringsmoerassen, maar ook tussen de verschillende punten binnen een moeras. Omdat oestrogene verbindingen goed adsorberen aan organisch koolstof, is de oestrogene activiteit gerelateerd aan het organisch koolstofgehalte van het gebruikte sediment (Tabel 5-1) waardoor de resultaten onderling beter te vergelijken zijn (Figuur 5-7).

Tabel 5-1 Organisch koolstofgehalte (%) van de gebruikte zuiveringsmoeras sedimenten

	Grou	Hapert	Land van Cuijk
Punt 1	2,298	1,140	0,308
Punt 2	2,830	3,083	2,891
Punt 3	2,234	1,141	2,667
Punt 4	2,263	8,281	0,553



Figuur 5-7 Oestrogene activiteit/g TOC in de tijd in batch experimenten met materiaal van Grou, Hapert en Land van Cuijk.

In de batches met materiaal van Grou is in 3 van 4 punten de oestrogene activiteit binnen een week gedaald tot bijna 0, alleen met materiaal van punt 3 is dit niet gebeurd. Er is een snelle afname in de activiteit gedurende de eerste week, waarna de omzetting lijkt te zijn gestopt. Mogelijk is er onvoldoende zuurstof in de batches aanwezig geweest, maar dit lijkt niet waarschijnlijk om dat batches met een hogere initiële oestrogene activiteit (bv Cuijk 2) of meer organisch koolstof (Hapert 4) wel vrijwel alle oestrogene activiteit wordt omgezet. Een andere oorzaak kan zijn dat de resterende verbindingen slecht afbreekbaar zijn. Dit laatste lijkt echter niet waarschijnlijk, omdat in de andere batches met materiaal van Grou de oestrogene activiteit wel tot vrijwel 0 afneemt, tenzij in dit gedeelte van het moeras andere oestrogene stoffen zich in het sediment hebben opgehoopt vanwege andere adsorptie eigenschappen.

In de batches van materiaal van Hapert is bij punt 2 ,3 en 4 binnen een week een afname van de oestrogene activiteit te zien. Bij punt 1 duurt het 2 weken voordat de oestrogene activiteit vrijwel volledig is omgezet en is in deze tijd de initiële oestrogene activiteit ongeveer met 80% afgenomen.

Het materiaal uit het zuiveringsmoeras van het Land van Cuijk heeft de hoogste initiële concentratie aan oestrogene activiteit ten opzichte van de andere twee moerassen. Vooral bij het eerste punt is de oestrogene activiteit hoog. Dit heeft waarschijnlijk te maken met de hoeveelheid afvalwater dat de RWZI inkomt. In het Land van Cuijk is de hydraulische capaciteit 8.000 m³/uur, en dit is veel meer dan in Grou en Hapert, resp. 1.140 m³/uur en 2.543 m³/uur.

In de batches van materiaal van het Land van Cuijk is de oestrogene omzetting binnen 2 weken in alle batches afgenomen tot vrijwel 0.

5.5 Conclusies en aanbevelingen

Uit de uitgevoerde experimenten naar de afbraak van oestrogene activiteit in batches met materiaal uit de verschillende punten van de zuiveringsmoerassen in Grou, Hapert en Cuijk kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Nonylphenol wordt in batches met materiaal uit Grou binnen 2 weken volledig omgezet en deze afbraaksnelheid is vergelijkbaar met de afname van de oestrogene activiteit in batch experimenten met materiaal van Grou, Hapert en Land van Cuijk;
- De initiële oestrogene activiteit in een mengsel van sediment en moeraswater varieert per zuiveringsmoeras;
- De oestrogene activiteit in een mengsel van sediment en moeraswater uit Cuijk is het hoogste;
- In alle zuiveringsmoerassen is microbiële activiteit aanwezig, en deze afbraakpotentie heeft een positieve invloed heeft op de zuiveringsefficiëntie van de moerassystemen in Grou, Hapert en Cuijk;
- Gedurende de eerste week van incubatie vindt een grote afname van de oestrogene activiteit plaats, in meerdere incubaties met materiaal uit de moerassen is de oestrogene activiteit in 4 tot 7 dagen volledig afgenomen;
- De aanwezigheid van voldoende zuurstof is van belang voor de omzetting van de oestrogenen verbindingen.

Voor een optimale omzetting van de oestrogene verbindingen in een zuiveringsmoeras zijn een aantal factoren belangrijk, die hieronder verder worden uitgelegd:

- Voldoende zuurstof;
- Voldoende verblijftijd;
- Opwerveling van het sediment;
- Ondiepe waterfase in het moeras.

In een zuiveringsmoeras is de aanwezigheid van voldoende zuurstof voor de aerobe omzetting van de aanwezige oestrogene verbindingen.

Vanwege de omzettingssnelheid is een verblijftijd van 4 tot 7 dagen voldoende voor de omzetting van de grootste concentratie aan aanwezige oestrogene verbindingen.

Omdat de oestrogene verbindingen voor een groot gedeelte in het moerassediment aanwezig zijn, is het belangrijk om te zorgen dat ze daaruit worden vrijgemaakt en vervolgens worden omgezet. De optimale condities hiervoor zijn een moeras met een dunne sedimentlaag wat regelmatig "opgewerveld" wordt, zodat de oestrogene verbindingen vanuit het moerassediment desorberen naar de waterfase. Dit zou in de sedimentvijver kunnen plaatsvinden, het begin van het zuiveringsmoeras. Vervolgens kunnen de vrijgekomen oestrogene verbindingen worden omgezet in de aerobe waterfase. Om voldoende zuurstof in de waterfase te hebben is een ondiep moeras het gunstigste.

5.6 Referenties

de Weert, J., A. De la Cal, H. van den Berg, A. Murk, A. Langenhoff, H. Rijnaarts, T. Grotenhuis. 2008. Bioavailability and biodegradation of nonylphenol in sediment determined with chemical and bioanalysis, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (4): 778-785

De invloed van moerassystemen op de milieukwaliteit van rwzi effluent en aanbevelingen tot optimalisering

Bijlagerapport B



*Waterharmonica Improving Purification Effectiveness
(Moeraszuiver afvalwater)*



Table of contents

The WIPE project	5
Introduction	5
Research sites.....	6
Experimental design.....	8
WIPE Reports.....	9
6 Stickleback transcriptomics to assess water quality impacts of effluent bioremediation	11
Nederlandse samenvatting (Dutch summary)	11
Summary	21
6.1 Introduction to stickleback biomarkers	22
6.2 Principle of the applied technologies	27
6.3 Materials & Methods.....	31
6.4 Results.....	38
6.5 Discussion	91
6.6 Conclusions & recommendations	94
6.7 References	95
7 Factors determining the disinfection capacity of constructed wetlands	99
7.1 Introduction on pathogen removal	107
7.2 Principle of applied measuring techniques.....	108
7.3 Materials & method.....	109
7.4 Results.....	113
7.5 Discussion & conclusions	125
7.6 Conclusions	130
7.7 Recommendations.....	132
7.8 References	133
Annex	137

The WIPE project

Introduction

Freshwater ecosystems are exposed to various sources of anthropogenic pollutants. These include industrial effluents, agricultural run-off and domestic effluents that enter the ecosystems via waste water treatment plants (WWTP). In addition to anthropogenic chemical contaminants, an additional concern is the incomplete removal of bacteria during waste-water treatment which could result in human faecal bacteria, including pathogens, entering the river systems. The Water Framework Directive (WFD) commits European countries to achieve good surface water quality by 2015. One of the possible ways to achieve this goal is to improve the chemical and biological water quality of WWTP effluent discharged into surface waters. The risk to the environment posed by wastewater is greatly reduced by conventional WWTPs, however it is not eliminated (Sebire et al., 2011). Effluent 'polishing' techniques are, therefore, recommended to improve the quality of the receiving surface water. An alternative effluent polishing method is the 'Waterharmonica' concept (www.waterharmonica.nl), that has been applied at selected WWTPs in The Netherlands and consists of artificially constructed wetland environments that receive effluent from the WWTP. This ecological engineering approach has resulted in effective reduction of nitrates, metals, *E. coli* and sludge particles and restoration of oxygen levels (e.g. Kampf et al, 2005, Knox et al. (2008), Molleda et al. (2008), Reinoso et al. (2008)). This bioremediated water is then capable of supporting fish that provide food for birds, thus making a positive contribution to biodiversity. Because of the low costs and the additional ecological value, constructed wetlands are becoming more popular for additional WWTP effluent treatment. Although the benefits of the artificial wetlands system are apparent, a number of questions remain to be answered, particularly regarding the fate of toxic contaminants and pathogens. More research on specific processes affecting the purification is required to optimize the design of constructed wetlands to achieve a better effluent quality. In the WIPE project (*Waterharmonica Improving Purification Effectiveness*) the extent to which purification wetlands contributed to the reduction of environmental risks due to removal of micropollutants and pathogens from WWTP effluents was investigated.

The WIPE project was carried out by IMARES, Deltares, Waternet and Wageningen University from April 2009 till October 2011, in cooperation with the Water boards Fryslân, Aa & Maas en De Dommel. WIPE was partly funded by a grant of the Innovation Program for the Water Framework Directive (IP-KRW) of the Dutch Ministry of Infrastructure and Environment. The main objectives of the project were:

- to determine of the impact of bioremediation in constructed wetlands on WWTP effluent quality, mainly focussed on the fate and toxicity of emerging substances and pathogenic micro-organisms;
- to determine the feasibility and the ecological relevance of innovative techniques for water quality monitoring, such as passive sampling, new *in vitro* bioassays and transcriptomics biomarkers, in order to design an integrative environmental monitoring strategy;
- to present an optimised design of constructed wetlands for the bioremediation of wwtp effluents, preferably in combination with positive effects on biodiversity.

The WIPE research integrates a number of scientific disciplines, including ecology, ecotoxicology, microbiological testing, chemical testing of sediments, biota and water (using passive samplers), and genomics on stickleback tissues.

Research sites

Three WWTP with purification wetlands were selected for the WIPE research project: Grou (Figure 1), Hapert (Figure 2) and Land van Cuijk (Figure 3). At each of these wetlands the effluent water passes through three different compartments before it is discharged into the surface waters. The first two compartments are, respectively, sedimentation ponds and helophyte fields at all sites. The design of the third compartment is different for each site. At Grou, this compartment is an ecological lagoon, designed for fish spawning, which is openly connected to the surface water. At Hapert, the third compartment consists of a wetland forest and at Land van Cuijk the third compartment is a large discharge ditch. Several characteristics of the different WWTP and their artificial wetlands are presented in Table 1.

Table 1 Characteristics of the WWTP and their purification wetlands of the research sites

	WWTP Grou	WWTP Hapert	WWTP Land van Cuijk
Waterboard	Fryslân	De Dommel	Aa en Maas
Address	Molesingel 2, Grou	Castersedijk 25, Hapert	Beijersbos 4, Haps
Type of purification process	Carrousel	Oxidation ditch	Activated sludge
Capacity [inhabitant equivalents i.e.]	25,000 i.e.	71,000 i.e.	175,000 i.e.
Hydraulic capacity: dry weather		718 m ³ /h	2,500 m ³ /h
Hydraulic capacity: rain	1,140 m ³ /h	2,543 m ³ /h	8,000 m ³ /h
Receiving surface water	Kromme Grouw	Grote Beerze	Maas
Wetlands construction	2006	2001	
Effluent percentage for wetlands	Constant 1000 m ³ /d (20-25%)	33%	Variable between 5-50%
Surface area			
Sedimentation ponds	0.1 ha	0,6 ha	0,5 ha
Reed beds	0.5 ha	0,9 ha	2,0 ha
3th compartment	-	1,6 ha	0,5 ha
Retention time	Appr. 3 days	Variable, average approx. 3 days	Variable, average approx. 4 days
Hydraulic retention time 3 rd comp.	-		
Total volume	4.865 m ³	30.000 m ³	



Figure 1 WWTP Grou with constructed wetland compartments; sedimentation ponds (red frame), helophyte fields (yellow frame) and ecological lagoon (blue frame). Numbers 1 to 4 indicate sampling positions.



Figure 2 WWTP Hapert with constructed wetland compartments; sedimentation ponds (red frame), helophyte fields (yellow frame) and wetland forest (blue frame). Numbers 1 to 4 indicate sampling positions.



Figure 3 WWTP Land van Cuijk with constructed wetland compartments; sedimentation ponds (red frame), helophyte fields (yellow frame) and discharge ditch (blue frame). Numbers 1 to 4 indicate sampling positions.

Experimental design

All research sites were monitored for at least one year at four positions (Figure 4), that were; representative for the WWTP effluent discharged to the wetlands (position 1); after the sedimentation ponds (position 2); after the helophyte fields (position 3) and after the 3rd compartment, prior to discharge to the surface waters (position 4).

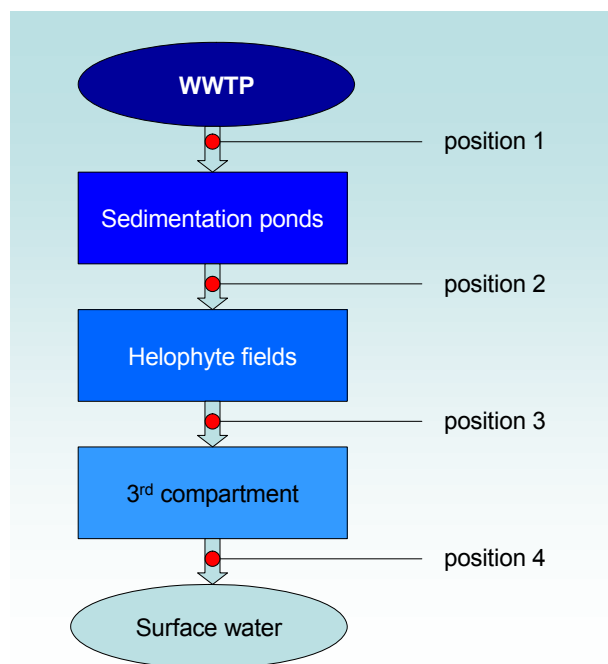


Figure 4 Schematic representation of the constructed wetland systems at different WWTP that were investigated in the WIPE project, with sampling positions 1-4.

An extensive integrated monitoring program was conducted at all positions of the research sites. A time-integrated passive sampling (PS) of biologically available organic compounds was carried out by use of silicon rubber samplers. Chemical analyses of the PS extracts indicate the presence of organic substances of emerging concern in the WWTP effluents, as well as the purification efficiency of the different compartments of the wetland systems. The acute toxicity of the mixture of organic compounds in concentrated water samples was assessed with *in vivo* bioassays, using bacteria, algae and crustaceans, in order to assess the environmental risks of the effluent and the bioremediation efficiency of the wetlands. Concentrated water samples were also tested on a suite of *in vitro* bioassays, in order to assess the risks for specific effects, such as endocrine disruption. At each WWTP, mesocosms were installed, containing three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) these were supplied with water from all investigated wetland sampling positions. The ecological effects (condition [growth], survival and reproduction of the fish) were monitored in order to determine relationships with chemical contamination and bioassay responses. The F1 stickleback were also used to assess impacts of bioremediated effluents on the expression of 15,000 genes in stickleback livers, using DNA microarrays. Differential expressed genes between unexposed controls and effluent-exposed fish were compared to data on chemical and toxicological assays, in order to determine biomarkers for the exposure to water contaminants, and to investigate the biological effects of bioremediation in the wetlands.

In order to determine the disinfection capacity of the wetlands, the amounts of indicator micro-organisms for pathogens were determined at all four positions. Invertebrate organisms were determined in all compartments of the wetlands in order to assess potential relationships with the

disinfection of (pathogenic) micro-organisms. The microbiological break down of endocrine disrupting chemicals was investigated in the laboratory, using sediments from all different compartments of the three wetlands. More details on sampling procedures and experimental designs for the specific work packages are presented in the Material & Methods sections of the background reports.

WIPE Reports

In report C005/12 entitled 'De invloed van moerassystemen op de milieukwaliteit van rwzi effluent en aanbevelingen tot optimalisering', the set-up, results and recommendations of the WIPE project are summarised. The underlining detailed research reports are combined in two annex reports.

Annex report A contains (in Dutch):

1. Assessment of the fate of organic substances in WWTP-wetlands using passive sampling
2. Potential toxicity of WWTP effluent from wetlands assessed using in-vitro bioassays
3. Potential toxicity of WWTP effluent from wetlands assessed using in-vivo bioassays
4. Survival and reproduction success of threespined sticklebacks in WWTP-wetlands
5. Potential of microorganisms in WWTP-wetlands to reduce oestrogen activity

Annex report B contains (in English with Dutch summaries):

6. Stickleback transcriptomics to assess water quality impacts of effluent bioremediation
7. Factors determining the disinfection capacity of constructed wetlands

6 Stickleback transcriptomics to assess water quality impacts of effluent bioremediation

Ron van der Oost Waternet, Research & Engineering
Tim Williams University of Birmingham, Biosciences
Kevin Chipman University of Birmingham, Biosciences

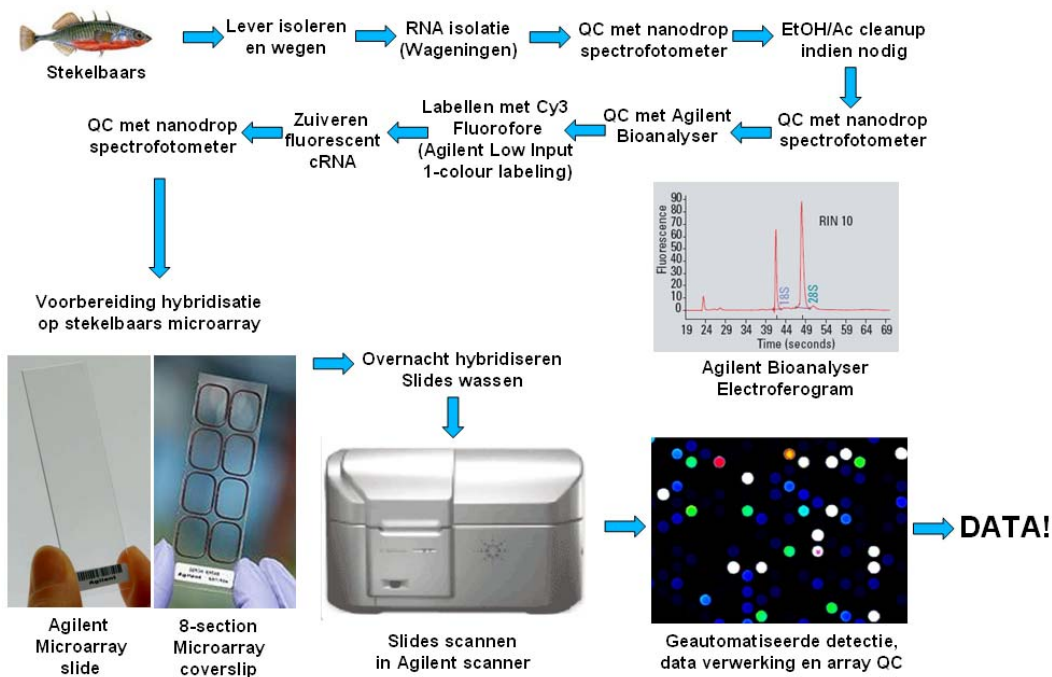


Nederlandse samenvatting (Dutch summary)

1. Beschrijving van de biomarker-analyses

In alle onderzochte moerassystemen waren op vier posities (RWZI-effluent, na bezinkingsvijvers, na rietvelden en na 4^e compartiment) mesocosms met stekelbaarzen geplaatst. De mesocosms (plastic bakken met ca. 2,5 m³ water) werden doorspoeld met water dat uit de verschillende compartimenten van het zuiveringsmoeras werd gepompt. De invloed van het RWZI-effluent op de ecologie van de stekelbaars in deze mesocosms (overleving, groei en voortplanting) is beschreven in WIPE-rapport #7. In het voorliggende deelonderzoek werd de invloed van het RWZI-effluent op de biochemie van de stekelbaars onderzocht. Daartoe werd een pilotonderzoek uitgevoerd met een klein aantal stekelbaarzen die vanuit een schone omgeving in de mesocosms werden geplaatst (F0-generatie) en ook een experiment met een groot aantal stekelbaarzen van de eerste generatie die in de mesocosms waren geboren en daar een jaar hadden geleefd (F1-generatie). Met de blootgestelde stekelbaarzen en een controlegroep in schoon water werd een zogenaamd 'transcriptomics'-onderzoek uitgevoerd. Dit proces is schematisch weergegeven in Figuur 6-1. Eerst werden de levers van de stekelbaarzen uitgerepareerd, waarna het RNA werd geïsoleerd op de Universiteit van Wageningen. Het gezuiverde RNA werd op droogijs naar de Universiteit van Birmingham (UK) gestuurd, waar met één analyse de expressie van 15.000 genen werd geanalyseerd. Deze analyse werd uitgevoerd met zogenaamde DNA-microarrays, glazen plaatjes waarop kleine hoeveelheden specifieke DNA-fragmenten van 15.000 verschillende genen van de stekelbaars zijn geprint. Als een bepaald gen tot expressie komt in de stekelbaars, dan wordt door het DNA een zogenaamd *messenger*-RNA (mRNA) molecuul gevormd dat later de productie van een specifiek eiwit verzorgt. Dit proces wordt DNA-transcriptie genoemd. Het onderzoek naar de expressie van duizenden genen tegelijk wordt *transcriptomics* genoemd. Het voordeel van deze methode is dat het een 'open techniek' is. Dat wil zeggen dat bij een transcriptomics-experiment niet van te voren een keuze wordt gemaakt welke biomarkers worden geanalyseerd, maar dat alle genetische biomarkers met één analyse worden bepaald. Hierdoor kunnen ook onverwachte effecten worden gemeten. De DNA-transcriptie vindt altijd plaats, maar verschillende stressfactoren (zoals giftige stoffen) kunnen de expressie van bepaalde genen remmen of stimuleren. Door de analyse van de mRNA-moleculen kan de activiteit van alle genen in de lever worden gevolgd en kunnen verschillen in genexpressie tussen controles en blootgestelde vissen worden aangetoond. De verandering van de genexpressie in stekelbaarzen uit de moerassystemen ten opzichte van die uit de controlegroep kan daarom een indicator zijn voor de toxische stress van het RWZI-effluent. De verschillen in genexpressie tussen controles en blootgestelde stekelbaarzen werden met uitgebreide statistische en bioinformatica-pakketten geanalyseerd. Hiermee zijn een aantal relaties geanalyseerd tussen de genexpressies van groepen stekelbaarzen uit verschillende mesocosms:

- verschillen op basis van de totale genexpressie;
- verschillen op basis van de expressie van specifieke individuele genen;
- verschillen op basis van expressie van genclusters die bij specifieke processen betrokken zijn;
- verschillen op basis van expressie van genclusters die bij afwijkingen en ziektes betrokken zijn;
- relaties tussen genexpressie en chemische analyses en bioassays.



Figuur 6-1 : Schematische weergave van de analyse van genexpressie in de stekelbaars

2. Belang van het biomarker-onderzoek

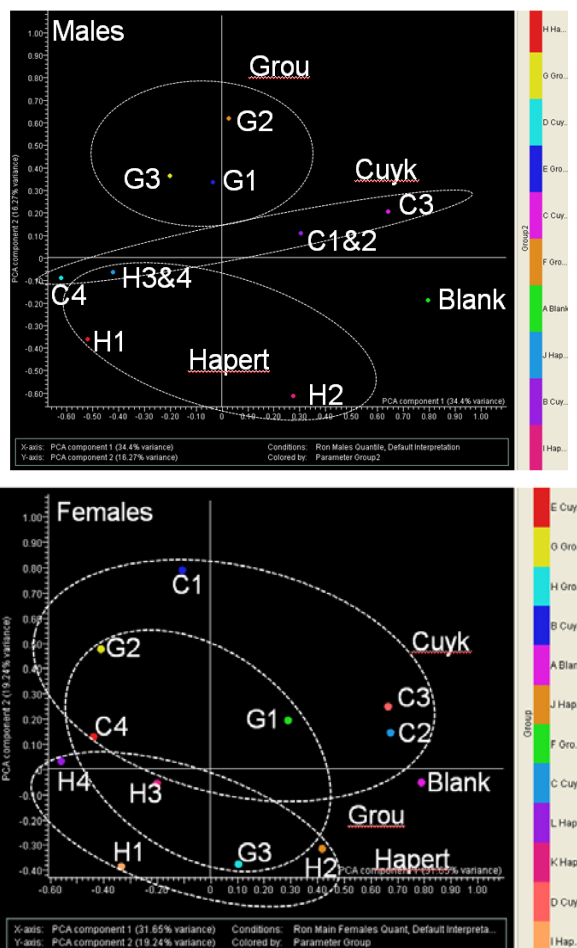
Het oppervlaktewater kan verontreinigd zijn met naar schatting ruim honderdduizend stoffen die mogelijk giftig zijn (Depledge en Fossi, 1994). Het is onmogelijk om het milieurisico van het complexe mengsel chemische verontreinigingen te schatten, omdat i. het technisch en financieel onmogelijk is om al deze stoffen chemisch te analyseren, ii. van de meerderheid van de stoffen weinig of niets bekend over de toxiciteit, iii. de biologische beschikbaarheid van de stoffen niet bekend is, iv. de mengseffecten (versterking of verzwakking van toxiciteit) onbekend zijn en v. de effecten van giftige omzettingen producten niet bekend zijn. Om een enigszins betrouwbare schatting te kunnen maken van de milieurisico's van het RWZI-effluent moet dus niet alleen naar stoffen, maar vooral naar toxische effecten worden gekeken. Bij het WIPE-project is daarom een zeer intensieve effectmonitoring uitgevoerd met in-vitro bioassays (WIPE-rapport #2), in-vivobioassays (WIPE rapport #3) en in-vivobiomarkers in de stekelbaars (dit rapport).

De biochemische veranderingen in levende waterorganismen die indicatief zijn voor de waterkwaliteit worden biomarkers genoemd. Biomarkers kunnen al een respons vertonen als nog geen nadelige effecten op de organismen te zien zijn, waardoor ze als vroege waarschuwing voor mogelijke effecten van milieuverontreiniging kunnen worden gebruikt. Voor het onderzoek naar in-vivo biomarkers in de stekelbaars is gebruikgemaakt van DNA-microarrays, zoals beschreven in de vorige paragraaf. De biomarker-analyses zijn toegepast als gevoelige indicator om de milieurisico's van de RWZI effluenten en de mogelijke effecten op het welzijn van in het moeras levende vissen te analyseren. Doordat vissen zijn blootgesteld aan water uit verschillende posities in het moeras kan ook het zuiveringsrendement (de mogelijke vermindering van de milieurisico's) van de systemen worden beoordeeld.

3. Het (milieu)risico van de RWZI-effluenten

Het hoofdexperiment voor dit werkpakket zou worden uitgevoerd met 20 stekelbaarzen (10 mannetjes en 10 vrouwtjes) per positie. Op enkele posities waren echter onvoldoende vissen aanwezig voor statistisch betrouwbaar onderzoek (♂: C2, C3, G4 en H4; ♀: C3 en G4).

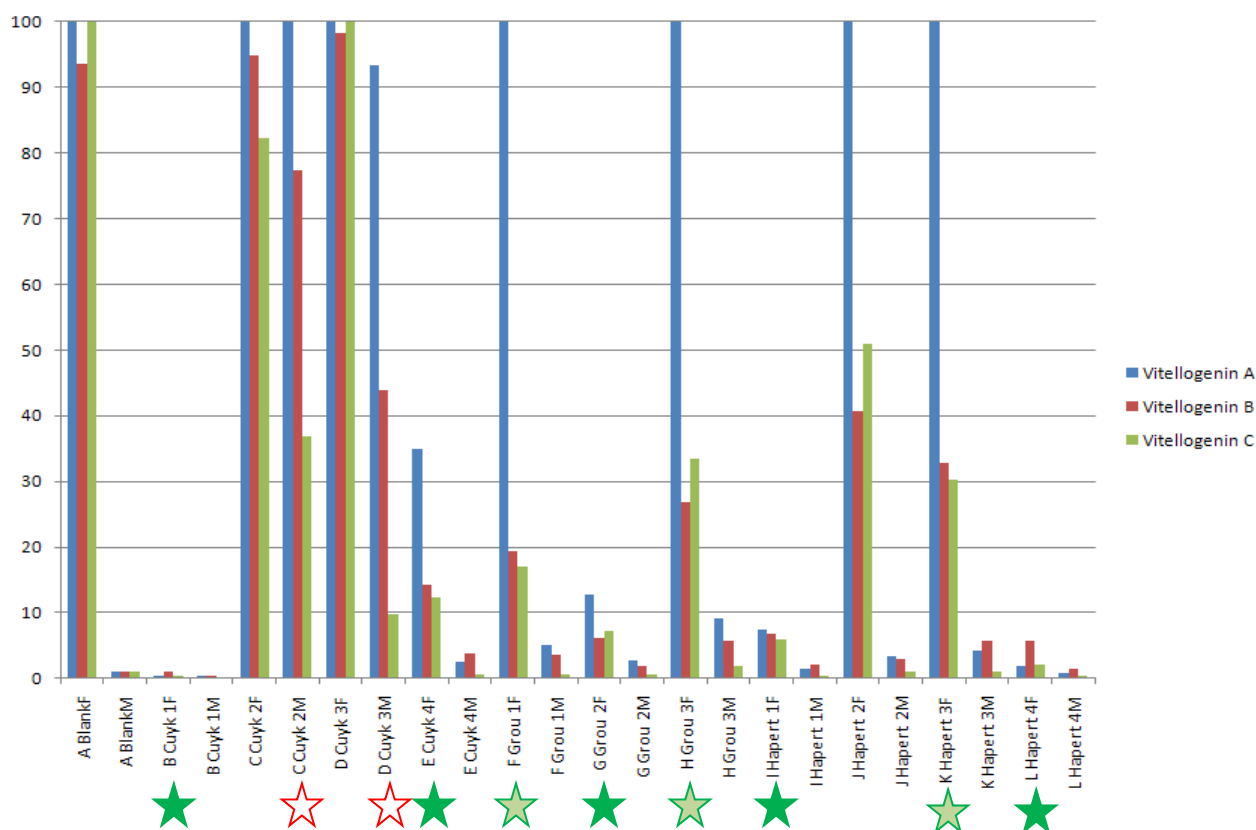
3.1 *Totaal genom*. Duidelijke effecten werden gevonden op de genexpressie van vissen uit de zuiveringsmoerassen ten opzichte van de blanco controles in Den Helder. Met een principale-componentenanalyse (PCA), een statistische techniek om een multidimensionale dataset op een tweedimensionaal vlak te projecteren, kunnen de verschillen in genexpressie voor de verschillende groepen in beeld worden gebracht (Figuur 6-2). Grote verschillen in genexpressie liggen verder bij de blanco groep vandaan.



Figuur 6-2 Principale componentanalyse (PCA) op de genexpressie van mannelijke (Male) en vrouwelijke (Female) stekelbaarzen, gemiddeld van alle onderzochte locaties/posities

Om de verschillen in genexpressieprofielen tussen de verschillende posities binnen de moerassen te analyseren zijn ook PCA-analyses per RWZI-locatie uitgevoerd. Bij het Land van Cuijk werd zowel bij mannetjes als vrouwtjes een significant verschil aangetoond tussen positie C1, posities C2&C3 en positie C4, maar posities C2 en C3 verschilden niet van elkaar. Bij Grou kon significant onderscheid worden gemaakt tussen alle onderzochte posities (G1-3), hoewel er drie vrouwelijke uitbijters waren op posities G1 en G3, die meer overeenkomst vertoonden met positie G2. Op positie G4 waren geen vissen aanwezig. Bij Hapert konden de posities H1, H2 en H3 voor zowel de mannetjes- als de vrouwtjes-stekelbaarzen significant worden onderscheiden. Tussen de H4- en H3-vrouwtjes werd geen significant verschil gevonden, terwijl maar één H4-mannetje aanwezig was. Deze resultaten tonen aan dat de stekelbaarzen uit de moerassen met RWZI-effluenten aan andere prikkels waren blootgesteld dan de controlevissen. De meeste genexpressie-biomarkers zijn niet alleen gevoelig voor chemische verontreiniging, maar ook voor factoren zoals voedsel, microbiologische verontreiniging (pathogenen), predatie, competitie, etc. Het is daarom belangrijk om bij de beoordeling van de resultaten ook rekening te houden met de mogelijke invloed van deze factoren.

3.2 *Individuele genen.* Om de mogelijk nadelige effecten van RWZI-effluent op de stekelbaars te analyseren is een nader bioinformatica-onderzoek uitgevoerd op individuele genen en clusters van genen die bepaalde processen aansturen. Om de hormoonverstoring in de stekelbaars te onderzoeken is de expressie van drie vitellogenines (VTG A, B en C) onderzocht (Figuur 6-3). VTG's zijn enzymen die betrokken zijn bij de productie van eieren en die normaal dus alleen bij vrouwelijke vis tot expressie komen. Als de VTG-expressie in de mannetjes wordt gestimuleerd (locaties C2 en C3) is dat een aanwijzing dat de vissen zijn blootgesteld aan hoge gehalten stoffen met estrogene activiteit. Een remming van de VTG-expressie bij vrouwtjes (locaties C1, C4, G1, G2, G3, H1, H3 en H4) is een indicatie voor de blootstelling aan anti-estrogene stoffen.



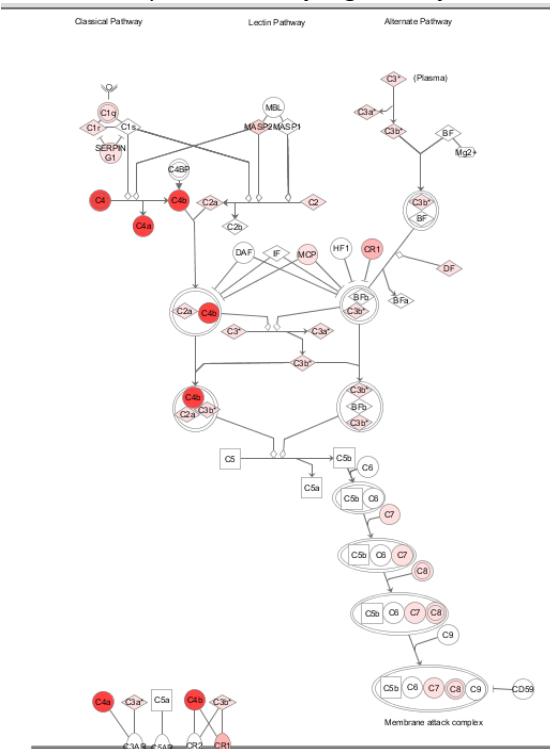
Figuur 6-3 Vitellogenine-expressie in stekelbaars, gemiddelden per groep, genormaliseerd naar vrouwelijke blanco's; = significante remming van VTG's in vrouwelijke vis; = stimulatie van VTG-expressie in mannelijke vis (ruim 10x hoger, niet significant door hoge spreiding)

Zoals verwacht is er sprake van hormoonverstoring door RWZI-effluent, maar de effecten van anti-estrogenen lijken sterker dan die van estrogene stoffen. Het is opvallend dat de anti-estrogene effecten (VTG remming ♀) overheersen en dat deze in Cuijk alleen optreden op de posities C1 en C4, waar geen estrogene effect (VTG stimulatie ♂) wordt waargenomen. De (anti)estrogene effecten kunnen mogelijk invloed hebben op de voortplanting van de vissen, hoewel geen effecten werden gevonden bij de reproductieproef (WIPE-rapport #7). Hierbij moet worden aangetekend dat de reproductie van vissen uit de locaties C2 en C3 niet kon worden onderzocht door een hoge sterfte in deze mesocosms (alle vis werd gebruikt voor het biomarkeronderzoek).

De expressie van cytochroom P450 (CYP1A), een enzym met een belangrijke rol bij o.a. ontgiftig, was significant verhoogd in stekelbaars van Grou en Land van Cuijk, terwijl de expressie in Hapert niet veranderde. Omdat CYP1A wordt gestimuleerd na blootstelling aan stoffen met dioxine-achtige activiteit (zoals PCB's en PAK's) is het waarschijnlijk dat de vis uit deze twee moerassen aan dergelijke

stoffen werd blootgesteld. In de pilotstudie van 2010 werd in de F0-vis uit het Land van Cuijk een verhoogde expressie gevonden van genen die betrokken zijn bij DNA-reparatie. Omdat de DNA-reparatie in gang wordt gezet na beschadiging van het DNA (mutaties), is het waarschijnlijk dat de vissen waren blootgesteld aan verhoogde concentraties genotoxische stoffen. In het grote experiment van 2011 met de F1-vis werd dit effect niet meer voor alle genen gevonden, maar was er in bepaalde gevallen juist sprake van remming van de expressie. Dit kan een gevolg zijn van een sterke remming van de genen die betrokken zijn bij celdeling, omdat die deels overlappen met de DNA reparatie genen.

3.3 Genclusters voor specifieke processen. Met een zogenaamd ‘gen ontologie’-onderzoek werd de expressie onderzocht van groepen genen die alle bij bepaald lichamelijk proces zijn betrokken. Omdat dit onderzoek is gebaseerd op het menselijk genoom worden alleen de stekelbaars-genen met een verwantschap met menselijke genen bij dit onderzoek betrokken. Specifieke genen voor vissen (zoals



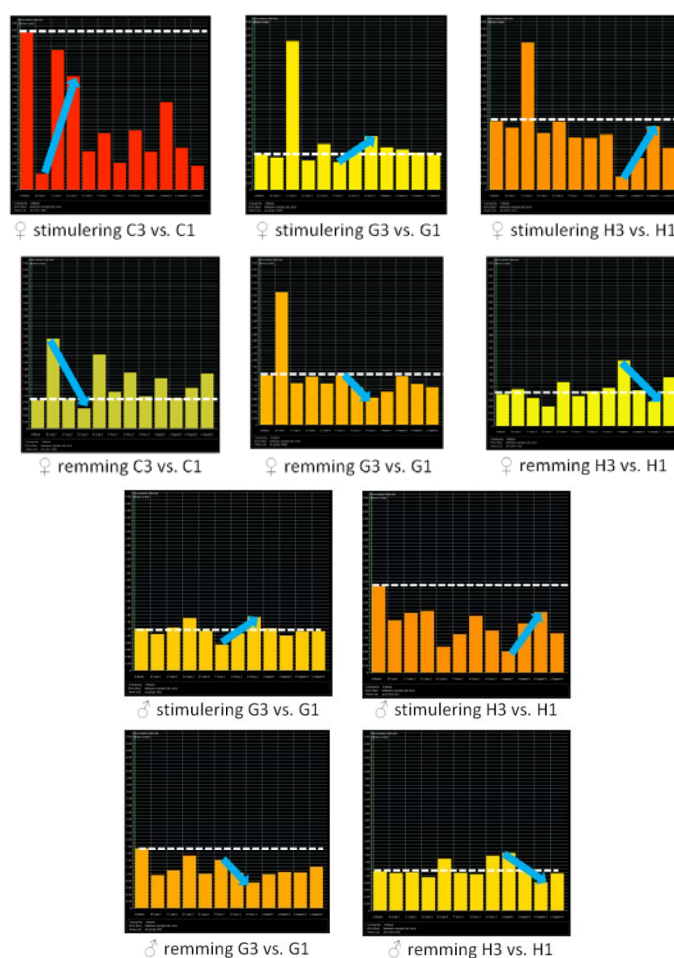
vitellogenines) kunnen hiermee niet worden bestudeerd. Op alle locaties werd een duidelijk verhoogde expressie waargenomen van de genen die betrokken zijn bij de immunologische respons (Figuur 6-4), wat kan duiden op blootstelling aan pathogene micro-organismen of weefselbeschadiging. Daarnaast is de expressie van genen die betrokken zijn bij ontstekingsreacties, insuline-achtige reacties, steroïde responsen (o.a. glucocorticoïden) en glucosemetabolisme op veel locaties verhoogd. De expressie van genen die betrokken zijn bij de celdeling, DNA-replicatie, mitochondriën (energievoorziening), cholesterol-biosynthese en eiwittransport was op veel locaties verlaagd. De expressie van genen die betrokken zijn bij oxidatie- en reductieprocessen was zowel verhoogd als verlaagd.

Figuur 6-4 Voorbeeld van de verhoogde expressie (rood en roze) van een cluster genen betrokken bij de immunologische complement-respons (♀ stekelbaars, Land van Cuijk).

3.4 Genclusters voor afwijkingen en ziektes. Er was een sterke overeenkomst in veranderingen in genexpressie na blootstelling aan alle RWZI-effluenten, die alleen op detailniveau verschilden. Ook waren er duidelijke verschillen in respons tussen mannelijke en vrouwelijke vissen. Het effect van een aantal van deze genetische veranderingen ten opzichte van de controlevis lijkt voor de gezondheid van de vis niet gunstig te zijn. Als veel van de waargenomen patronen van veranderingen in DNA-expressie naar menselijke ziekten worden vertaald, zien we een sterke relatie met leverbeschadiging en leverkanker. Hoewel (nog) geen histopathologisch onderzoek is uitgevoerd, werden tijdens het uitprepareren van de levers geen duidelijke leverbeschadigingen of tumoren gevonden. In het biologisch onderzoek werden geen duidelijke nadelige effecten van het RWZI-effluent op de stekelbaars gevonden (WIPE-rapport #7). Hierbij moet echter worden aangetekend dat de sterfte op een aantal RWZI-locaties hoog was, waardoor niet alle posities van alle moerassen zijn onderzocht. Veel van de gevonden afwijkingen in de stekelbaars leken ook gerelateerd aan het voedselaanbod.

4. Vermindering van het milieurisico van het RWZI-effluent door het zuiveringsmoeras

Om de invloed van het zuiveringsmoeras op het mogelijke milieurisico van het RWZI-effluent te bepalen is onderzocht of de gevonden effecten op de totale genexpressie ten opzichte van de blanco-controle in Den Helder afnamen van positie 1 naar positie 4 in de zuiveringsmoerassen. Hiervoor werd de gemiddelde expressie van alle genen met een significant verschil tussen posities 1 en 4 vergeleken met de niet blootgestelde vissen. Het bleek dat zowel voor de gestimuleerde als de geremde genen de expressie niet terugkeerde naar de niveaus van de controles, maar daar juist verder vanaf lag op positie 4. Omdat het laatste compartiment van de zuiveringsmoerassen echter weinig aan de zuivering bijdraagt (zie overige WIPE-rapporten) is deze analyse herhaald voor de posities 1 en 3 van de zuiveringsmoerassen. Bij deze analyse bleek dat zowel de gestimuleerde als de geremde genexpressies in het Land van Cuijk (alleen ♀, te weinig ♂) en Hapert dicht bij de niveaus van de controles lagen, terwijl die in Grou iets verder van het controleniveau waren verwijderd (Figuur 6-5). Dit kan duiden op een licht positief effect van de eerste twee compartimenten (sedimentatievijvers en rietvelden) van de zuiveringsmoerassen.



Figuur 6-5 Gemiddelde expressie van genen die significant verschillen tussen posities 1 en 3 van de verschillende moerassystemen (C = Land van Cuijk, G = Grou, H = Hapert)

Omdat niet ieder verschil in genexpressie schadelijk hoeft te zijn kan het zuiverende effect van de moerassen op de toxische stress beter worden bestudeerd met individuele genen of genclusters. Als we de verschillen in expressie van individuele genen vergelijken met de blanco-controles, dan lijkt er voor de hormoonverstoring in het Land van Cuijk een zuiverend effect op te treden, omdat de sterke vitellogenine-inductie in mannetjes verdwenen is op positie 4 (Figuur 6-3). Voor de overige

onderzochte genen en genclusters zijn deze effecten minder duidelijk. Er is echter nog veel werk te doen om alle mogelijke effecten te onderzoeken.

5. Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

Hoewel de waterharmonica de kwaliteit van RWZI-effluenten verbetert, lijkt het rendement voor de verwijdering van organische microverontreinigingen beperkt (WIPE-rapport #1). Het grootste voordeel van het zuiveringsmoeras hierbij is een bufferwerking van toxische afwijkingen van de effluentkwaliteit, zodat calamiteiten in het oppervlaktewater kunnen worden voorkomen. Omdat de laatste compartimenten in de door WIPE onderzochte zuiveringsmoerassen (paaivijver, afvoersloot en moerasbos) vrijwel geen zuiverende werking lijken te hebben is het mogelijk beter om deze compartimenten te vervangen door rietvelden, waar een zuiverend effect voor hormoonverstoring lijkt te bestaan.

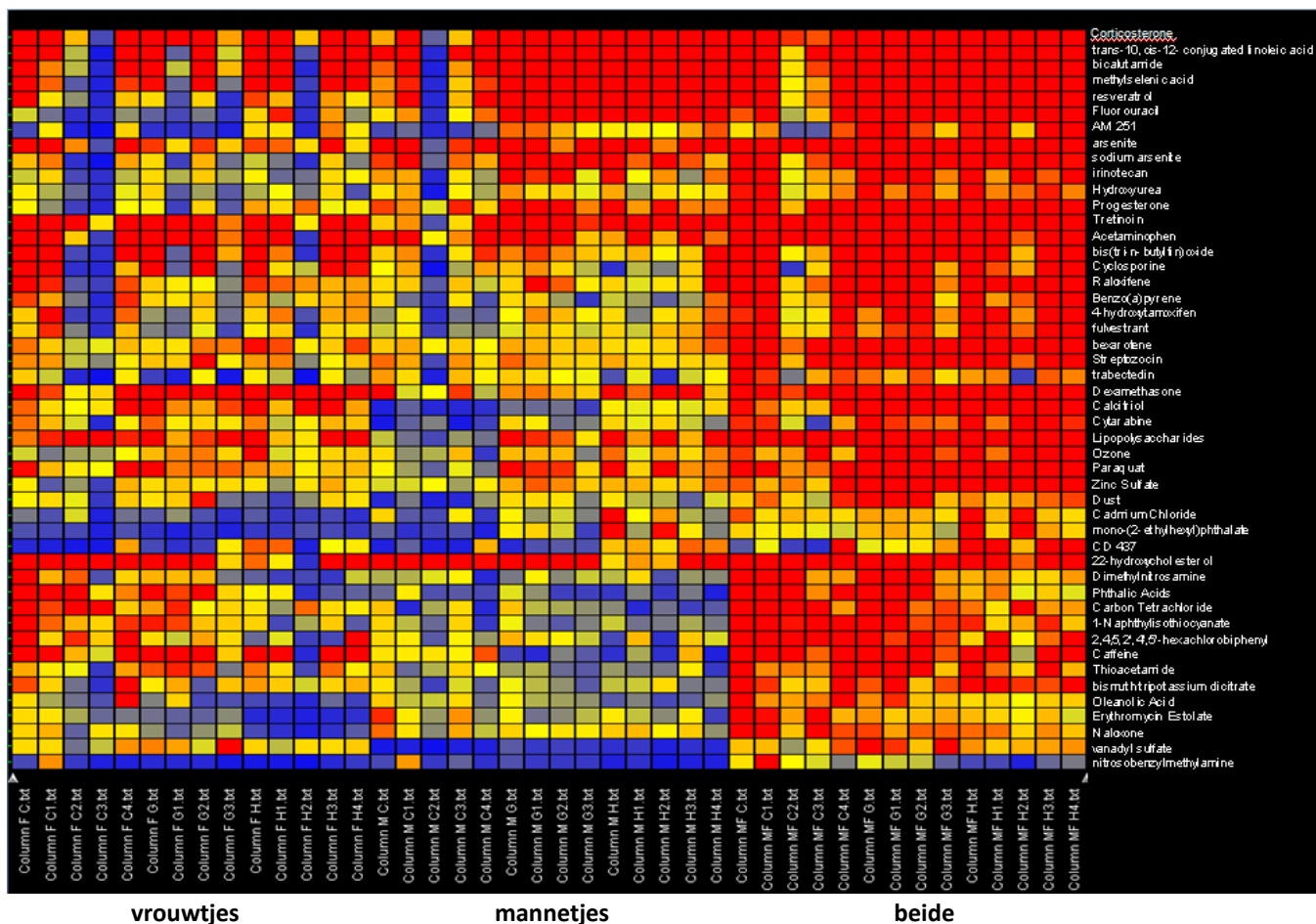
6. Toxicologie: relaties tussen biomarkers, chemie en bioassays

Hoewel de onderzochte F1-vissen sinds hun geboorte in de mesocosms aanwezig waren is niet het effect van alle stoffen waaraan ze in deze periode zijn blootgesteld meetbaar met een transcriptomics-onderzoek. Genexpressie is de eerste reactie van een organisme op een bepaalde chemische stressfactor. Als de stof echter niet meer in relevante concentraties aanwezig is, zal de respons minder sterk worden. Daarom zullen alleen de meest recente blootstellingen, enkele weken voor het doden van de dieren, een meetbaar effect hebben op de genexpressie. De laatste meetcampagnes van de chemie en de bioassays werden echter enkele maanden voor de bemonstering van de vis uitgevoerd, zodat het lastig is om de toxicologische relaties tussen biomarkers en de overige parameters aan te tonen.

Met een experimentele *CTD-enrichment analysis* zijn veranderingen in genexpressie gerelateerd aan blootstelling aan bepaalde typen stoffen (Williams et al., 2011). Bij deze methode worden significant verschillende genexpressies in stekelbaars uit de zuiveringsmoerassen vergeleken met genexpressie-responsen die zijn opgenomen in de *Comparative Toxicogenomics Database* (CTD). Omdat deze database resultaten bevat van responsen van individuele stoffen met verschillende soorten proefdieren, weefsels, doseringen en blootstellingstijden is dit geen exacte analyse, maar wél kan een indicatie worden verkregen van de stoffen met een bepaalde werking die voorkomen in het complexe mengsel waaraan de stekelbaarzen waren blootgesteld. Als de stoffen met de hoogste statistische CTD-associatie per locatie (Figuur 6-6) worden vergeleken met de stoffen die volgens de chemische analyses het hoogste risico vormen, dan zien we weinig overeenkomsten. De chemisch bepaalde Top 10 van stoffen met een hoog risico wordt gedomineerd door pesticiden, die door hun hoge toxiciteit al bij lage dosis een risico vormen, terwijl de met genexpressie bepaalde chemicaliën worden gedomineerd door medicijnen.

Er zijn echter ook veel overeenkomsten gevonden tussen stoffen die zowel chemisch als genetisch werden aangetoond (bijvoorbeeld pyreen, cafeïne, benzo(a)pyreen, chlorpyrifos, hexachloorbenzeen, carbamazepine, acetaminofen). De verschillen in meest relevante stoffen worden vooral veroorzaakt door de verschillende benaderingen. Bij de genexpressie worden ook niet-schadelijke veranderingen geregistreerd. Omdat de absolute concentraties van de medicijnen een groot deel vormen van de stofconcentraties in de watermonsters (13-48%) kunnen ze een relatief grote invloed hebben op de biochemie van de vissen. Daarnaast worden de verschillen bepaald doordat enerzijds niet alle stoffen zijn geanalyseerd of in de passieve samplers concentreren en anderzijds niet alle stoffen zijn opgenomen in de CTD-database. Op de Cuijk 2-positie was bijvoorbeeld een sterke CTD-aanwijzing voor ethynylestradiol-blootstelling (anticonceptiepil), maar die stof kon niet chemisch worden geanalyseerd. Omdat de expressie van genen die betrokken zijn bij celdeling significant geremd was in alle moerasystemen werd een mogelijke blootstelling voorspeld aan medicijnen zoals resveratrol, fluorouracil, irinotecan en cytarabine, die worden toegepast bij de chemotherapie tegen kanker. Deze stoffen zijn over het algemeen moeilijk afbreekbaar en kunnen dus in RWZI-effluenten voorkomen. De

verminderde celdeling zou een verklaring kunnen zijn voor de lagere levergewichten die werden gevonden in de aan RWZI-effluent blootgestelde vissen.



Figuur 6-6 Heatmap van statistische associatie tussen de veranderingen in genexpressie in stekelbaarzen uit de drie WIPE-moerassen (ten opzichte van blanco's) en stoffen uit de CTD-database; rood = significant en blauw is niet-significant.

Met zes in-vitro bioassays zijn de celtoxiciteit, de hormoonverstoring (estrogene, androgene en groeihormoonactiviteit), de dioxine-achtige toxiciteit en het effect op cellulaire uitscheiding van stoffen onderzocht. Over het algemeen was er een grote spreiding in de effecten, zowel in de tijd als per locatie/positie. Het is daarom lastig om duidelijke relaties aan te tonen tussen de responsen van bioassays en biomarkers. De gemiddelde respons van de DR-LUC om stoffen met dioxine-achtige effecten aan te tonen was op alle locaties gemiddeld even hoog, terwijl de vergelijkbare expressie van cytochroom P4501A in de stekelbaars duidelijk verhoogd was in Cuijk en Grou. Bij de laatste bemonstering werd met de ER-LUC een verhoogde estrogene activiteit (♀ hormoon) waargenomen op positie Cuijk 2, hetgeen goed overeenkwam met de sterke vitellogenine-inductie in de stekelbaarzen op die positie. Hoewel de ER-LUC-activiteit sterk afnam in de rietvelden verdween de sterke estrogene hormoonverstoring in mannelijke stekelbaars uit Cuijk echter pas in de afvoersloot, na passage door de rietvelden. Het is opvallend dat op alle locaties een remming van de genexpressie van estrogene receptor in de vrouwtjes werd waargenomen, behalve op positie C2. In de mannetjes was de expressie van dit gen alleen op positie C2 duidelijk verhoogd, terwijl op de overige posities geen effect werd gevonden. Helaas kon de reproductie van de vis uit mesocosm C2 niet worden onderzocht door een te hoge sterfte. De androgene activiteit (♂ hormoon) was bij de laatste twee bemonsteringen het hoogst op positie C2. De expressie van de androgene receptor in de stekelbaars

was op bijna alle locaties in zowel mannetjes als vrouwtjes gestimuleerd, behalve op de posities C2 en C3, waar de hoogste estrogene hormoonverstoring werd waargenomen. Met de TR-LUC-bioassay voor het thyroïde groeihormoon werd vrijwel geen respons gevonden, terwijl de genexpressie van dit hormoon in de stekelbaars alleen licht was verhoogd (vooral bij vrouwtjes). Met de CEPIA-test werd een lichte remming gevonden van de activiteit van de cellulaire uitscheiding van chemicaliën (MXR = *Multi Xenobiotic Resistance*). In de vis werd juist een licht verhoogde expressie van P-glycoproteïne (P-gp) gevonden, vooral in de vrouwtjes. P-gp is een van de belangrijkste eiwitten die een rol spelen bij dit cellulaire MXR verdedigingsmechanisme.

Er zijn relaties onderzocht tussen de bioassays voor algemene toxiciteit met cellen (MTT), bacteriën (Microtox), algen (algentest) en watervlooien (Daphnia-test) en de genexpressie in de stekelbaars. De algemene toxiciteit was in het algemeen licht verhoogd in de zuiveringsmoerassen, maar kwam slechts sporadisch boven de voorlopige richtwaarde voor ecologisch risico (WIPE-rapport #3). Een opvallende correlatie was de relatie tussen de cytotoxiciteit (MTT) en de verhoogde expressie van genen die betrokken zijn bij apoptose (geprogrammeerde celdood) in de stekelbaars. Daarnaast werd een interessant verband waargenomen tussen de verhoogde respons in de algentest en de expressie van genen die betrokken zijn bij de energievoorziening van de cellen (bijvoorbeeld ATP-synthese en ademhaling).

7. Samenvattende conclusies

De vissen die zijn blootgesteld aan de RWZI-effluenten hebben een duidelijk ander genexpressiepatroon dan de controlevissen die in schoon water opgroeiden. De genen waarvan de expressie significant is veranderd zijn betrokken bij belangrijke biologische processen:

- individueel, bijvoorbeeld cytochroom P450 (ontgiftiging) en vitellogenine (productie eieren)
- onderdeel van functionele systemen, bijvoorbeeld hormoonhuishouding, immuunrespons, ontstekingsreacties, energiemetabolisme, insuline-achtige reacties, steroïde responsen, glucose-metabolisme, celdeling en DNA-replicatie.

Enkele veranderingen van de genexpressie kunnen een indicatie zijn van effecten op reproductie, weefselbeschadiging of tumvorming. Hiervan werden op het eerste gezicht (zonder microscopisch onderzoek) nog geen aanwijzingen gevonden in de vissen. Veel biochemische afwijkingen kunnen zijn veroorzaakt door blootstelling aan medicijnen. Naast chemische stoffen kunnen ook verschillen in voedselaanbod en blootstelling aan pathogene micro-organismen een rol spelen bij de waargenomen effecten. Na het verschijnen van dit rapport zal nog een uitgebreidere analyse op de enorme dataset van dit onderzoek worden uitgevoerd. Voor de meeste afwijkingen in genexpressie werd geen herstel gevonden door de zuivering met de waterharmonica, maar toch leek een lichte verbetering zichtbaar op de gemiddelde afwijkingen van de controlevis, vooral na de eerste twee compartimenten van de moerassen (sedimentatievijvers en rietvelden). Een langere verblijftijd van het water in rietvelden zou een mogelijke aanbeveling kunnen zijn om de moerassystemen verder te optimaliseren.

Summary

This report describes the application of transcriptomics by DNA microarrays to detect changes in gene expression in stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to wastewater-treatment plant (WWTP) effluents and effluents remediated within constructed wetlands. The key objectives of the project have been achieved:

1. The design and annotation of a stickleback whole transcriptome microarray suitable for optimization of the design of an operational array for any stickleback tissue.
2. The identification of genes expressed in stickleback liver and design of a stickleback liver gene microarray that can be applied to any stickleback study employing this tissue.
3. Comprehensive gene expression profiling of male and female stickleback liver tissue from fish exposed to effluents or remediated effluents.
4. Evidence of gene expression changes between fish that have and have not been exposed to WWTP effluents.
5. Evidence of gene expression changes between fish exposed to effluents from different WWTPs.
6. Evidence of a reduction in stickleback gene expression responses to xenoestrogens after bioremediation of WWTP effluent.
7. Functional characterization of genes that are differentially expressed upon exposure to WWTP effluents. These include CYP1A and vitellogenins and additional functionally-related groups of genes that have been linked to key biological and toxicological processes including carcinogenesis, endocrine disruption, immune response and inflammation in mammals.
8. Experimental characterisation of differentially expressed genes with respect to prior knowledge on their chemical regulators, resulting in hypothetical predicted profiles of chemicals eliciting the responses at each site.

These experiments have aimed to link the composition of complex effluent mixtures with biological responses, and with potential health outcomes for the fish. Although responses have been detected that are consistent with 'traditional' pollutants, such as PAHs, PCBs and heavy metals, the majority of responses were instead consistent with endocrine disruption and effects of pharmaceuticals. A more extensive summary is given in Dutch.

6.1 Introduction to stickleback biomarkers

This report describes the *in vivo* biomarkers work package of the WIPE project, using stickleback transcriptomics. These experiments comprised exposures of three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) to wastewater treatment plant (WWTP) effluents and to bioremediated effluents from artificial wetlands. The gene expression responses in the liver of the sticklebacks to the effluent exposures were determined by DNA microarrays, in comparison with an un-exposed group. The results of the gene expression profiles were compared to studies on stickleback survival, growth and reproduction. The main objectives of this work package of the WIPE project were to determine the feasibility and the ecological relevance of innovative techniques for water quality monitoring, such as transcriptomics biomarkers, in order to design an integrative environmental monitoring strategy. The measurements were used to determine the impact of bioremediation in constructed wetlands on WWTP effluent quality, mainly focussed on the fate and toxicity of emerging substances. Together with the other WIPE work packages, this research is focussed on presenting an optimised design of constructed wetlands for the bioremediation of WWTP effluents, preferably in combination with positive effects on biodiversity.

6.1.1 Biological Effects Monitoring

Traditionally, aquatic toxicology has focussed on heavy metals and carcinogenic organic compounds such as halogenated and non-halogenated aromatic hydrocarbons. Aquatic environments are monitored by chemical analysis for the most common, toxic and persistent members of these groups. For a number of years there has been concern regarding the introduction of endocrine disruptors, such as ethinyl-estradiol (Sumpter and Jobling, 1995), to the environment through WWTPs. More recently there has been much interest in the effects upon the aquatic environment of pharmaceuticals and personal care products (Fent et al., 2006), and in novel emerging pollutants such as nanoparticles (Oberdorster et al., 2005).

WWTP effluents include very complex mixtures of chemical contaminants, indeed the REACH programme estimates that at least 30,000 different chemical compounds are currently in use in industrial and domestic applications within the EU. Many of these will be disposed of via WWTPs in the course of normal usage. Chemical monitoring is essential to discover the fate of priority pollutants in the WWTPs and wetlands, but cannot monitor all possible compounds. There is a clear need to consider the effects of these chemical mixtures upon the biota, as these directly link to effects on biodiversity and can also be employed as an overall indicator of environmental quality. This is termed 'biological effects monitoring'.

At its simplest, biological effects monitoring can be used to determine the acute toxicity of a pollutant or mixture to test species. Lethality is an obvious negative outcome, but sub-lethal effects can also be determined. These include studying chronic effects upon health, growth and reproduction that can impact the success of a population in the longer term. Biomarkers include a wide range of structures, substances or processes that can be measured in organisms or their products and provide information on their exposure to, or the effects of, stresses including chemical contaminants (van der Oost et al., 2003).

Concentrations of chemical contaminants in water do not necessarily directly relate to biological effects upon aquatic wildlife, especially in the context of complex mixtures. Contaminants can be lipophilic, partitioning into sediment and particles within the ecosystem. They can be persistent, or quickly degraded by chemical and physical processes and metabolised by biota. These metabolites

may themselves be more or less toxic than the parent compounds. In an ecosystem, contaminants may directly enter higher organisms such as fish, with uptake via the gills, they may be exposed to the fish by ingestion of particles, either in suspension in the water column or derived from the sediment and they may enter the organism indirectly via the food it consumes. Lipophilic compounds are especially capable of bioaccumulation, increasing in concentration in animals further up the food-chain. When contaminants enter an organism they may be absorbed from the gut with different efficiencies, may be metabolised, excreted or accumulate in different organs, and can cause organ-specific damage. Toxicants exert their effects by a variety in modes of action. Often chemicals with similar structures exhibit similar modes of action, thus their toxic effects in a mixture may be additive, for example the polycyclic aromatic hydrocarbons. Effects of mixtures may also be un-related, antagonistic (inhibition of mutual effects) or synergistic (stimulation of mutual effects). A complex contaminant mixture can thus result in unanticipated and unpredictable effects on exposed wildlife (Spurgeon et al., 2010).

Therefore, in estimating the risk to the environment of a complex pollutant, it is clear that both chemical measurements and biological effects measurements are required.

6.1.2 Experimental and analytical systems

When studying the effects of contaminants upon species in an ecosystem, the potential for biomagnification implies a focus on organisms at the top of the food chain. However the top predators are generally difficult to maintain, rare and often legally protected species, making such studies impractical. Therefore our studies have employed the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), a small fish species that is towards the top of the food chain, but not the top predator. The diet of sticklebacks comprises invertebrates, that themselves consume smaller organisms, while the sticklebacks are important prey for larger carnivorous fish species, such as pike (*Esox lucius*), and birds including spoonbills (*Platalea leucorodia*) and kingfishers (*Alcedo atthis*).

Sticklebacks (Figure 6-1) exhibit a number of benefits relevant to ecotoxicology, making them uniquely suited for this study. They can be maintained comparatively easily in the laboratory or mesocosms and are commonly found in European fresh-water ecosystems. Indeed they are present within the constructed wetlands at all three sites studied, so are directly relevant. They have a very wide range, being endemic in Europe, North America and Northern Asia, and are adaptable to environments of different salinities, from sea-water to fresh-water. While the majority of stickleback research has focussed on ethology and evolutionary studies, they are increasing in prominence as an ecotoxicological test species, with particular focus on endocrine disruption (Katsiadaki et al., 2002; 2007). They are sexually dimorphic, usually allowing assignment of sex by inspection, and also have a nascent XY sex chromosome system, enabling genetic sex determination (Peichel et al., 2004; Leder et al., 2010). This is a key advantage for studies of estrogenic and androgenic endocrine disruption. In common with other fish species they express vitellogenin proteins in liver in response to estrogens and they also have an androgenic biomarker, spiggin protein, which is produced in the kidneys of male fish. Of European freshwater fish, they one of the few species that has been genome sequenced. The draft genome sequence is available at http://www.ensembl.org/Gasterosteus_aculeatus/Info/Index, and gene annotation for this species is well-advanced. Their genome is compact for a vertebrate, at 460Mb, containing 22 chromosome pairs.



Figure 6-1 *The three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus)*

This study focussed on the liver tissue of sticklebacks. Liver is the main tissue for metabolism of xenobiotics and in fish is the location of egg-yolk precursor protein (e.g. vitellogenin) production and the major site of lipid storage, often accumulating lipophilic contaminants. Therefore liver has traditionally been the most widely-used vertebrate tissue for toxicology and biological effects monitoring. This allows the application of very extensive prior knowledge on vertebrate hepatotoxicity to aid interpretation of our data.

Experimental exposures of sticklebacks to the WWTP effluents were carried out on-site in flow-through mesocosms, with the fish eating invertebrates from the wetlands that were introduced along with the effluents. This arrangement allowed for similar conditions to the wild sticklebacks living in the wetlands, for example in terms of temperature, light, diet, suspended particulates and possible biomagnification via food, while avoiding the problem of fish migrating between different compartments of the wetlands. The control group of fish were maintained in clean water on a diet of daphnids. There were necessarily nutritional differences between the control and exposed groups, and between the mesocosms at the different wetlands that might have an additional impact on gene expression. Since there was no practical solution to solve it, this had to be taken into account with the interpretation of the results.

To detect responses of sticklebacks to the effluents, two approaches were taken. The first was to measure stickleback individual- and population-level ecological effects. These results are shown in detail in background document nr.7 'Survival, growth and reproduction of three-spined stickleback in WWTP purification wetlands'. While these measurements are directly ecologically relevant, they provide little information on the mechanisms by which any such responses occur. Traditionally, single biomarker assays have been used to characterise biological responses to toxicants. These include tissue-level effects, such as alterations in liver histopathology and molecular level effects, including alterations in concentrations of specific proteins or abundance of messenger RNA (mRNA) transcripts encoding these proteins. Examples include induction (an increase of) cytochrome P450 1A (CYP1A) as an indicator for planar aromatic hydrocarbons, vitellogenin, indicating estrogen or xenoestrogen exposure and metallothionein, induced in response to heavy metals. While these biomarkers can indicate responses to key classes of environmental contaminants, the use of single biomarkers precludes the discovery of new responses, or the detection of toxicants with different modes of action, and can be misleading in the study of mixtures. For example there is evidence of antagonism

between estrogenic and CYP1A-inducing compounds. Therefore a multi-biomarker approach was required.

“Omic” technologies now allow the analysis of thousands of metabolites, proteins or mRNA transcripts in parallel in a single experiment (Figure 6-2). The benefit of these approaches is that they are ‘open’ techniques that makes no prior assumptions about the nature of any stresses the animals may be exposed to (Van Aggelen et al., 2010). Each application; transcriptomics, proteomics and metabolomics, has its own strengths and weaknesses when applied to biological effects monitoring. These technologies complement one-another and the chemical, bioassay and organism-level approaches. However, applying all three was beyond the scope of this project.

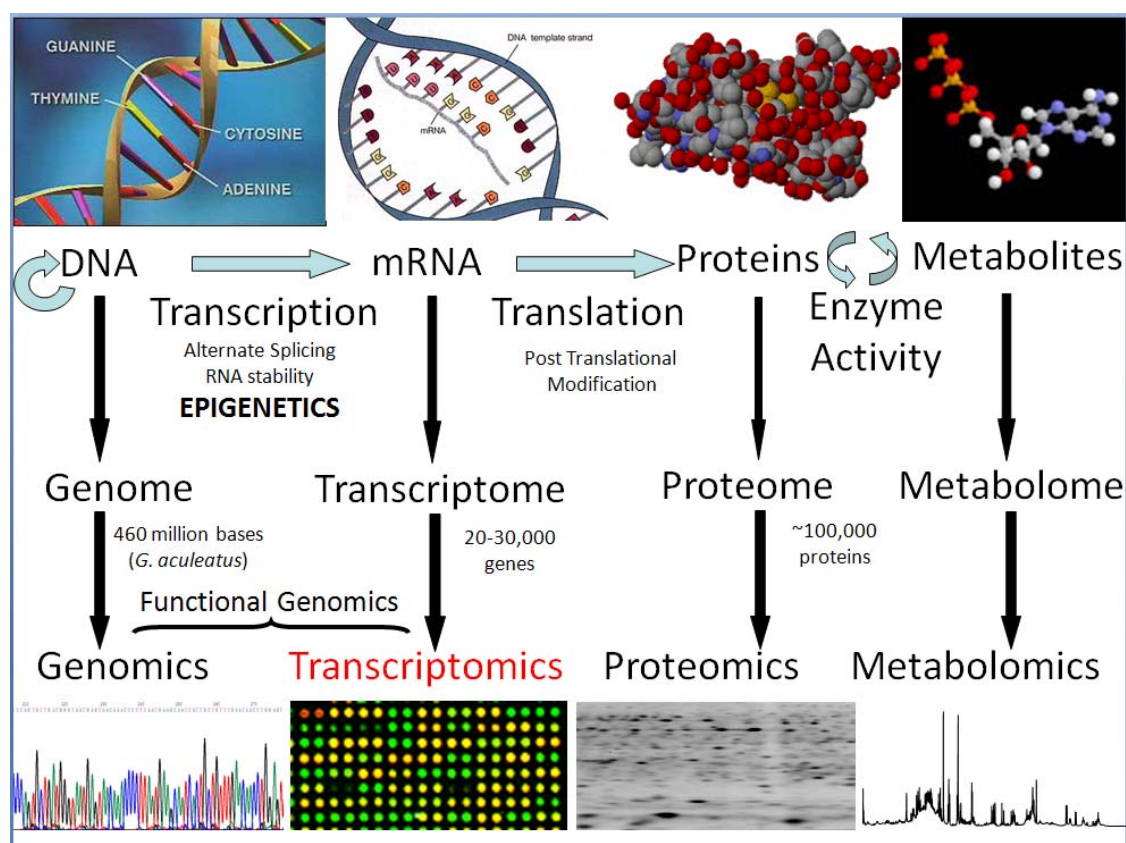


Figure 6-2 The Central Dogma in relation to “omics” technologies

Metabolomics, the analysis of small molecules (e.g. ATP) in biological samples by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), or mass spectrometry (MS) is a powerful, reproducible and high throughput technique, but metabolite identification is a difficult process, thus making biological interpretation of the data problematic. Proteomics is generally carried out by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) with protein identification by mass spectrometry or by a number of more innovative liquid chromatography-mass spectrometry techniques (LC-MS). While biologically informative, the 2D-PAGE methods often suffer from lack of sensitivity and reproducibility while cost and sample requirements are high for both techniques and throughput relatively low. Transcriptomics, measuring the amount of messenger RNA transcripts produced from each gene, is biologically informative and sensitive, and capable of higher throughput than proteomics. While the cost-per sample is relatively high and it is more prone to biological and experimental variability than metabolomics, the infrastructure costs for analytical instruments are far lower. A number of different transcriptomic techniques exist, including cDNA microarrays, oligonucleotide microarrays and high-throughput sequencing (RNA-seq) (Wang et al., 2009). Of these, oligonucleotide arrays allow better reproducibility, quality control and coverage of the transcriptome than cDNA arrays and currently

have a significantly lower cost per sample than the sequencing approaches. This was important due to an anticipated high level of inter-individual variability, requiring the use of multiple replicates to enable robust statistical analysis. The School of Biosciences at the University of Birmingham previously constructed a cDNA array for three-spined stickleback (Geoghegan et al., 2008) and used this to determine the effects of the endocrine disrupter ethinyl-estradiol (Katsiadaki et al., 2010), the heavy metal copper (Santos et al., 2010) and the polycyclic aromatic hydrocarbon dibenzanthracene (Williams et al., 2009) upon hepatic gene expression in sticklebacks. These experiments showed that distinct sets of genes were altered in expression by each treatment, including known biomarker genes, such as CYP1A and vitellogenin, and novel responsive genes. The existence of the draft genome for stickleback allowed the design of an oligonucleotide microarray. The benefits of such a system are superior printing and quality control of the spots on the array leading to lower technical variability between slides and batches of slides, higher specificity of oligonucleotide probes in comparison with cDNAs, the ability to include probes for any genes identified in the genome and the option to carry out eight independent experiments on one slide, facilitating higher throughput. It was necessary to optimise the microarray design for the Dutch/European population of sticklebacks. The Agilent oligonucleotide array system employed utilises 60-mer (60 base pairs) oligonucleotide probes.

6.2 Principle of the applied technologies

6.2.1 Principle of the methods

The approach to gene expression profiling that was taken within this project was the DNA microarray. A DNA microarray is simply an ordered arrangement of individual spots bound to a substrate, in this case a glass slide (Schena et al., 1995). Each spot contains probes that all bind to a specific transcript. These probes are artificially-synthesised single-stranded 60-base long DNA molecules (60-mer oligonucleotides) that are designed to have complementary sequences to specific transcripts. If the probe encounters a transcript which it does not complement, then affinity between the two molecules is weak and the transcript is not bound. If the probe encounters a fully complementary transcript, then the binding affinity is strong and the probe will capture the transcript, this is referred to as hybridisation.

Precision synthesis allows the production of microarrays with hundreds of thousands of distinct spots in the area of a typical glass microscope slide. The system we employed (Agilent Sureprint 8x15k) comprised eight identical arrays on each slide, each array containing 15,000 individual spots, each made up of a different oligonucleotide. Use of an 8-section cover-slip (Figure 6-3) allows eight different samples to be hybridised to each slide, reducing cost and increasing throughput.

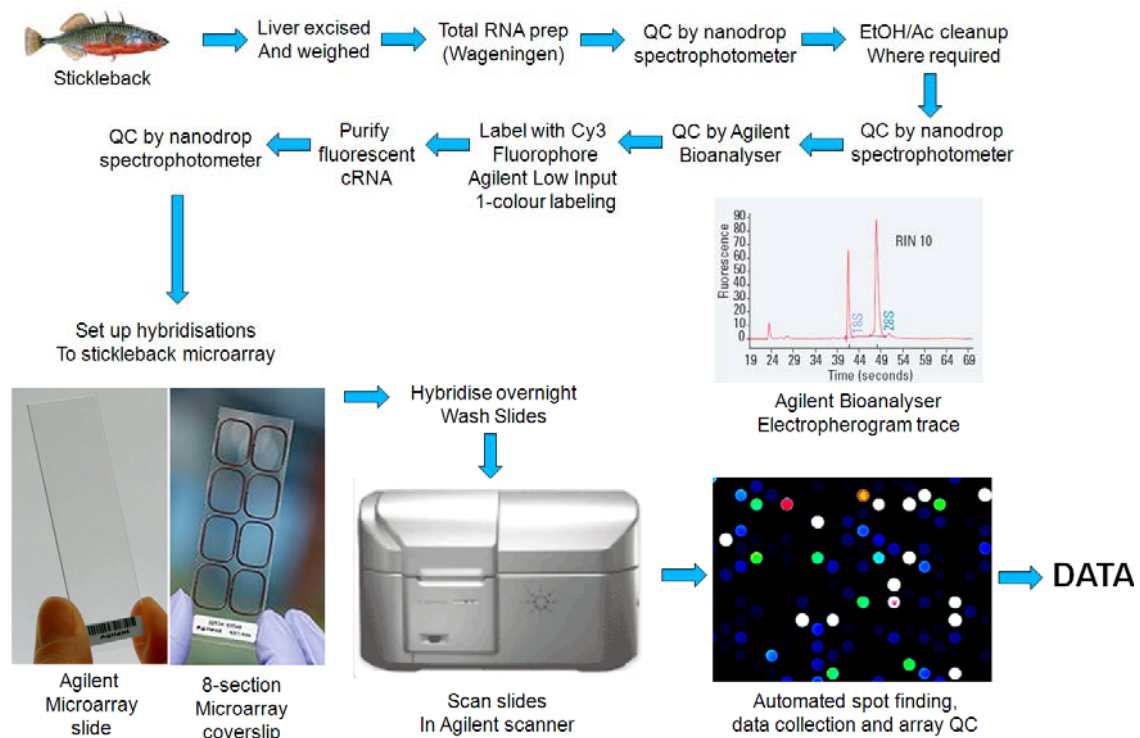


Figure 6-3 Microarray process overview

The overall scheme for the microarray experiment is shown in Figure 6-3. To use the microarray for gene expression analysis, first it is necessary to purify RNA from the tissue of interest. It is important to carry out quality control checks on the RNA. This is achieved by spectrophotometry and

electrophoresis. Samples that fail QC are re-purified or discarded. The purified total RNA contains 18S and 28S ribosomal RNA, but the mRNA of eukaryotes is polyadenylated, having a long sequence of 'A's at the 3' end of the transcript, so this can be used to select mRNA during the labelling procedure by means of a complementary oligo-dT primer. The mRNA is converted to cRNA and labelled with the fluorescent nucleotide Cy3-CTP (detailed in Methods section). Subsequently the labelled cRNA mixture is hybridised to the microarray overnight, washed and scanned.

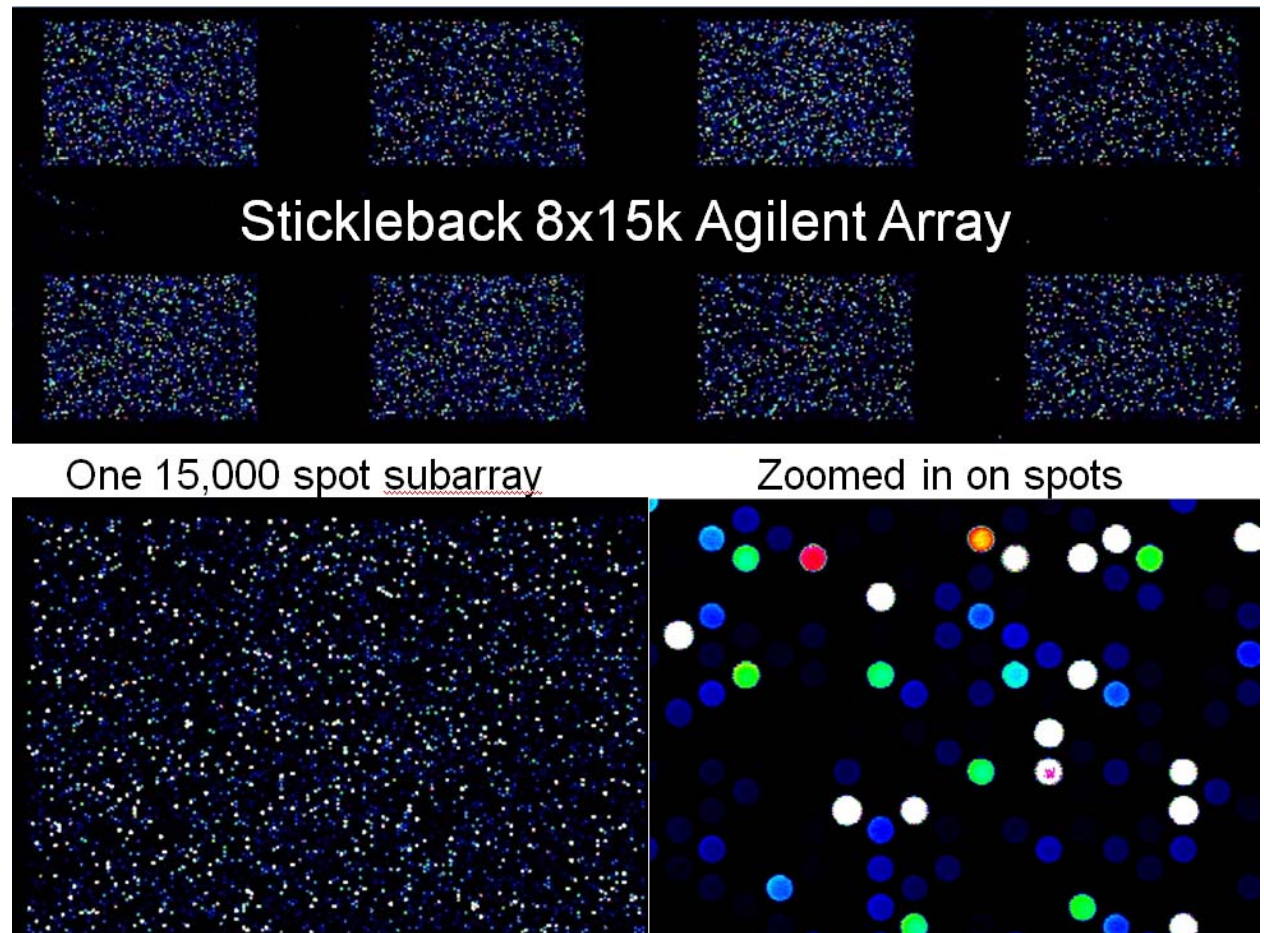


Figure 6-4 Images of the scanned, hybridised stickleback Agilent microarray; spots are false-coloured by 532nm intensity

The data can then be imported into statistical analysis packages (e.g. Genespring) and analysed to find gene expression changes between groups of samples. Before carrying out the array experiments gene annotation was downloaded from Ensembl and other databases and the probes synthesised for the microarray were given unique identifiers and matched with the annotation for each gene. From the scanner, data from the microarray spots are given the unique probe identifiers, thus data and gene annotation are linked together. Data is imported into Genespring and normalised and scaled such that it is comparable between arrays. Any unreliable data (eg. highly variable or with intensity values close to background) is removed.

Analysis proceeds by a number of routes. The basis is to carry out statistical tests to determine whether a gene is expressed differently in two or more groups of samples. Due to the large number of variables, multiple testing corrections are essential to avoid false positives, producing False Discovery Rates (FDR) instead of P-values. The lists of 'differentially expressed genes' generated by statistical analysis can also be filtered by 'fold-change' in comparison with a control group to determine the

degree of induction or repression. While differentially expressed genes are identified based upon differences between sampling groups, they can also be related to other measured parameters, for example sex, weight or length of the fish. Additionally, the overall profiles of gene expression can be examined. These can be visualised using Principal Components Analysis (PCA) or clustering algorithms, and reveal the overall similarities and differences between individual samples based on the main components of variation.

Having determined lists of differentially expressed genes, the next stage is biological interpretation of the data. In some cases individual genes can be informative. For example, well known biomarker genes such as CYP1A or vitellogenin can indicate the presence of aromatic-hydrocarbon receptor inducers or (xeno)estrogens respectively. Further interpretation can be carried out by enrichment analysis. Genes are annotated with various information, this includes functional annotation, for example Gene Ontology (GO) that classifies genes based on the molecular function, biological process and cellular component that their protein products are associated with. The Birmingham lab (Williams et al., 2011) recently developed a method for enrichment analysis using gene-chemical and gene-disease associations derived from the Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Additionally, proprietary software such as Ingenuity Pathway analysis can be used to perform enrichment analyses and to reconstruct pathway networks based upon protein-protein interaction and other prior data. The basis of enrichment analysis is a statistical test that compares the number of times a given annotation term occurs in a list of genes (for example those induced in response to effluent) with the number of times that annotation term occurs in the list of all genes detected in the experiment. Fisher's Exact Test is often used, together with a multiple testing correction to produce FDR values.

The results of such tests allow hypotheses to be formed regarding the change in conditions experienced by the organisms. For example, a significant enrichment of genes annotated with the term 'response to oxidative stress' would indicate the likelihood that the treatment or exposure induced oxidative stress.

6.2.2 Objectives of the transcriptomics measurements

The transcriptomics technology will be applied to investigate the potential toxic effects on stickleback, caused by the complex chemical mixture that is present in the WWTP effluents. In addition, the possible reduction of this toxicity due to bioremediation of the constructed wetlands will be examined. Every cell depends on proteins to catalyse the biological reactions that allow survival and growth. Inhibiting protein synthesis is swiftly lethal. The amino acid sequence of proteins is encoded in the DNA of genes contained within the nuclear and organellar chromosomes. To synthesise a specific protein, transcription of a specific gene is activated, generally by the binding of transcription factors. DNA is transcribed into messenger RNA (mRNA) which is later translated into protein at the ribosomes. When cells are subjected to changed conditions, such as the presence of a toxicant, they can respond by increasing synthesis of specific proteins in an attempt to maintain homeostasis.

The particular set of proteins, and by extension, mRNAs, that are over-expressed in this way can be diagnostic of the stress encountered by the animal. For example in the cell, polycyclic aromatic hydrocarbons, such as benzo(a)pyrene, are detected by binding to the aromatic hydrocarbon receptor, that translocates to the nucleus and stimulates increased transcription of the CYP1A gene (cytochrome P450 1A), producing more CYP1A mRNA, that is translated into more CYP1A protein. CYP1A protein is an enzyme that metabolizes benzo(a)pyrene, activating the molecule such that it can be conjugated (for example to glutathione), allowing its excretion from the cell. Therefore observing an increased amount of CYP1A mRNA, protein or enzyme activity can be used as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and compounds with similar structures. This

response is related to the amount of PAHs that is present in the cell so is dose-responsive, over a certain range of concentrations.

The change in amount of mRNA encoded by a specific gene is known as an induction (increase) or repression (decrease) of gene expression. Although this is not the only way in which protein levels are controlled, it is the major mechanism. In the case outlined above, CYP1A induction can be viewed as a biomarker of exposure, revealing whether the cell has encountered significant amounts of PAHs. It is also possible for gene expression changes to be used as biomarkers of effect. For example the metabolically activated PAH may bind to the DNA itself, causing DNA damage. If this is severe, the transcription of additional DNA-repair genes can be activated; this can be viewed as an indicator of genotoxic effects.

Some toxicants, and many pharmaceuticals, exert their effects by interaction with specific cellular molecules, disrupting signalling pathways and altering the cell's homeostasis. One example is ethinyl-estradiol, which targets the estrogen receptors, inducing genes that are usually controlled by the hormone estradiol. Vitellogenins are egg-yolk precursor proteins that are synthesised in fish liver in mature females then transported to the ovaries to be incorporated into the growing eggs. Males have no need for these proteins and have very low levels of circulating estradiol, so the expression of vitellogenin transcripts in male fish is barely detectable. However, if male fish are exposed to ethinyl-estradiol, a common component of waste-water due to its use in the oral contraceptive, then transcription of their vitellogenin genes is greatly increased, towards the levels seen in females. This indicates the presence of a xenoestrogen and is a biomarker of exposure (Arukwe and Goksoyr. 2003). Exposure may also imply effect, given high doses and chronic exposure. For example testicular abnormalities are increased in male fish exposed to high concentrations of xenoestrogens and breeding success is reduced (Kidd et al., 2007).

Shown above are a few examples of biological pathways, controlled by transcription, that can be affected by toxicants. Despite great progress, even in mammals there are many genes and many biological pathways that remain uncharacterised and innumerable gene-chemical interactions that have not yet been determined. However there is a very large body of pre-existing data that can aid the interpretation of gene expression changes. Gene expression profiling, the determination of mRNA levels for a large number of genes, can therefore be most informative in characterising an organism's response to a toxicant, or complex mixture.

6.3 Materials & Methods

6.3.1 Fish Exposures and Sampling

Sticklebacks were sourced and exposed as detailed in WIPE Report 7. Briefly, at each WWTP, Grou, Hapert and Land van Cuijk, mesocosms were installed, containing three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) these were supplied with water from all investigated wetland sampling positions. An additional mesocosm was employed using clean water. The F0 generation of sticklebacks were allowed to grow and reproduce within the mesocosms, and some were sampled for the preliminary transcriptomic development and analyses. In the second year the F1 generation of sticklebacks were sampled from the mesocosms and these fish formed the basis of the main study. Fish were sexed by external and internal morphological characteristics, morphological parameters (length, body weight, liver weight) recorded and livers were excised and preserved in RNAlater solution at -80°C.

6.3.2 Total RNA Preparation

Total RNA was prepared from stickleback liver samples (<10mg wet wt) at the University of Wageningen, The Netherlands, using a combined Trizol/Qiagen procedure. Tissues were homogenised and extracted with Trizol (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) and chloroform, then precipitated using isopropanol. The RNA was resuspended and 100µl solution was further purified using a Qiagen RNEasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands), incorporating the optional on-column DNase I digestion to remove genomic DNA. RNA was resuspended in nuclease-free water and a sample was used for spectrophotometry in a NanoDrop (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) 1ul spectrophotometer. Absorbances at 230nm, 260nm and 280nm were recorded, RNA concentration calculated and the RNA samples were shipped on dry ice to The University of Birmingham, UK, for further processing. The RNA quality thresholds for spectrophotometry were A260/A280 > 1.7 and A260/A230 >1.5. If samples did not pass these thresholds they were re-purified by ethanol/acetate precipitation. Further quality control was achieved by use of an Agilent Bioanalyser 2100 with Eukaryote Total RNA Nano chip (Agilent, Wokingham, Berkshire, UK). The quality threshold was RIN>7. All samples were tested and those failing QC were eliminated from the experiment.

6.3.3 Stickleback sexing by RT-PCR

The IDH2 gene (isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial groupXIX: 12,804,583-12,813,085 reverse strand) has previously been used to find the genetic sex of sticklebacks (Peichel et al., 2004), as it has a 32 base deletion at its 3'untranslated region (3'UTR) in what appears to be a developing Y chromosome in males (chromosome XIX). As this part of the gene is transcribed into RNA, it was possible to use total RNA to carry out genetic sex determination.

A composite sequence covering the area of interest was constructed from Bac sequences AC144485.2 and AC144487.1 – both X, and AC144488.2 and AC144486.2 – both Y. ClustalW was used to align the sequences, and a consensus sequence was generated.

Primers for LDH2 gene sex-specific deletion were designed using Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) and synthesised by Alta Bioscience (Birmingham, UK):

SSF 5'-AATCTGGATAAAGCCCTCGG-3' Tm 60.4-58.6C
SSR 5'-GACGAGCAAGATTTATTGGCA-3' Tm 60.2-58.3C
Expected product size 340 bp singlet for females
Expected product size 340 bp and 308 bp doublet for males

Briefly, stickleback Total RNA was reverse transcribed to cDNA using Superscript II (Invitrogen, Paisley, UK). This was amplified using SSF and SSR primers with Taq polymerase (Bioline) in a Mastercycler Gradient PCR machine (Eppendorf) with 55C annealing step and 30 cycles. Products were electrophoresed on a 2% agarose gel.

6.3.4 Microarrays

Sequences and Annotation

From the stickleback genome sequence in Ensembl, all predicted cDNA sequences (transcripts) were downloaded (http://www.ensembl.org/Gasterosteus_aculeatus/Info/Index). Also all Genbank Unigene sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>) for stickleback were downloaded. Unigene sequences are clustered EST sequences that are often low quality, sometimes even including parasite sequences, but have actually been found to be expressed in the stickleback, rather than just computationally predicted. ESTs are expressed sequence tags, these are sequences derived from sequencing of cDNAs reverse-transcribed from stickleback mRNA. They provide sequences of the transcripts of the actively expressed genes in the tissues studied.

These two sets of sequences were compared with one-another by MEGABLAST via a Biolinux server to identify the Unigenes that were represented in the Ensembl predicted cDNAs. Unigenes that matched with Ensembl predicted transcript sequences were discarded as the Ensembl sequences are more likely to be full-length. The Unigenes that did not match to Ensembl predicted cDNA sequences were added to the sequence list. There were 29118 Ensembl predicted transcripts (more than the number of genes due to potential alternative splicing) and 6425 Unigenes that did not match to them, for a total of 35538 sequences in all. Cut-offs for sequence matching and annotation were $P < 1E-06$.

The sequences were annotated by:

- Downloading annotations from the stickleback genome (BioMart <http://www.ensembl.org/biomart/martview/e8f8cc5d8c6005f9e4eefa85f037b585>)
- Downloading annotations for orthologous genes from other genomes (human, mouse, zebrafish, medaka, pufferfish *Tetraodon nigroviridis* and *Takifugu rubripes*).
- BLASTx searching all sequences versus the Genbank nr protein sequence database and versus Swissprot protein sequence database
- Use of Blast2GO (http://www.blast2go.org/start_blast2go) to find GO terms associated with these genes or their orthologues (Gotz et al., 2008).
- Use of the Comparative Toxicology Database (CTD) (Davis et al., 2009) to annotate genes with i) chemicals found to induce expression of that gene, ii) chemicals found to repress expression of that gene, iii) diseases with which the gene has been associated

Design of 2x105k Optimization Microarray

The 35538 sequences were submitted to Agilent's array design algorithm (EArray) and 3x 60-mer oligonucleotides were designed for each sequence where possible. The slide contained 2 separate 105,000 probe arrays. The design includes standard Agilent positive and negative control spots and can be accessed through the Agilent EArray website: <https://earray.chem.agilent.com/earray/>. To access the microarray design details contact t.d.williams@bham.ac.uk. The microarrays were printed by Agilent and delivered to The University of Birmingham Genomics Laboratory for analysis.

Table 6-1 Optimization Array details:

Gasterosteus aculeatus 2x105k - 2 colour
 Gene Expression
 Array Name- Agilent-027680: Optimization array 3 probes per gene: StickleOpt1
 Array Design- 027680_D_20200322
 University of Birmingham Genomics Lab

<u>Array</u>	<u>Barcode</u>	<u>Subarray</u>
Gasterosteus aculeatus 2x105k	252768010001	1_1
Gasterosteus aculeatus 2x105k	252768010001	1_2

Design of 8x15k Operational Microarray

After completion of the optimization microarray experiment (see Section 4.5.1) data were analysed in order to select the 15,000 probes that would be used for the operational microarray.

- i) From the three probes per gene, the probe displaying highest fluorescence spot intensity after hybridisation to mixed stickleback liver sample RNA was selected.
- ii) Of these probes those displaying an intensity of the hybridized spot greater than that of the local background by more than 2 standard deviations of the background score ($F > B + 2SD$) were selected. These were therefore genes that showed detectable expression in stickleback liver.
- iii) As these amounted to less than 15,000 probes, the selection of genes was supplemented by adding well-annotated genes (known protein coding genes) that were marginally below the intensity cut-off.

These were combined into a list of 15,000 probes, that was then used to construct the operational 8x15k microarray via the Agilent EArray website. The design includes standard Agilent positive and negative control spots and can be accessed through the Agilent EArray website online at <https://earray.chem.agilent.com/earray/>. To access the microarray design details contact t.d.williams@bham.ac.uk. The microarrays were printed by Agilent and delivered to The University of Birmingham Genomics Laboratory for analysis.

Table 6-2 Operational Array details:

Gasterosteus aculeatus 8x15k - 1 colour
 Gene Expression
 Array Name- Agilent-029767:8x15k Gasterosteus aculeatus stickleback liver
 Array Design- 029767
 University of Birmingham Genomics Lab

Microarray Methods

Labeling proceeds as shown in Figure 6-5. First the mRNA is reverse transcribed into cDNA. Secondly cRNA is synthesised from the cDNA, incorporating cyanine-3-CTP (Cy3) fluorescent ribonucleotides into the product. The final product is fluorescent Cy3-labeled cRNA, which is purified to remove reaction components and any remaining DNA, then hybridised to the microarray. This labelling procedure has several advantages. The cDNA and cRNA synthesis steps produce multiple copies of each transcript, thus amplifying the amount of RNA labelled, however these are linear, not geometric amplifications, so the relative proportions of different transcripts are maintained. This allows as little as 50ng of total RNA to be used per sample. Therefore the signal is amplified and the technique is sensitive. The procedure also uses 'Spike-Ins', artificial RNAs that are added to the sample prior to labelling. These can hybridise to specific control spots on the microarray and are added in known quantities so can be used for quality control of the whole procedure. Additionally as cRNA is the final product, unlike older protocols that fluorescently label the cDNA, there is no danger of contaminating genomic DNA being labelled and hybridising to the array.

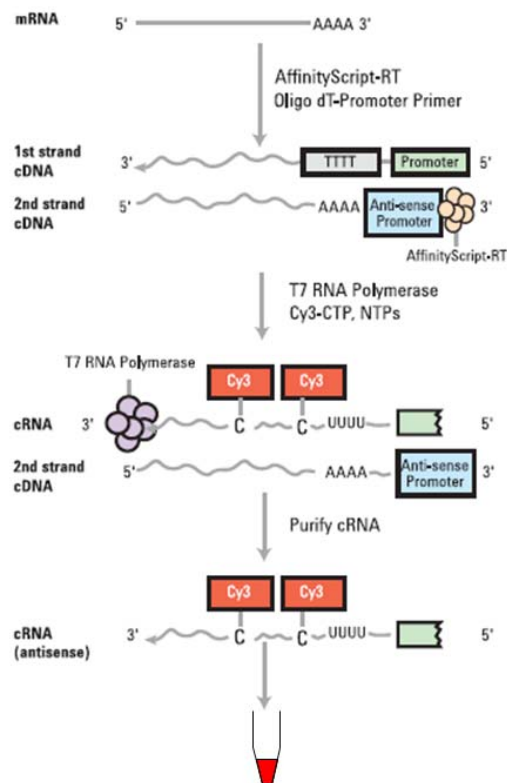


Figure 6-5 Agilent Low Input Quick Amp Labelling Kit Procedure

After hybridisation of the Cy3-labeled cRNA to the microarray, the slides are stringently washed and then scanned. The scanner uses a laser to excite the Cy3 fluorophores that are incorporated in the cRNA that is bound to the oligonucleotide probes. The Cy3 fluorophores then emit light at a specific wavelength of 532nm that is detected by a powerful CCD camera via optical filters. This is a highly sensitive detection system that allows efficient data capture from the fluorescent molecules bound to the spots with a resolution of 2 micrometers. The 532nm intensity is captured for each pixel of the image (Figure 6-5). As the spot layout is known, a grid layout is automatically generated and aligned with the image. Data within the area covered by each spot is captured and designated 'Signal', data from the area surrounding each spot is designated 'Background'.

Total RNA (50ng) that passed the QC checks was labelled using the Agilent Low Input Quick Amp labelling kit procedure (illustrated above) according to the manufacturer's instructions. Briefly, this consisted of adding artificial RNA 'Spike-Ins', reverse transcription to cDNA using Affinity-Script Reverse Transcriptase, followed by *in-vitro* transcription to cRNA using T7 RNA Polymerase while incorporating fluorescent Cy3-CTP. The labelled cRNA was purified using an RNeasy kit (Qiagen) and assessed by NanoDrop spectrophotometry (NanoDrop). Absorbances at 260nm, 280nm and 550nm were recorded, the concentration of Cy3 (Pmoles/ul) and RNA calculated and the Specific Activity found ($SA = ([Cy3(pmoles/ul)]/[RNA(ng/ul)]) \times 1000$). A total yield of cRNA >825ng and SA >6 was required to proceed. Any failed labelling reactions were repeated. For the Optimization Array, two pooled samples were labelled with Cy5-CTP by a similar protocol.

Microarray hybridisation was performed using an Agilent Gene Expression Hybridisation kit according to the manufacturer's protocol. Briefly, the hybridisation mixes were loaded onto 8x15K or 2x105k format slides, hybridised overnight (65°C), washed, stabilised and dried. The dried slides were scanned using an Agilent G2565CA microarray scanner system (Agilent technologies, Berkshire, UK). The optimization arrays were scanned using an Axon GenePix 4100B scanner (Molecular Devices,

Sunnyvale, CA, USA). The Agilent scanner output extensive quality control (QC) metrics. Where hybridisations failed QC metrics these hybridisations were repeated.

Data Analysis

Data were input to Genespring GX (v 11.5 or 7.3) (Agilent) and Quantile normalized. Data were filtered to remove spots with fluorescence close to the background level (base/proportional score intensity < 19 for main experiments) and to remove spots flagged 'bad' or 'marginal' by the scanner software. Data were grouped by sampling site and analysed within Genespring. Analyses included 1-way ANOVA with a Benjamini and Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) multiple testing correction (mtc) for FDR < 0.05, T-tests with the same mtc, 2-fold change cutoffs versus the control groups, Principal Components Analyses and Class-Prediction Tests. Data were also exported to TMEV (Saeed et al., 2006) and used for EASE enrichment analysis within TMEV as previously described (Williams et al., 2011). Additional enrichment analyses were carried out within Ingenuity Pathway Analysis (IPA) based on the predicted human orthologs of the stickleback genes.

6.3.5 Sampling scheme

Three sets of microarray experiments were performed, using three sets of stickleback liver RNA samples:

1-Optimization Array (2x105k)

F0 generation sticklebacks from the Blank, Cuijk, Grou and Hapert exposures

2-Pilot project (8x15k)

F0 generation sticklebacks from the Blank, Cuijk, Grou and Hapert exposures

F0 generation stickleback blank controls from Den Helder

3-Main project (8x15k)

F1 generation sticklebacks from the Blank, Cuijk, Grou and Hapert exposures

Table 6-3 The F0 sticklebacks received:

Site	No. samples	Type of exposure of the sticklebacks
Blank	5	control
Grou 1	3	effluent direct from WWTP
Grou 2	5	after daphnia ponds
Grou 3	6	after helophyte ditches
Cuijk 1	4	effluent direct from WWTP
Cuijk 2	4	after daphnia ponds
Cuijk 3	4	after helophyte ditches
Cuijk 4	2	final discharged water
Hapert 1	1	effluent direct from WWTP

Due to RNA quality issues some of these samples degraded, and 21 were available for use on the Optimization array and the Pilot Project arrays. Abbreviations used here are B = Blank, G = Grou, LC = Land van Cuijk, H = Hapert, C = Control Den Helder (additional blanks).

Optimization Experiment

The aim of the optimization experiment was to select 15,000 probes for the final array. These should give high hybridization activity, showing that they hybridize to European stickleback transcripts, and that they are expressed in liver. Therefore a wide selection of samples was used to ensure that genes expressed in the different environments would be represented within the experiment. Additionally one sample exposed to directly-produced WWTP effluent (Cuijk 1.1) and one unexposed control (Blank 5) were hybridized, to provide an initial indication of expression differences, though no

confidence should be placed in these results as there was no replication, therefore analysis of statistical significance was not possible. The sex of these samples was unknown at the time.

A 'pooled' RNA sample was made by mixing aliquots of the following samples: 2x B, 4x G2, 4x G3, 4x LC1, 1x LC2, 1x LC3. These were then labelled with Cy3. Sample B5 and sample LC1.1 were individually labelled with the 'red' dye Cy5. Incorporation of the fluorescent dyes into cRNA was checked by spectrophotometry (Nanodrop). All samples had specific activity (Pmoles dye/ug cRNA) >6. These were co-hybridised with the 'pool' sample to the arrays.

Array 1_1 = Pool-Cy3 and B5-Cy5

Array 1_2 = Pool-Cy3 and LC1.1- Cy5

Pilot Project Experiment

An additional 12 control samples from Den Helder were received and RNA purified. Genetic sex of the original FO and the Den Helder controls was determined. The following samples were labelled with Cy3-CTP and individually hybridised to the 8x15k operational arrays. The aims of this Pilot Project were to determine whether there was preliminary evidence of:

- a) Gene expression differences between effluent-exposed and control fish.
- b) Gene expression differences between fish exposed to effluents from different WWTPs.
- c) Gene expression differences after bioremediation of WWTP effluents.

The opportunity was also taken to determine gene expression differences between males and females.

Table 6-4 Pilot Project Samples and Arrays

Array	Barcode	Subarray	Date	Quality	Cy3 Sample	Sex
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_1	10/09/2010	excellent	G2.3	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_2	10/09/2010	excellent	LC2.4	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_3	10/09/2010	excellent	LC1.1	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_4	10/09/2010	excellent	G3.1	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_5	10/09/2010	excellent	C4.1	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_6	10/09/2010	excellent	B1.5	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_7	10/09/2010	excellent	G3.3	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710001	1_8	10/09/2010	excellent	LC1.2	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_1	10/09/2010	excellent	G2.2	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_2	10/09/2010	excellent	LC3.5	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_3	10/09/2010	excellent	LC2.3	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_4	10/09/2010	excellent	G2.6	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_5	10/09/2010	excellent	H1.1	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_6	10/09/2010	excellent	LC3.2	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_7	10/09/2010	excellent	G3.5	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710002	2_8	10/09/2010	excellent	LC1.3	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_1	16/12/2010	excellent	C.3	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_2	16/12/2010	excellent	C.9	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_3	16/12/2010	excellent	LC1.4	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_4	16/12/2010	excellent	C.7	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_5	16/12/2010	excellent	C.5	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_6	16/12/2010	excellent	C.11	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_7	16/12/2010	excellent	G3.4	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710005	5_8	16/12/2010	excellent	C.1	M

Array	Barcode	Subarray	Date	Quality	Cy3 Sample	Sex
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_1	16/12/2010	excellent	LC3.12	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_2	16/12/2010	excellent	G3.6	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_3	16/12/2010	excellent	B1.8	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_4	16/12/2010	excellent	C.4	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_5	16/12/2010	excellent	C.6	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_6	16/12/2010	excellent	C.10	F
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_7	16/12/2010	excellent	C.8	M
Gasterosteus aculeatus 8x15k	252976710006	6_8	16/12/2010	v good	C.2	M

Main Experiment

The main experiment utilised F1 sticklebacks collected from the Blank (B), Land van Cuijk (C), Grou (G) and Hapert (H) mesocosms. 81 male and 118 female stickleback RNA samples were received:

Table 6-5 *Numbers of Male and Female Samples & Quality Control for Main Project:*

Site	Males	Pass QC	Fail QC	Females	Pass QC	Fail QC
B	9	9	0	11	7	4
C1	3	3	0	6	6	0
C2	2	2	0	7	7	0
C3	6	6	0	4	3	1
C4	7	7	0	13	12	1
G1	10	10	0	10	10	0
G2	9	7	2	11	9	2
G3	9	9	0	11	11	0
G4	0			0		
H1	10	7	3	10	8	2
H2	6	6	0	13	12	1
H3	9	9	0	11	10	1
H4	1	1	0	11	11	0
Totals	81	76	5	118	106	12

Note: B = Blank, C = Cuijk, G = Grou, H = Hapert, 1-4 = sampling positions within the wetlands.

The aims of the main experiment were to achieve comprehensive gene expression profiles of the groups of fish from different sites, leading to biological interpretation and integration of the data with those from other studies, enabling characterisation of the biological responses to WWTP effluent and effects of bioremediation.

After RNA preparation, QC, labelling and microarray hybridisation, 182 samples passed and 17 failed quality controls.

These were taken forward into data analyses. Three 'experiments' were created within Genespring, males and females were considered independently, and all data was combined in a final 'experiment'.

6.4 Results

6.4.1 Optimization Experiment

The optimization experiment resulted in successful hybridisation of the pooled and individual samples to the 105,000 probe stickleback microarray (Figure 6-6).

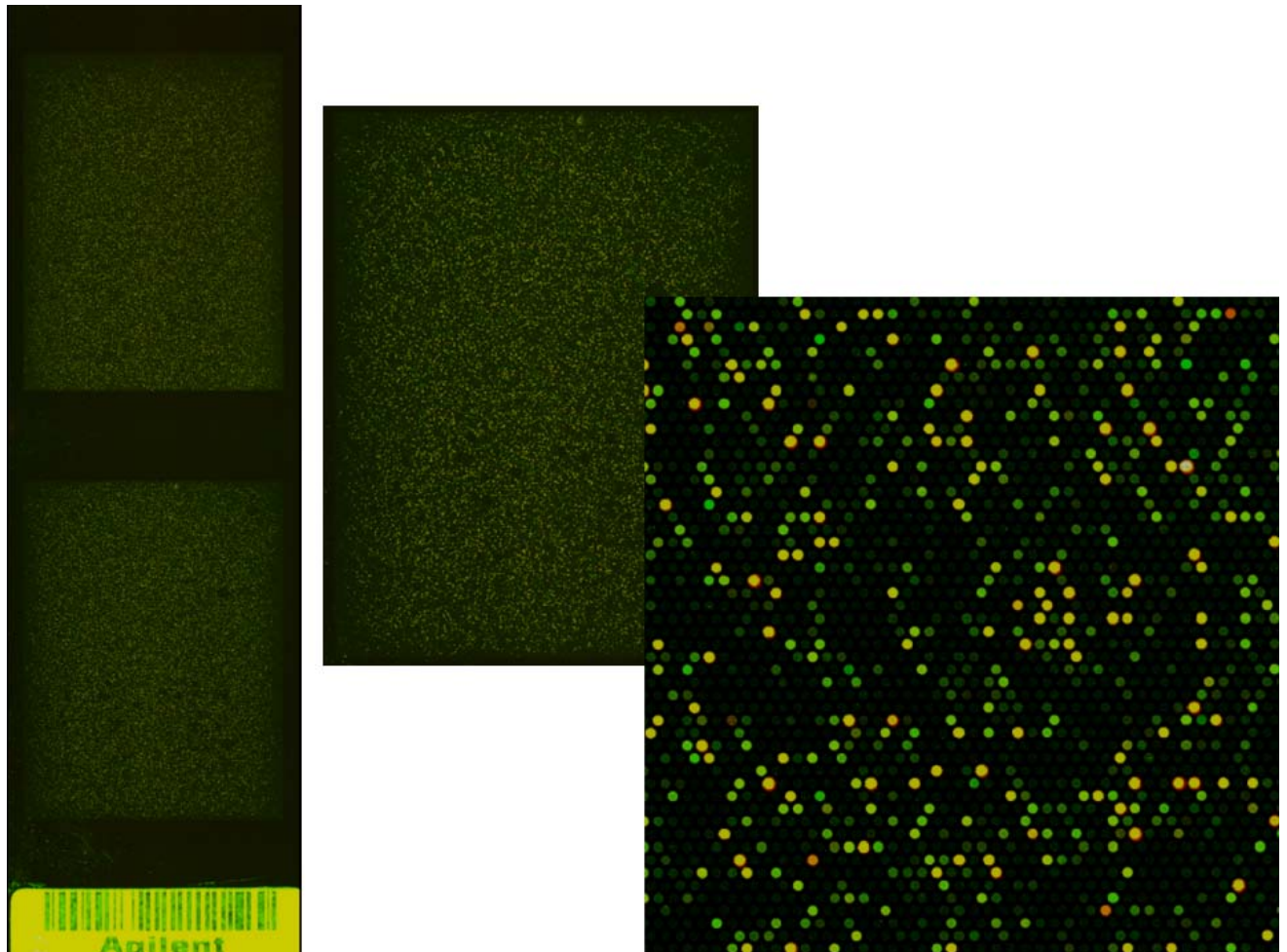


Figure 6-6 The stickleback optimization 2x105k microarray scanned with Axon 4100B.

1. 3 probes per gene were designed and used to make the 2x105k stickleback optimization array (StickleOpt1).
2. This was hybridized with Cy3 labeled pooled RNA from a selection of the 'pilot' samples, representing the variety of different sampling sites and either B1.5 (clean) or C1.1 (effluent) samples labeled Cy5.
3. Based on Cy3 intensities, one probe was selected for each gene that was detected in liver RNA. This was done by:
 - a) find the sum of Cy3 F-B for the two arrays, sort by this sum – finds highest intensity spots
 - b) find the $Cy3F - Cy3B + 2SD$, sum for the 2 arrays – finds spots where intensity is significantly higher than background
 - c) where these picked the same probe, this was selected
 - d) where 2 different probes were 'top' then the probe with highest (sum + sum-2SD) was selected

- e) 'not found' spots and spots where sum Cy3<100 were eliminated
- f) this gave 14742 probes. Highly repetitive genes such as U1 spliceosomal RNA were cut, and additional genes that did not pass the intensity cutoffs, but were toxicologically interesting based on gene annotation, were added back in.
- g) this resulted in 15113 probes

As an effluent-exposed sample (LC1.1) and a control sample (B5) were also hybridised to the arrays, their expression could be compared as a preliminary indication of gene expression changes due to effluent exposure. These results are not statistically valid as n=1. A selection of toxicologically relevant genes were apparently induced at least 2-fold in LC1.1, including endocrine related vitellogenins, choriogenins and estrogen receptors, stress-related transcripts including cytochrome P450s, multidrug efflux pumps, heme oxygenase and superoxide dismutase, and cell-cycle and apoptosis genes including cyclins and Diablo. Both LC1.1 and B5 were later shown to be female fish, whereas the pooled sample contained males and females.

6.4.2 Pilot Project

Stickleback genetic sexing

The stickleback sexing PCR technique was used to find the genetic sexes of the pilot project samples and the additional Den Helder samples, which had already been assessed by morphological inspection.

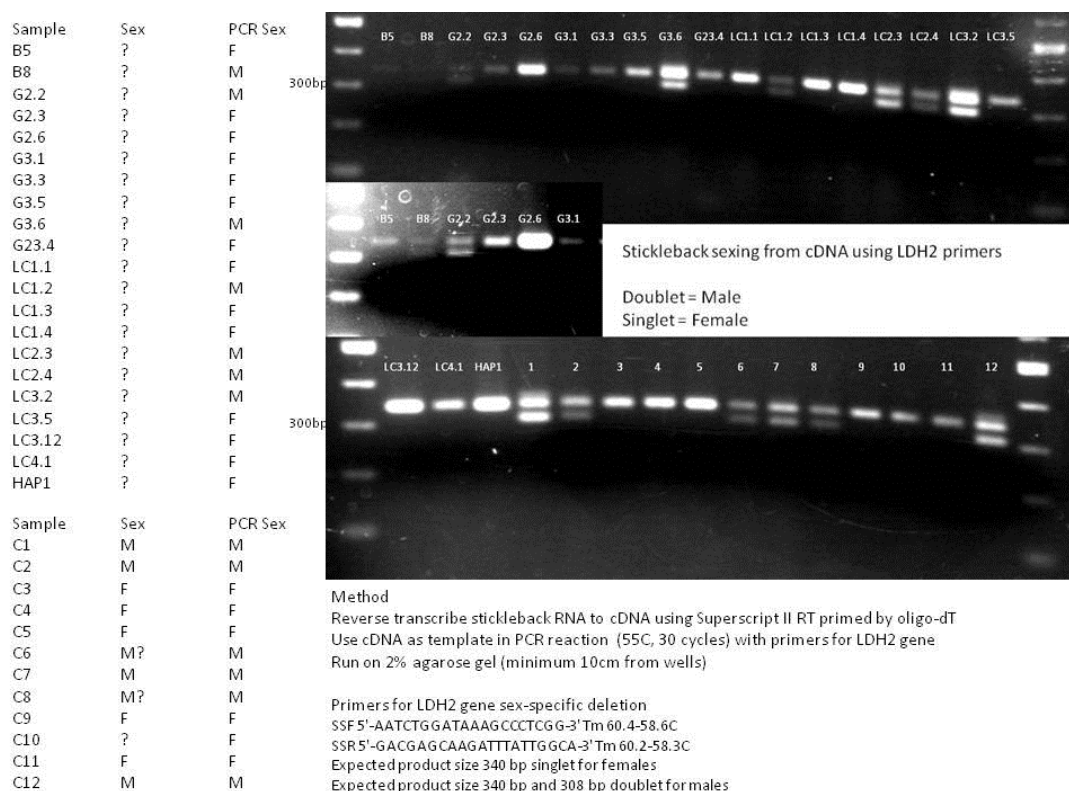


Figure 6-7 Stickleback Genetic Sexing.

As shown in Figure 6-7 above, the PCR sex determination method agreed perfectly with the sex determination carried out by examination. This gave confidence in the method, allowing assignment of genetic sex for all samples.

Microarray Performance

The acquisition of an advanced Agilent microarray scanner by the University of Birmingham Functional Genomics Laboratory allowed comparison of data determined by the Axon and Agilent scanners. The slides from the pilot project were scanned both with the Axon and Agilent systems. Using data from all samples, the fluorescence intensities from two different probes designed to bind to the same gene (sulfotransferase SULT3A1) were compared.

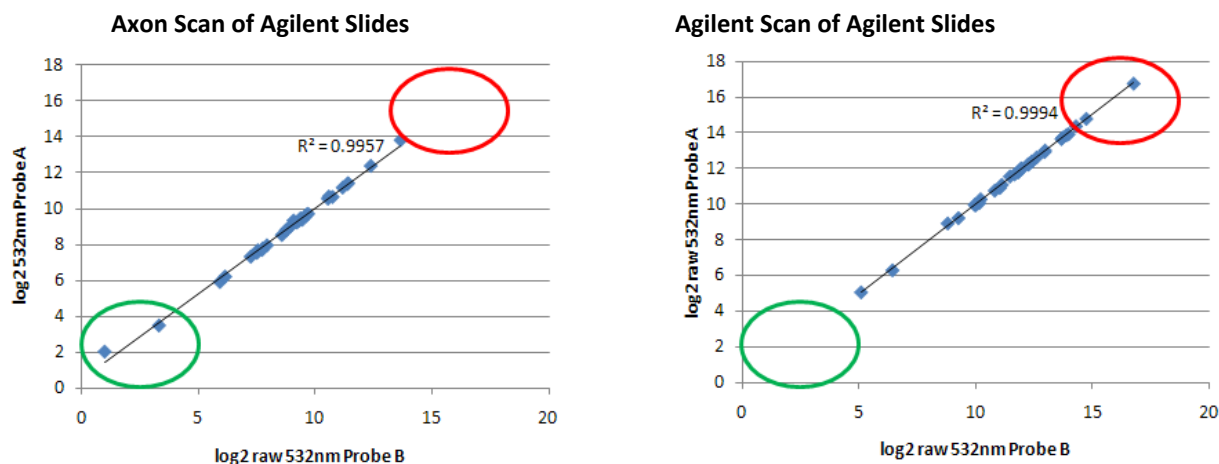


Figure 6-8 Microarray Performance

Both systems performed extremely well, with correlation values between the two probes (A and B) for the same gene of $r^2 > 0.99$ (Figure 6-8). The Agilent system was superior, with $r^2 > 0.999$. The Agilent scanner also has an extended dynamic range, improving sensitivity to weaker signals (in green circles) and preventing feature saturation (in red circles). Therefore the Agilent system was employed with all further microarrays.

Overall, ~13,000 transcripts could be detected in stickleback liver RNA using the microarray. The analysis of the experiment is limited by the low number of samples, thus low numbers of biological replicates. Maximum $n=3$, minimum $n=1$. Without sufficient replication the statistical analyses are insufficiently powerful. In the full-scale experiment 10 biological replicates at each sampling point were planned. These analyses should therefore be viewed only as preliminary.

Analysis Overviews of pilot project

Clustering and principal components analyses were employed to gain an overview of the similarities and differences in overall gene expression profiles between the different samples and sampling sites.

Figure 6-9 shows a hierarchical clustering heatmap (Pearson) based on the expression of all reliable genes (red indicates high expression, blue low expression, grey no data). Samples are grouped. Unexposed control samples 'B' and 'C' cluster together, displaying a distinct profile from the WWTP effluent exposed samples. Grou & Hapert samples cluster separately from the Land van Cuijk samples. The Hapert point 1 sample was more similar to Grou 2 than Grou 3. Within the Land van Cuijk cluster, sampling points 1 and 2 (raw WWTP effluent and post-*Daphnia*) cluster together, and sampling points 3 and 4 (post Helophytes and final discharged water) also cluster together.

This implies that:

- WWTP effluent exposed fish have differences in gene expression from unexposed fish.
- There are differences in gene expression between fish exposed to different WWTP effluents.
- Bioremediation alters the gene expression profiles, eg. LC1 and 2 versus LC3 and 4.

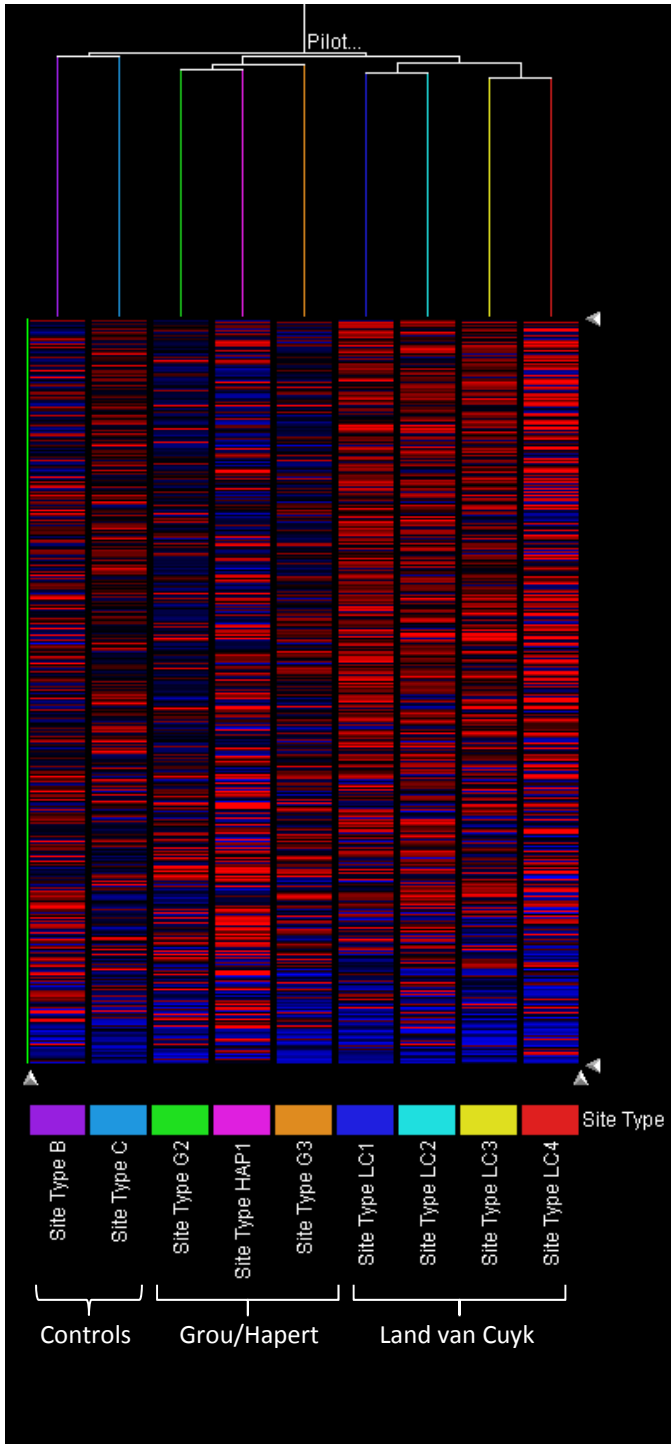


Figure 6-9 Hierarchical Clustering by Sampling Point and Site

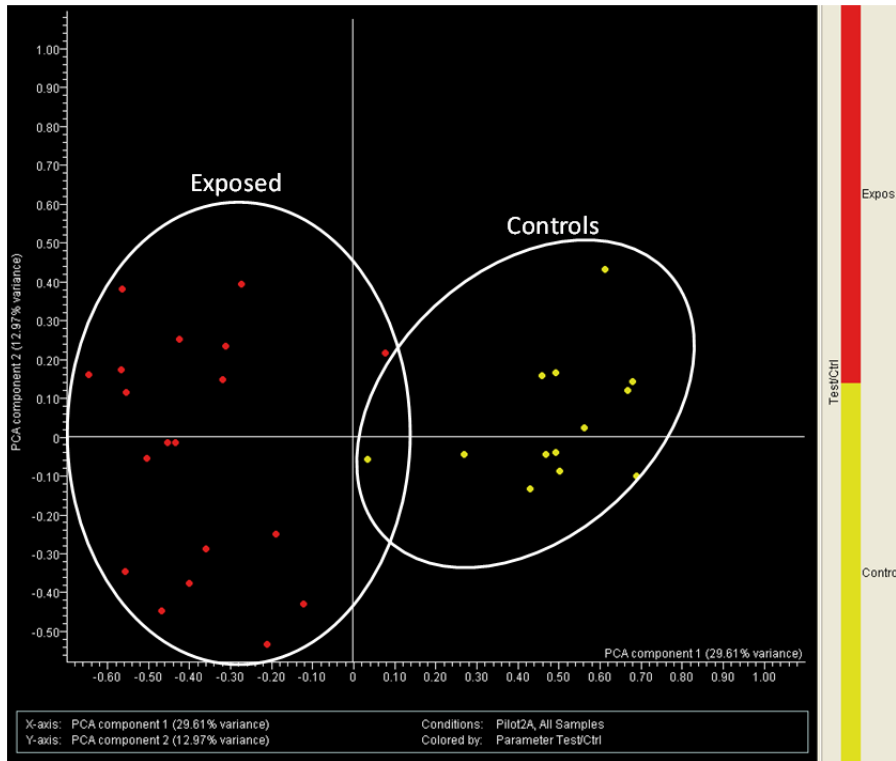


Figure 6-10A Principal Components Analyses by Exposed /Control

Figure 6-10A demonstrates that fish can be distinguished by their hepatic gene expression profiles dependent on whether they are unexposed controls or have been exposed to WWTP effluent at any post-treatment stage.

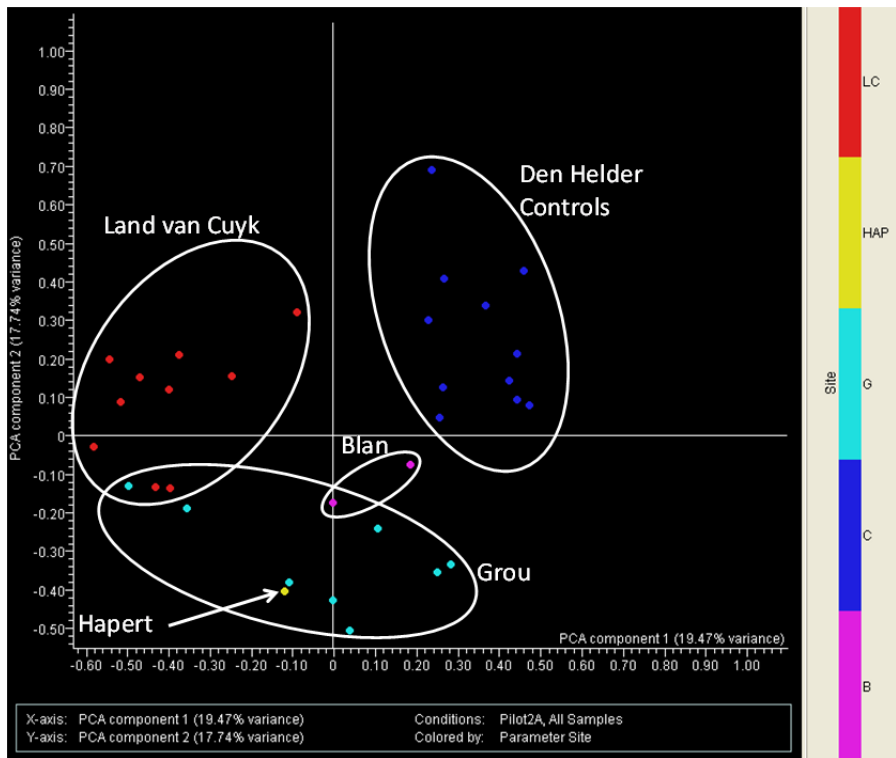


Figure 6-10B Principal Components Analyses by Site

Figure 6-10B shows that the fish can be distinguished by gene expression profiles dependent upon the WWTP sites from which they were sampled. No confidence should be placed in individual samples.

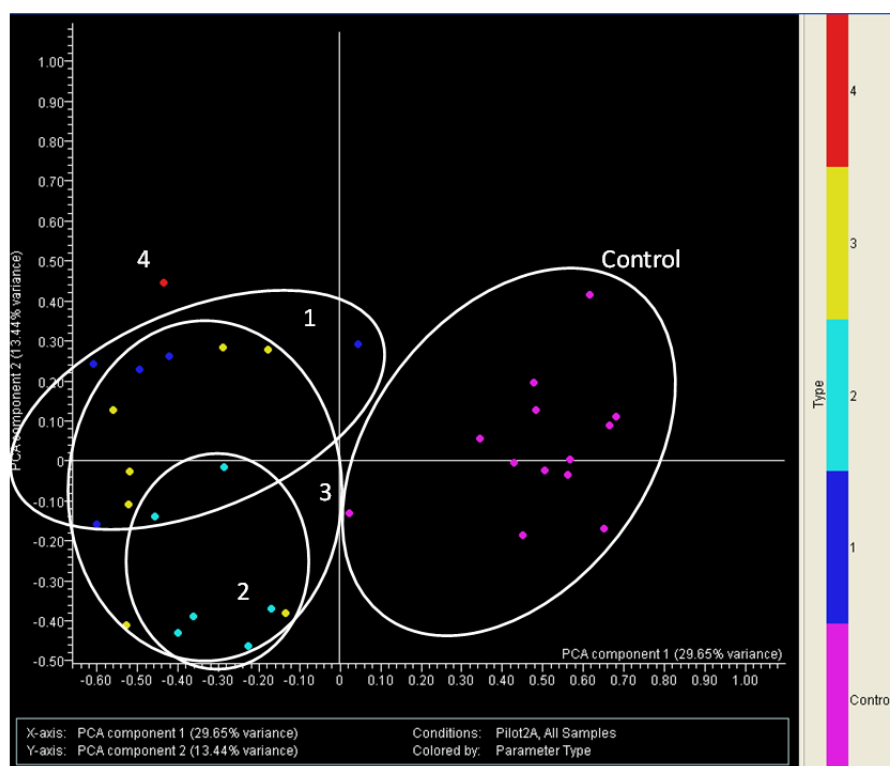


Figure 6-10C1: Principal Components Analyses by sampling position

Figure 6-10C1 shows that the fish can be distinguished by gene expression profiles dependent on whether they have been exposed to the WWTP effluents. Component 1 (X-axis) illustrates the differences between unexposed and WWTP effluent-exposed fish. However, while the distributions of the gene expression profiles are different, the exposed fish are not easily distinguished by sampling point, likely due to the differences between the Den Helder controls and the other samples, potentially due to the time of year of the sampling.

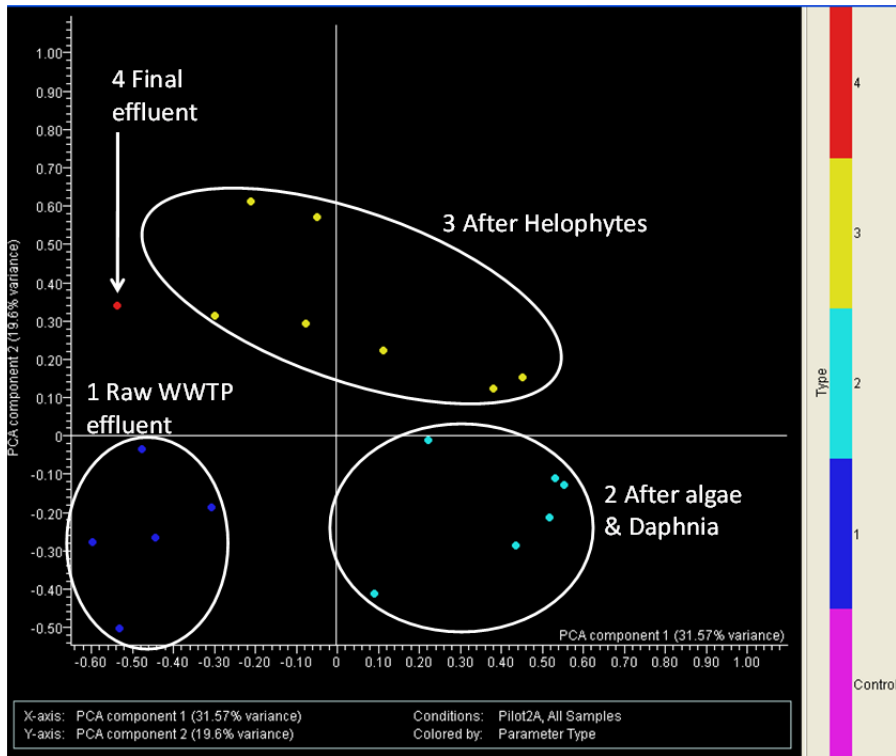


Figure 6-10C2: Principal Components Analyses by sampling position – without blanks

Figure 6-10C2 shows that the effluent-exposed fish can be distinguished based upon the bioremediation processes that have been applied to the effluent they were exposed to. The overall difference between raw and treated effluent is illustrated by PC2, whereas during intermediate steps the gene expression profiles differ along PC1.

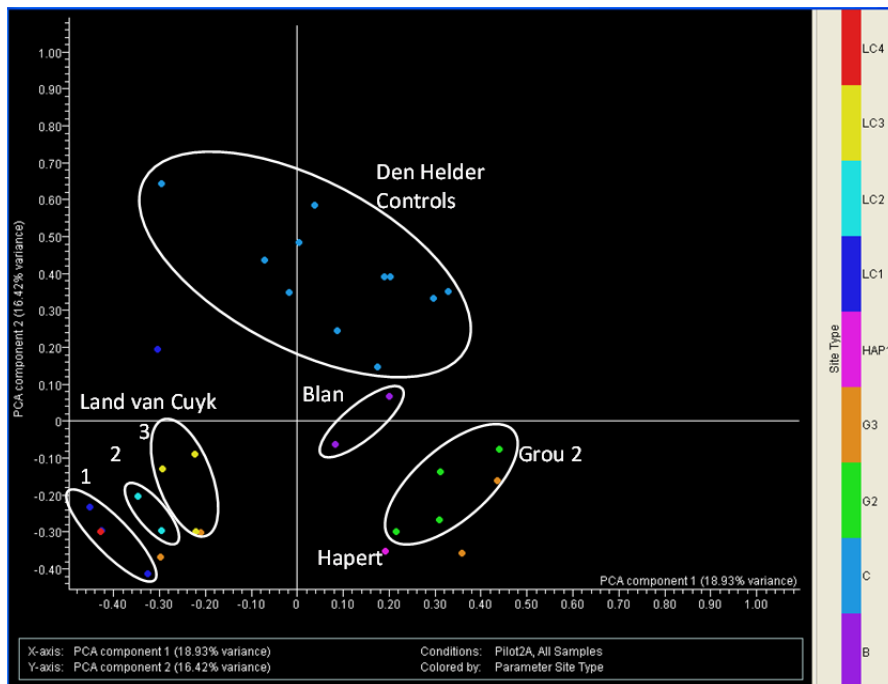


Figure 6-10D: Principal Components Analyses by site and sampling position

Figure 6-10D shows that there is separation of gene expression profiles when fish are grouped both by WWTP site and by the bioremediation state of the effluent. Again LC1 samples are most different from the untreated controls, with LC2 and LC3 returning towards the position of the controls. The Grou 2 samples appear to be affected in a different manner than the Land van Cuijk samples. However, there are some outliers, the Grou 3 samples (orange) fail to cluster together, one LC1 sample and the LC4 sample also appear to be outliers.

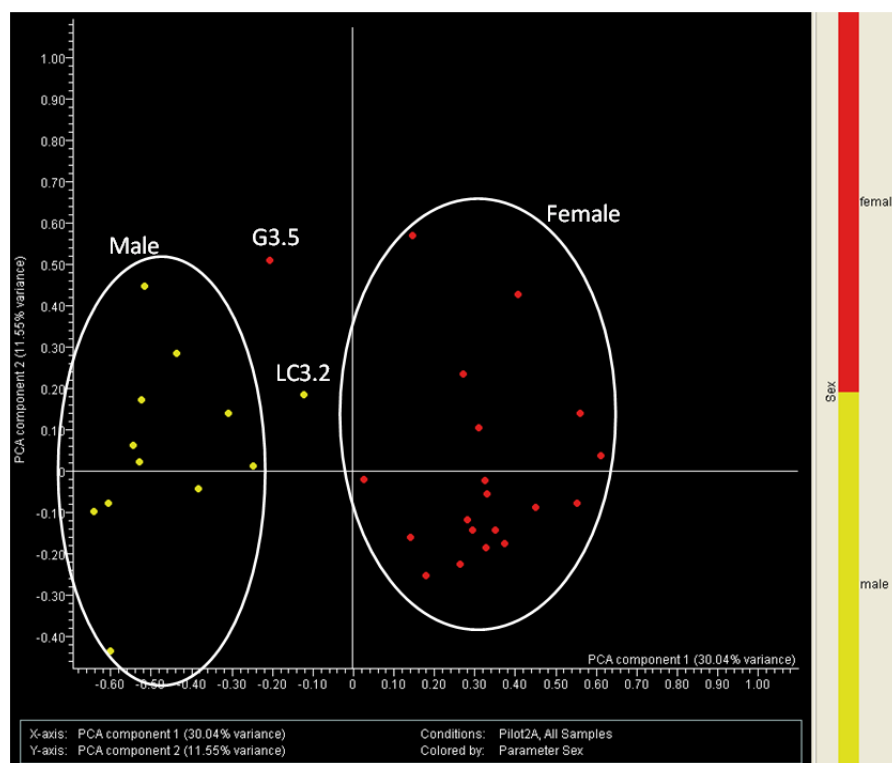


Figure 6-10E Principal Components Analyses by Sex

Figure 6-10E shows that fish can be distinguished by sex based upon their gene expression profiles. Male and female fish are separated along PC1, but two samples, female G3.5 and male LC3.2 are difficult to assign.

Individual Genes

Figure 15 shows expression of the three stickleback vitellogenin genes, A, B and C (phosvitinless VTG) for each sample. 15A shows raw expression values for these genes, 15B normalized expression values (normalized to the mean expression of each gene in all samples). Note the log scale. There is a very large variation in VTG expression between individuals.

Female fish have generally high expression of all VTG genes, whereas males generally have low expression, any figures below 10 are unlikely to be trustworthy as this is within the range of the background fluorescence. Within the sex groups there are some differences. Amongst the females, the Grou samples have a generally lower expression, especially of VTG A. This could potentially be due to exposure to anti-estrogens in the effluent, or be due to sampling at a different stage of the breeding cycle. For example, in a previous study we have shown that as females enter vitellogenesis, the different VTGs are induced at different times, with VTG C preceding VTG B (Katsiadaki et al., 2010).

The male fish show VTG expression that is generally low to undetectable. However there may be indications of estrogenic endocrine disruption at the Land van Cuijk site. Three of these male fish show VTG C expression that is at least detectable. Whether this is a genuine effect will require further samples to determine, however the WWTP effluents do not appear to be causing VTG induction to the level seen in female fish.

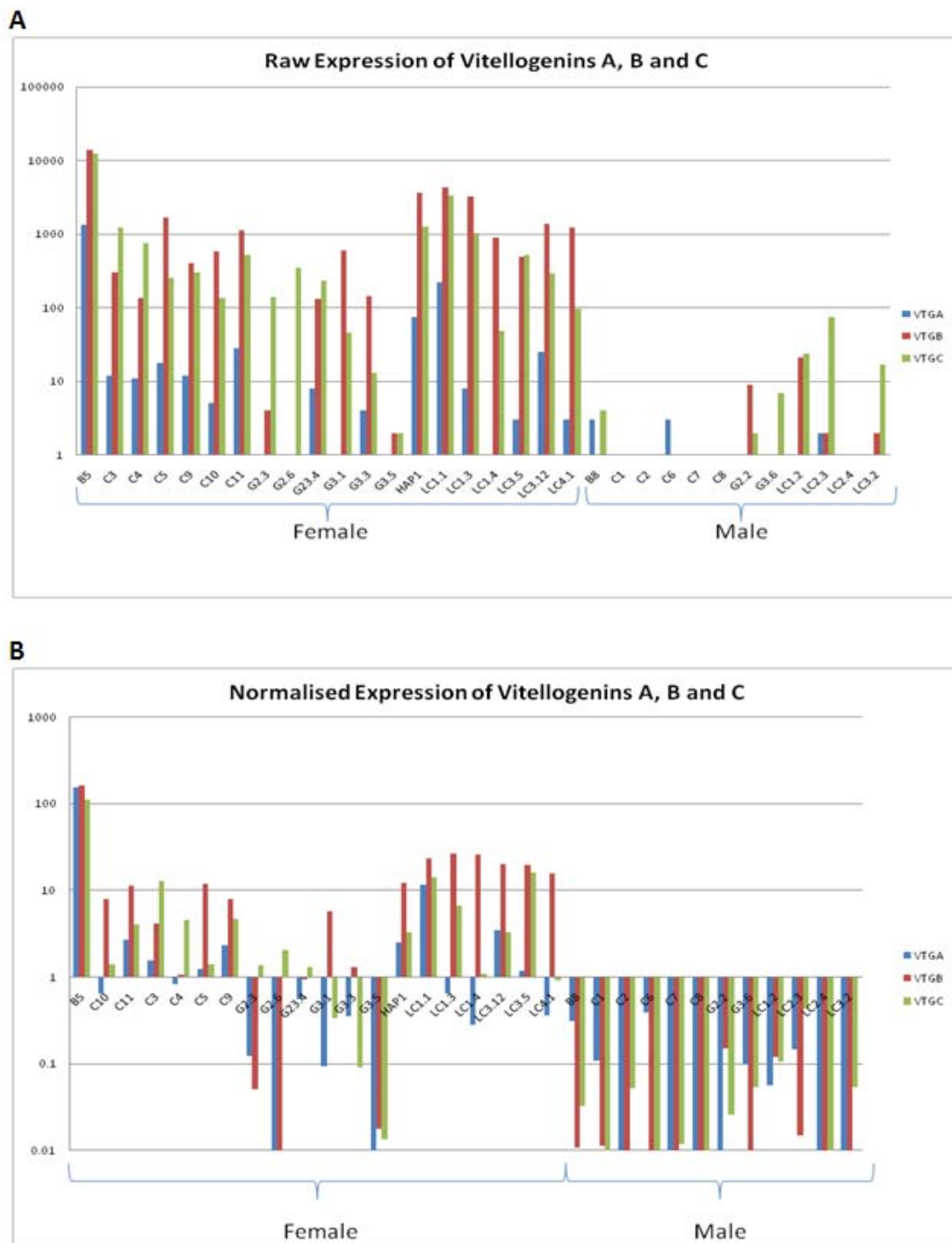


Figure 6-11 Expression of vitellogenins

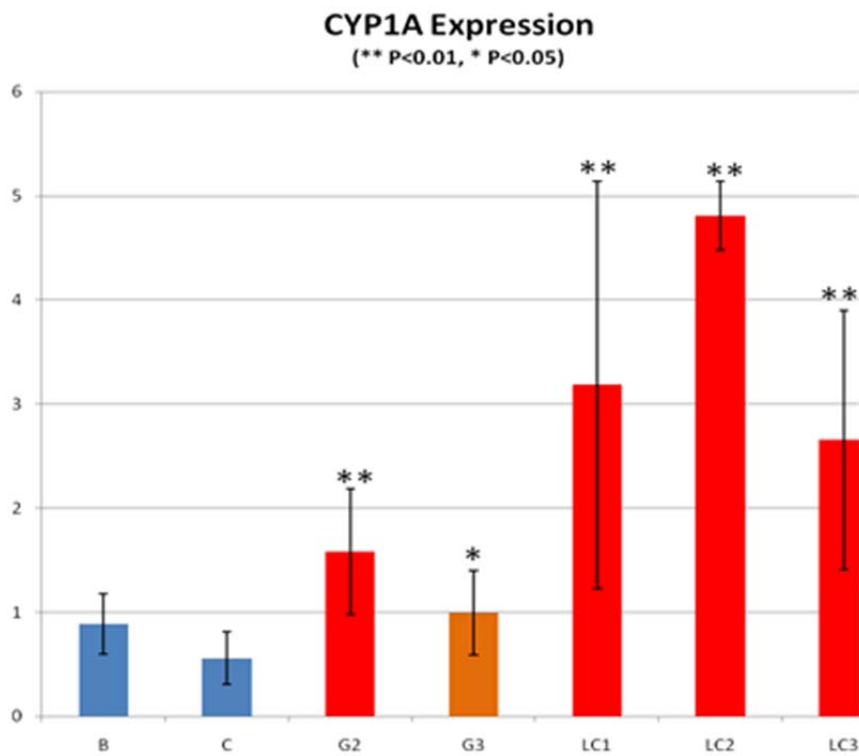


Figure 6-12 Expression of cytochrome P450 1A

Cytochrome P450 1A (CYP1A) expression was significantly increased in exposed fish versus blanks B&C (FDR<0.05). Figure 6-12 shows normalized CYP1A expression for all groups with replicates. CYP1A appeared to be more highly induced at Land van Cuijk than the Grou sites. Interestingly, CYP1A was significantly induced at P<0.01 at the G2 site, but not at the G3 site (after helophyte remediation) and was apparently reduced between the LC2 and LC3 sites. While it would be dangerous to draw firm conclusions from these groups that have low numbers of replicates, these preliminary data suggest that CYP1A inducers are reduced by helophyte remediation. Typical CYP1A inducers include polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated biphenyls.



Figure 6-13 Expression of DNA Repair Genes

Figure 6-13 above illustrates the expression of DNA-repair related genes. Control males and females do not show significant expression changes. Grou females, and both sexes at Land van Cuijk show significantly induced expression of DNA repair genes compared with same-sex controls ($P < 1E-05$). Grou males show significantly lower DNA repair gene expression than Grou females ($P < 0.01$), and this is not different from controls. There was no significant difference between Land van Cuijk males and females.

Table 6-6 Top Five Functional categories of genes enriched amongst differentially expressed genes by Effluent Exposure

Category	FDR value
Biological Functions	
tumorigenesis	4.50E-08
neoplasia	4.50E-08
cancer	4.50E-08
tumor	1.36E-06
splicing of RNA	1.42E-05

226 additional functions, categorized below

Additional Categories of Biological Functions

Cancer, RNA Post-Transcriptional Modification, Gene Expression, Hematological Disease, Gastrointestinal Disease, Cell Cycle, Infection Mechanism, Infectious Disease, Protein Degradation,

Protein Synthesis, Organismal Survival, Cellular Growth and Proliferation, Neurological Disease, Genetic Disorder, Skeletal and Muscular Disorders, Hepatic System Disease, Cell Death, DNA Replication, Recombination, and Repair, etc

Toxicology Functions

None significant

Toxicology Lists

Negative Acute Phase Response Proteins	0.0179
Positive Acute Phase Response Proteins	0.0181

Canonical Pathways

Acute Phase Response Signaling	1.96E-04
Protein Ubiquitination Pathway	0.00878

These results are indicative of the types of genes whose expression changes between control and effluent-exposed fish. As examples, two Ingenuity Canonical Pathways are shown below with genes annotated in red for induced in WWTP-exposed fish compared with controls, green for genes repressed. These show that there are differences in expression of genes associated with carcinogenesis and with the acute phase response. The changes in acute phase response suggest that the control fish were suffering from eg. acute infection, or that the effluent exposed fish had a suppressed acute phase response.

Whether the changes in molecular mechanisms of cancer are pro- or anti- carcinogenic is as yet unclear, and complicated by the age of the control samples. However, the induction of DNA-damage associated genes in effluent exposed fish does suggest that they are exposed to genotoxicants.

Location of sex-related genes

Using all samples, a T-test was carried out between male and female sticklebacks, with FDR<0.05. The majority of sex differences in gene expression were found in chromosome XIX. This has been identified as the stickleback sex chromosome. Our results therefore confirm those of Leder et al (2010).

Chromosomal location of genes differentially expressed between males and females in stickleback

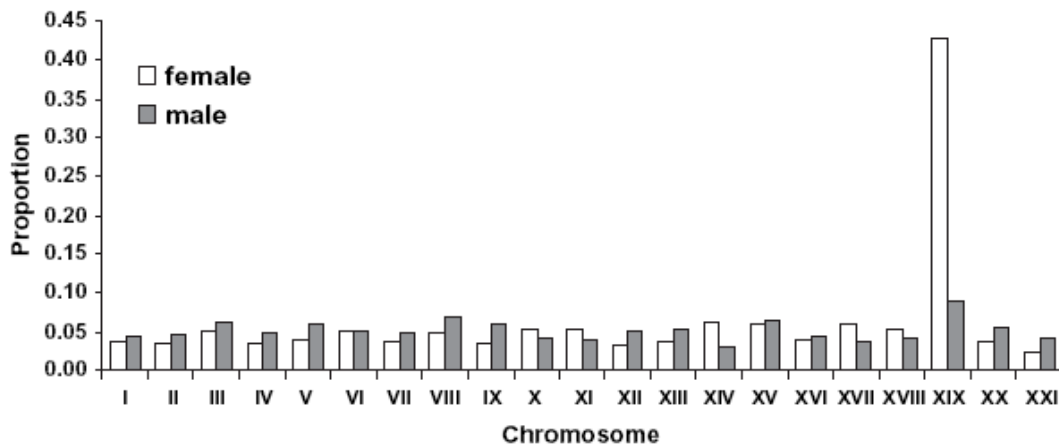
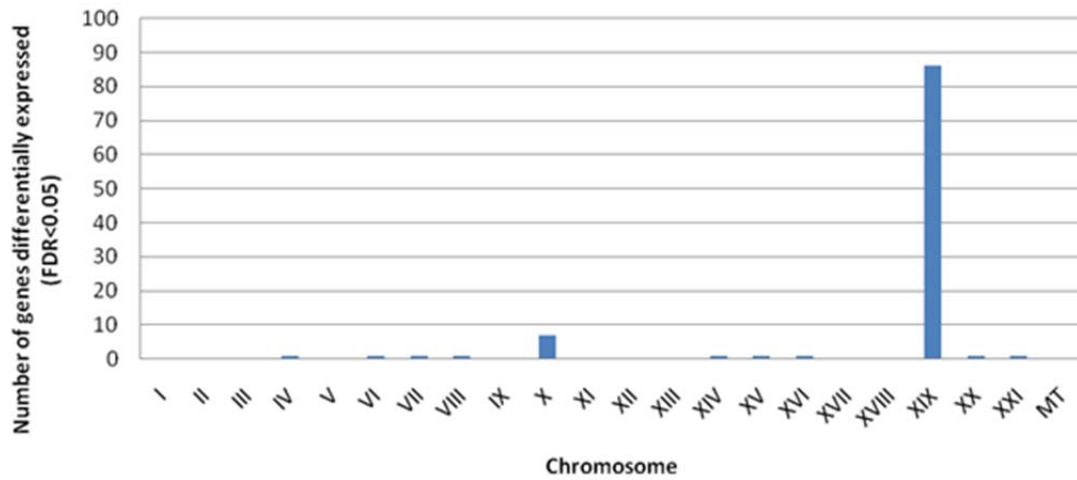


Figure 6-14 Sex-related genes

Proportion of threespine stickleback genes upregulated by sex for a given chromosome. (from Leder at al., 2010)

6.4.3 Main Project

Microarray analysis of the male and female fish was carried out in two batches, males first, then females. This allowed the data from the different sexes to be viewed as independent. Data capture was completed by 11th August 2011 and while the results of basic analyses are shown below, the quantity and complexity of the data requires that additional analyses be undertaken in future, especially with reference to data integration with other measured parameters from the wider project.

Analysis overviews main experiment

Due to mortality and skewed sex ratios in some of the mesocosms (discussed in WIPE Report 7), and a small number of failed RNA preparations and array hybridisations, the anticipated number of biological replicates (n=10) was not achieved for some sites. The female dataset was more comprehensive than the male dataset, as shown below.

Table 6-7 Main Project Samples

Male		Female	
Site	Pass QC	Site	Pass QC
B	9	B	7
C1	3	C1	6
C2	2	C2	7
C3	6	C3	3
C4	7	C4	12
G1	10	G1	10
G2	7	G2	9
G3	9	G3	11
G4	0	G4	0
H1	7	H1	8
H2	6	H2	12
H3	9	H3	10
H4	1	H4	11
Totals	76	Totals	106

Note: Abbreviations are B=Blank, C= Land van Cuijk, G=Grou, H= Hapert, 1-4 denote the positions water was abstracted from within the wetlands. Red = not enough fish for robust statistics.

After data normalisation and filtering the following number of transcripts were retained for analysis

Male: 10,193
 Female: 10,575
 Both Male and Female: 9881
 Male only: 312
 Female only: 894

1-way ANOVAs performed between all groups with all retained data (with FDR<0.05) gave:

Male: 5601 significantly changing transcripts
 Female: 8698 significantly changing transcripts

1-Way ANOVA showed fewer significant changes for the males (likely due to lower sample numbers) than the females. The Tukey Post-Hoc test also showed that the major changes were between all effluent exposed groups and the Blank group, but that there were significant changes in all group-to-group comparisons except for Male H4, where no replicates were available.

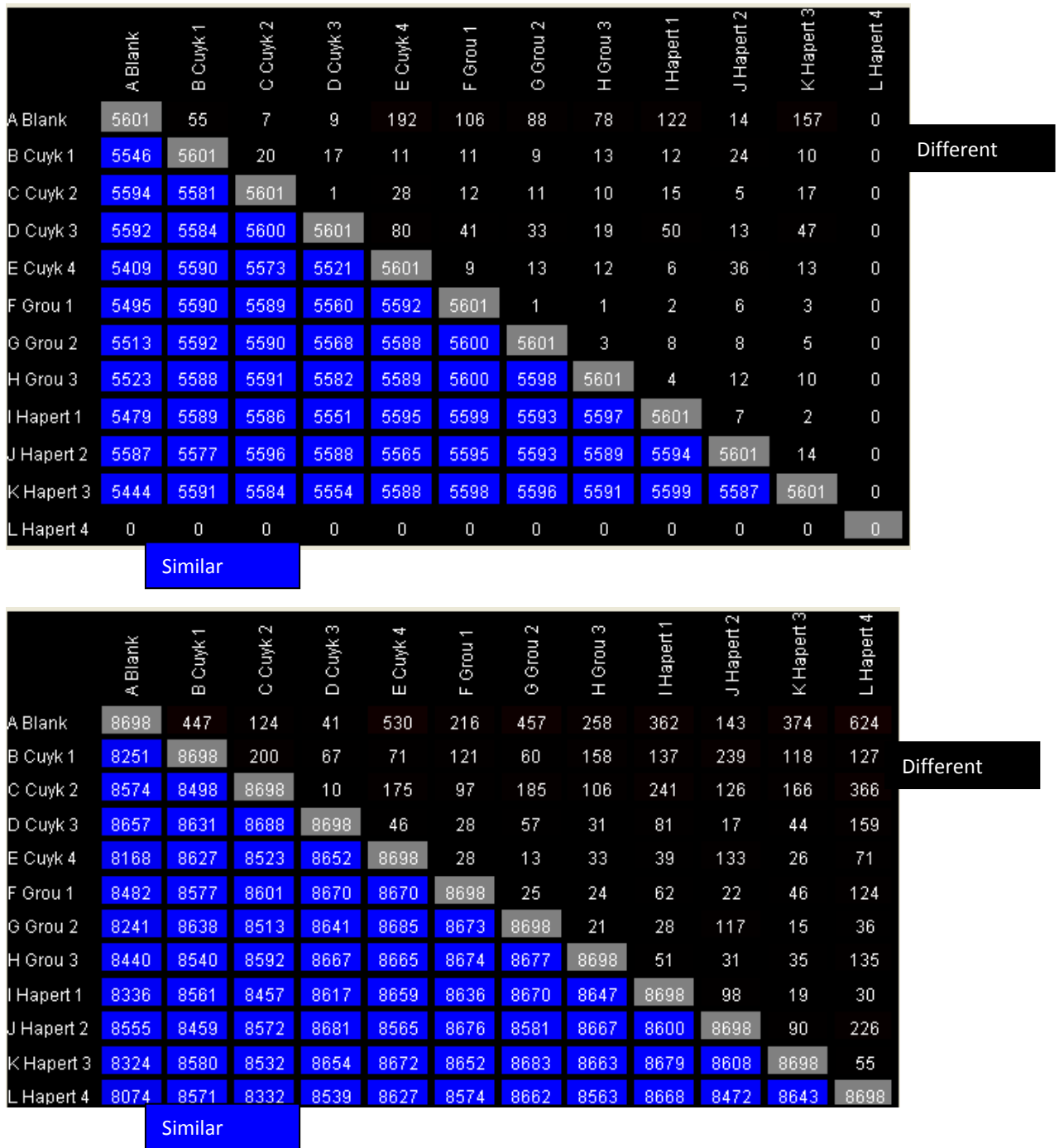


Figure 6-15 1-Way ANOVAs and Tukey post-hoc

The differentially-expressed transcripts found by ANOVA are shown in Supplementary File 1.

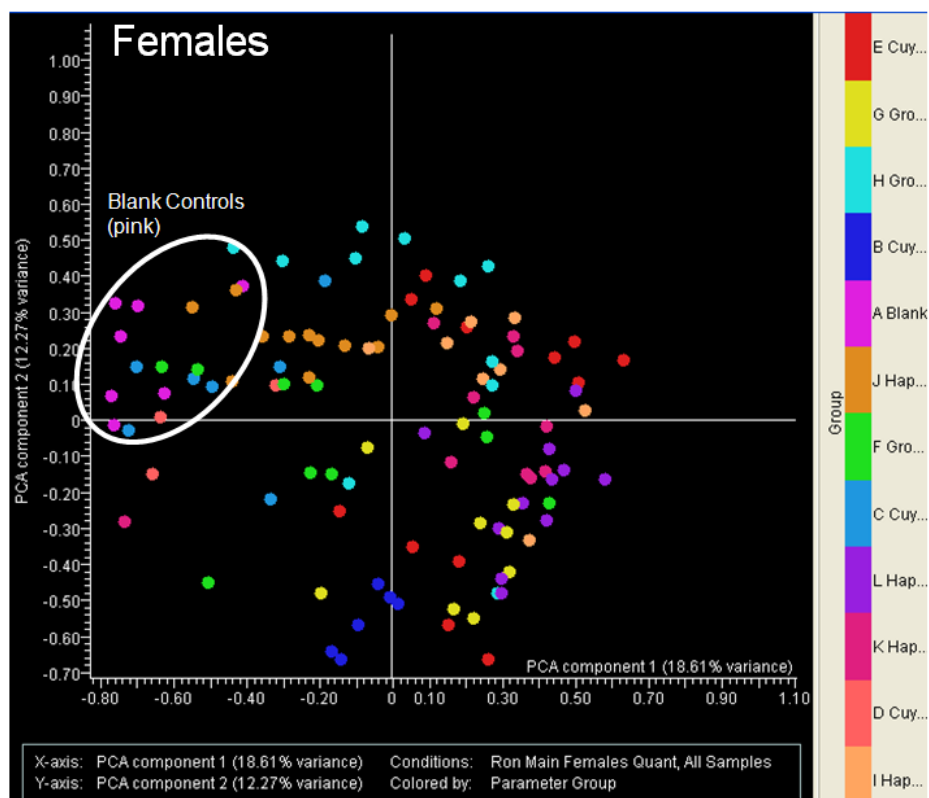
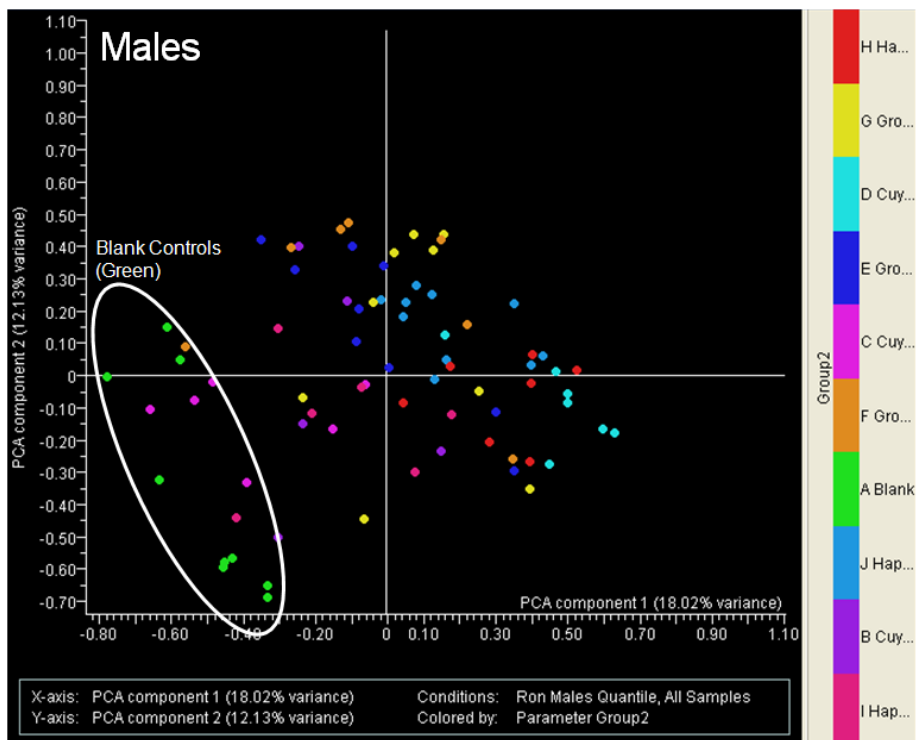


Figure 6-16A: Principal Components Analyses All Genes, All Samples

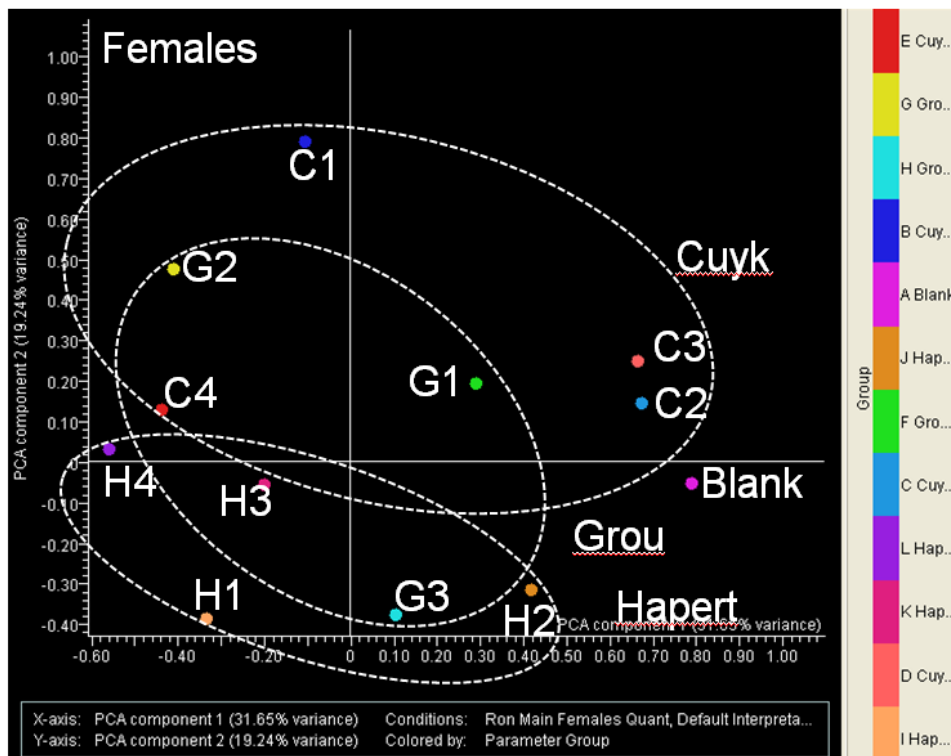
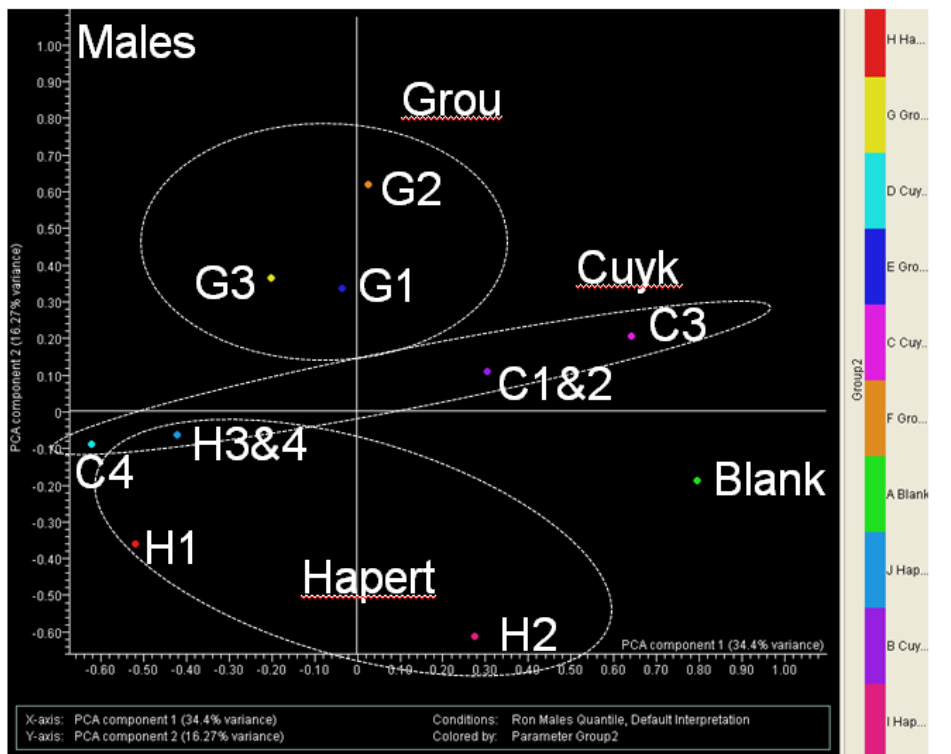


Figure 6-16B: Principal Components Analyses All Genes, Mean of Sample Groups

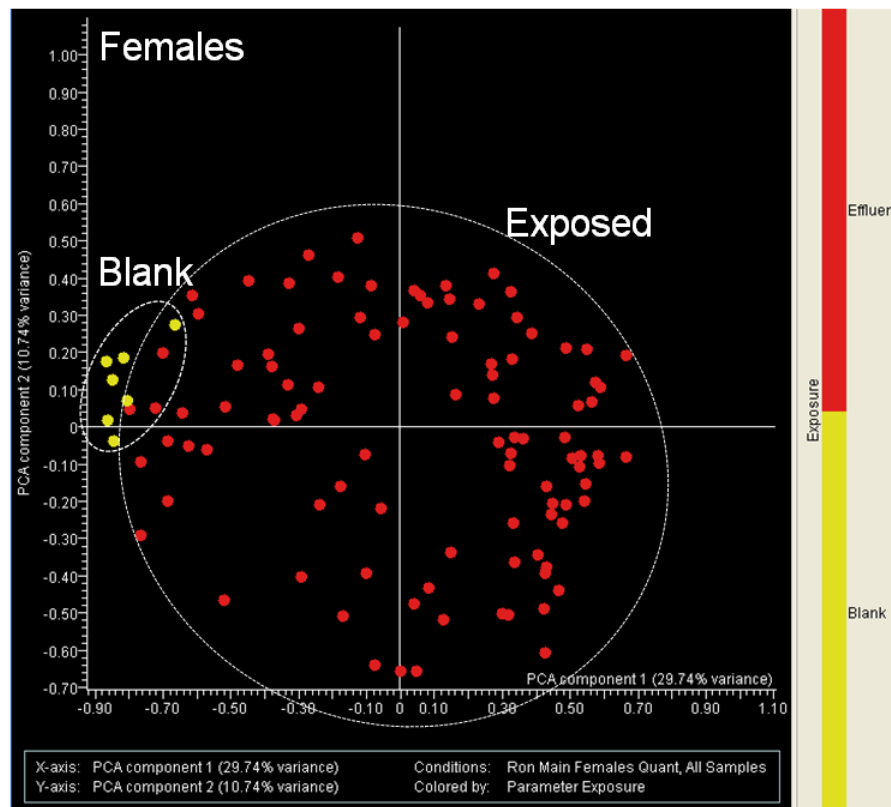
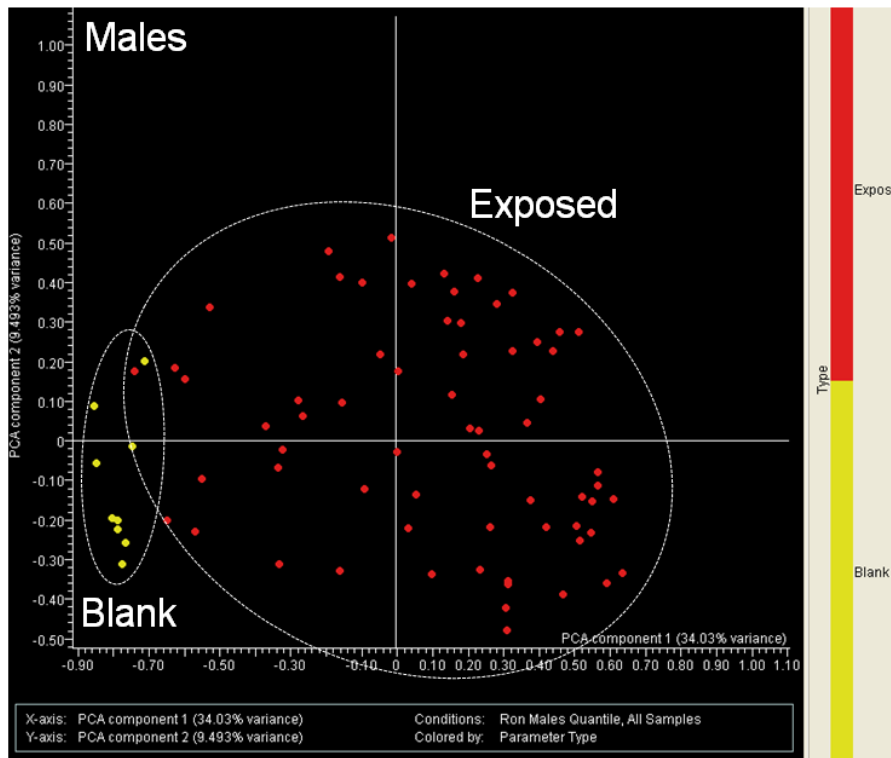


Figure 6-16C: Principal Components Analyses Exposure-related Genes

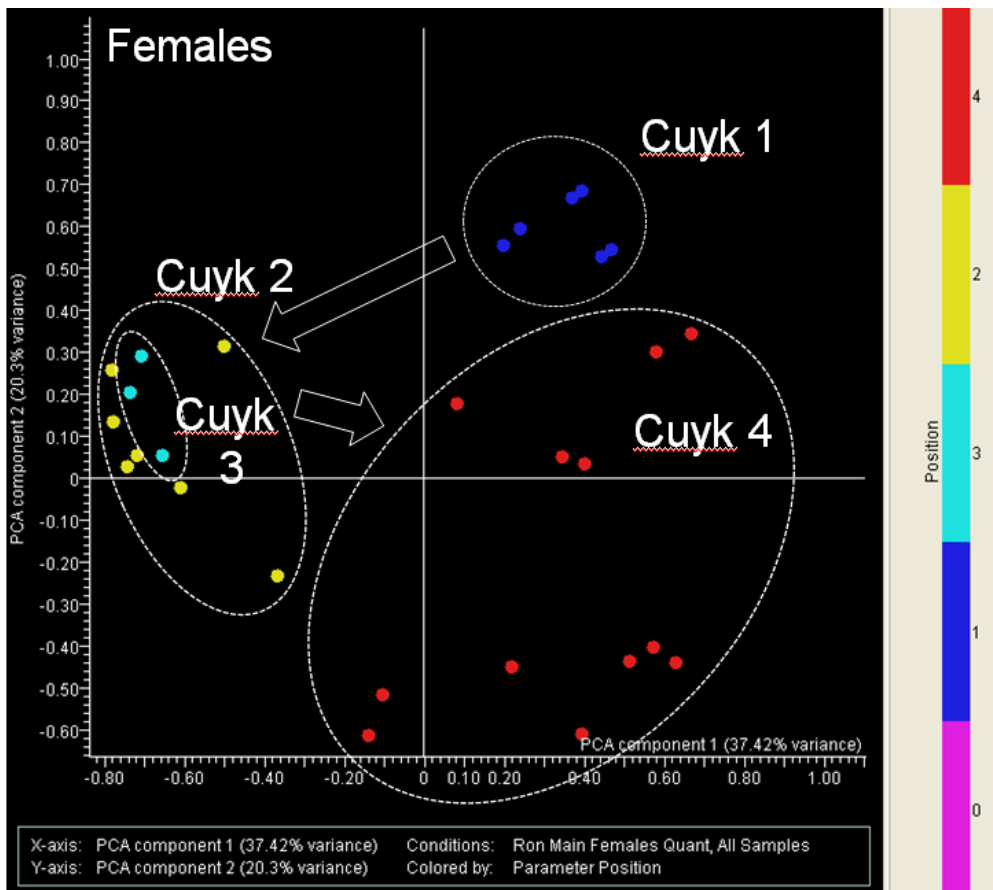
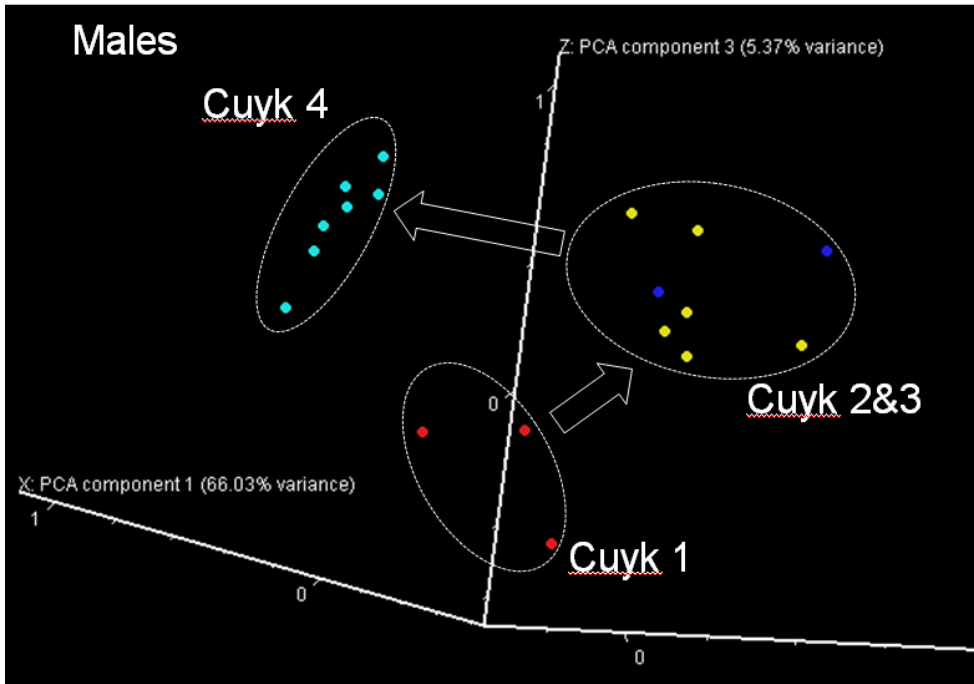


Figure 6-16D: Principal Components Analyses Land van Cuijk Position-related genes

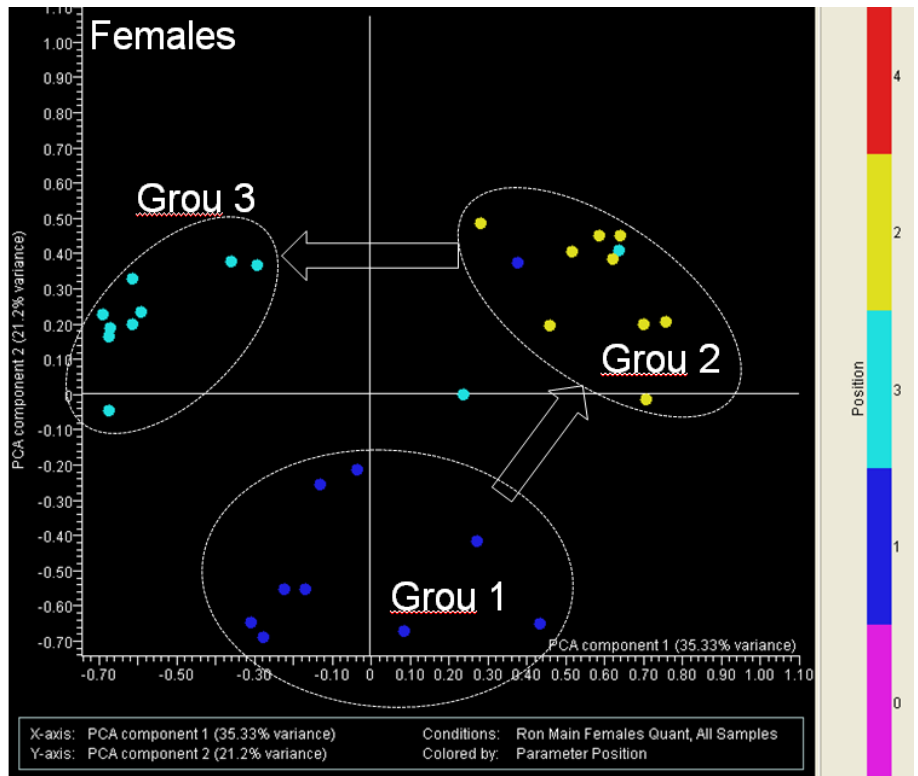
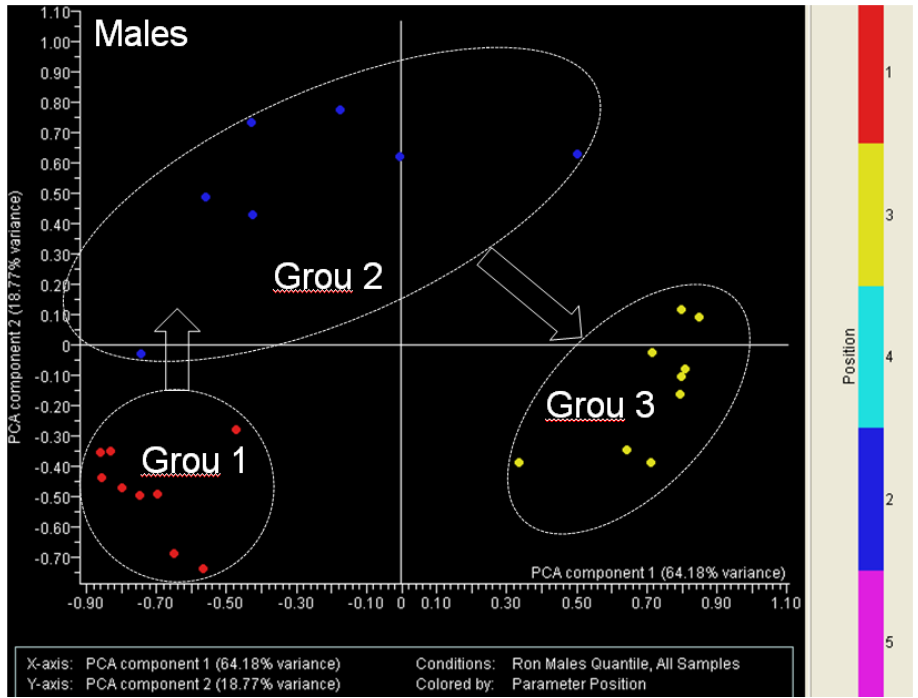


Figure 6-16E: Principal Components Analyses Grou Position-related genes

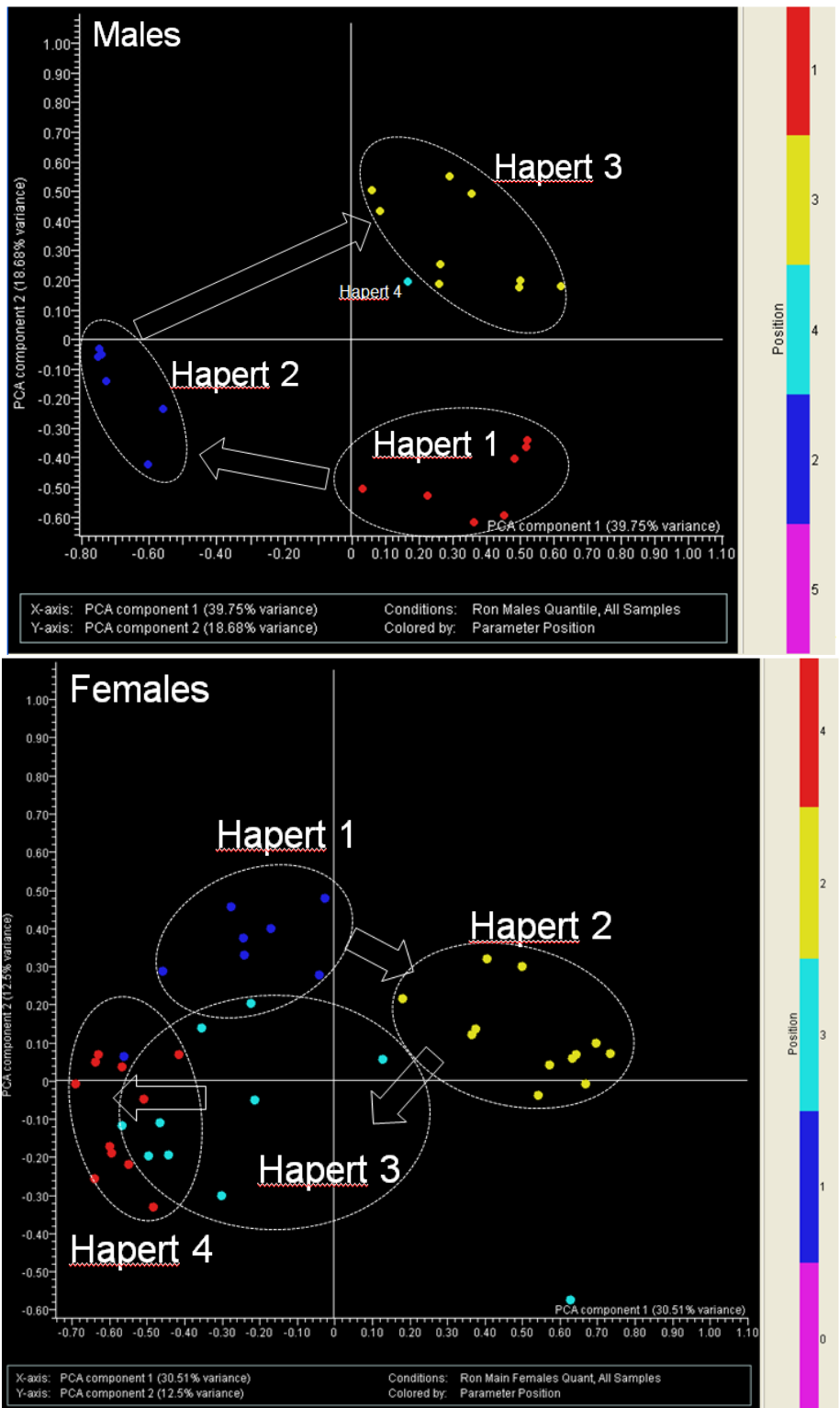


Figure 6-16F: Principal Components Analyses Hapert Position-related genes

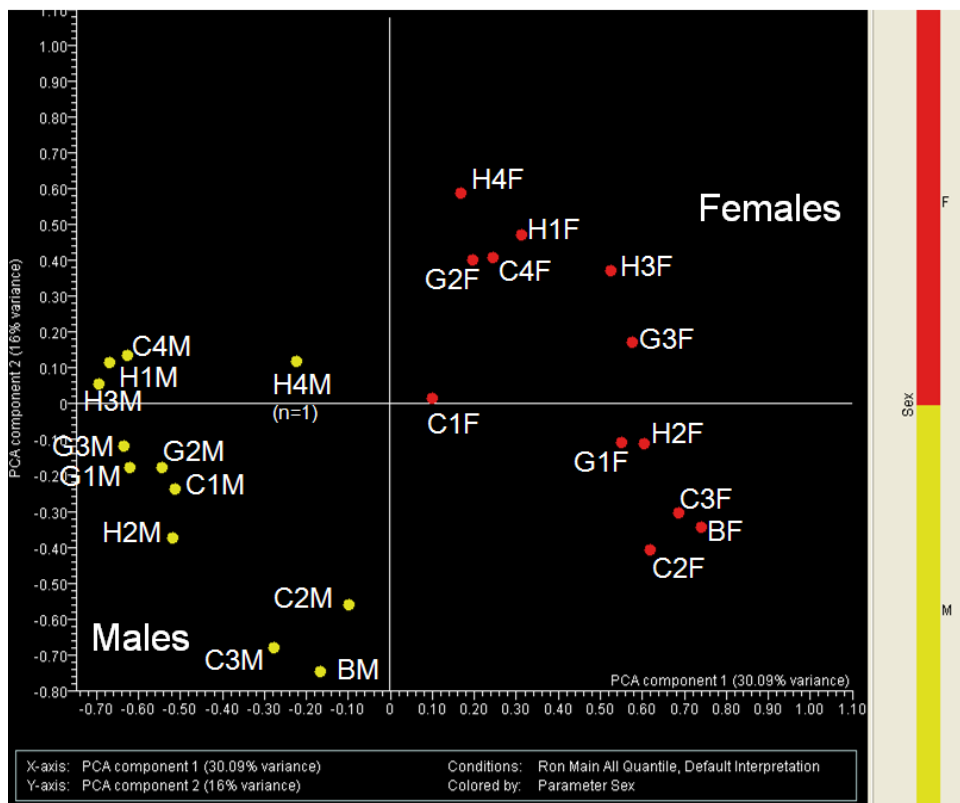


Figure 6-16G: Principal Components Analyses Sex-related genes

Summary of PCA Results

PCA using all samples and all genes gave complex scores plots. Blank samples were concentrated in particular areas of the graphs, as were samples from the different WWTPs.

Using exposure-related genes there were very clearly different distributions of data derived from the blank and exposed samples, both for males and females. These plots imply that the greatest differences in overall gene expression profiles are between the Blanks and the Exposed fish, as also found by ANOVA with post-hoc Tukey test.

To determine if gene expression profiles differed between sampling positions within WWTP sites, PCAs of position-related genes within each site were performed. At Cuijk, position 1 could be distinguished from (positions 2&3) and position 4, both in males and females. Positions 2 and 3 gave similar gene expression profiles. At Grou, all three sampling positions could be distinguished, although in females there were three outliers from Grou 1 and Grou 3 that were more similar to Grou 2. At Hapert, sites 1, 2 and 3 could be distinguished in males and females, but Hapert 4 overlapped with Hapert 3 in females, and only one sample was available for Hapert 4 males. Based on average gene expression profiles for each group, females were separated from males.

Individual Genes

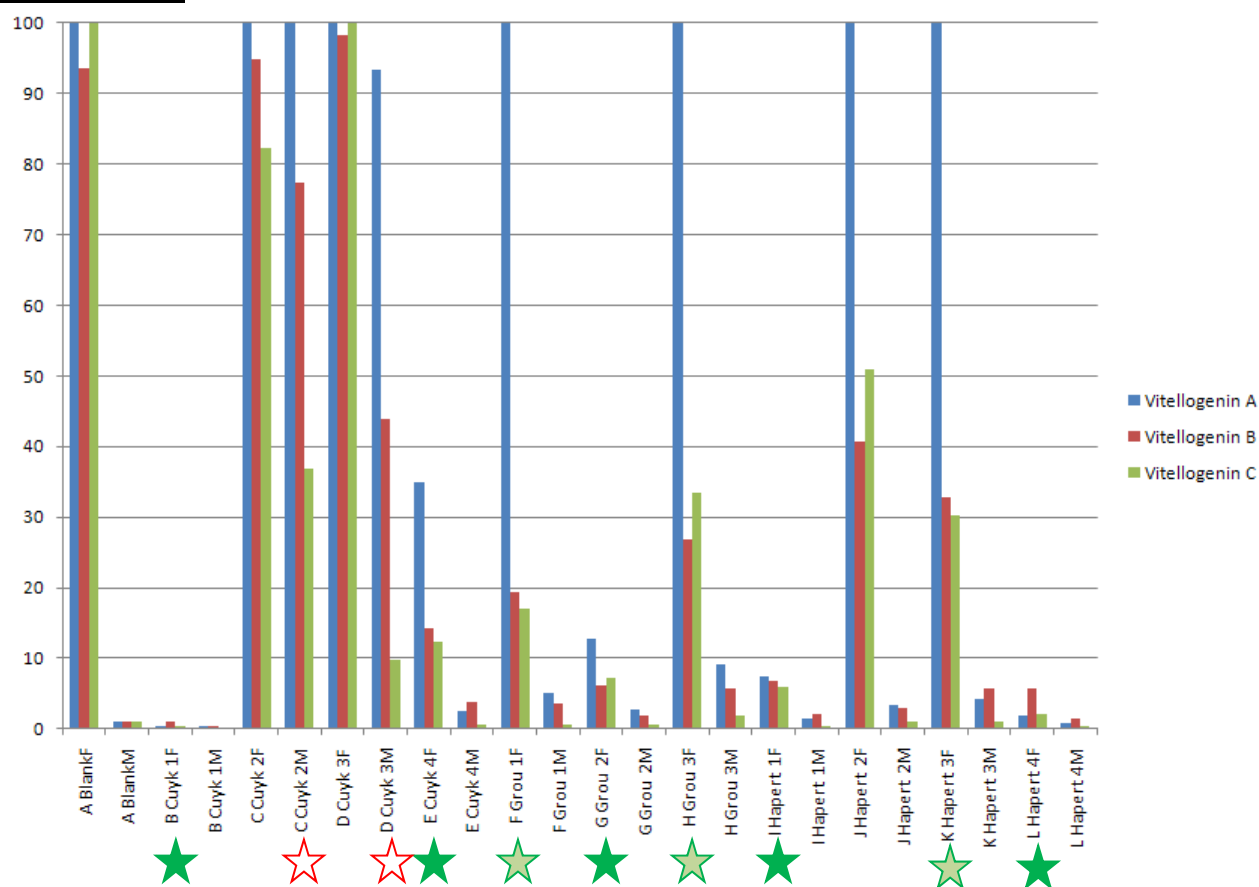


Figure 6-17 Vitellogenin Expression
Mean of each group is shown (normalised to mean of male Blank fish). Significant (FDR<0.05) repression versus female Blanks is shown with a green star where all three VTGs are significant, with a light green star where 1 or 2 VTGs are significant. Males showing at least 10-fold induction over Blanks are shown with red-bordered star (not significant due to high variability). Maximum expression of VTG A exceeded 2000-fold in Cuijk 2 and Cuijk 3 groups.

Expression of the three stickleback vitellogenin genes reveals endocrine disruption, both estrogenic (induction in males) and anti-estrogenic (repression in females). In Blank control fish, expression of VTGs is very high in females, very low in males, this is typical for sexually mature fish. Apparent induction of vitellogenesis occurs in males from Land van Cuijk sites 2 and 3, but not site 1, however there is high inter-individual variation, so this is not strictly statistically significant. Significant repression of vitellogenins occurs in females from Land van Cuijk 1 and 4, Grou 1, 2 and 3 and Hapert 1, 3 and 4.

**CYP1A gene expression, normalised to mean of blanks
shown as +/- SD, coloured red for P<0.05 versus same-sex
controls**

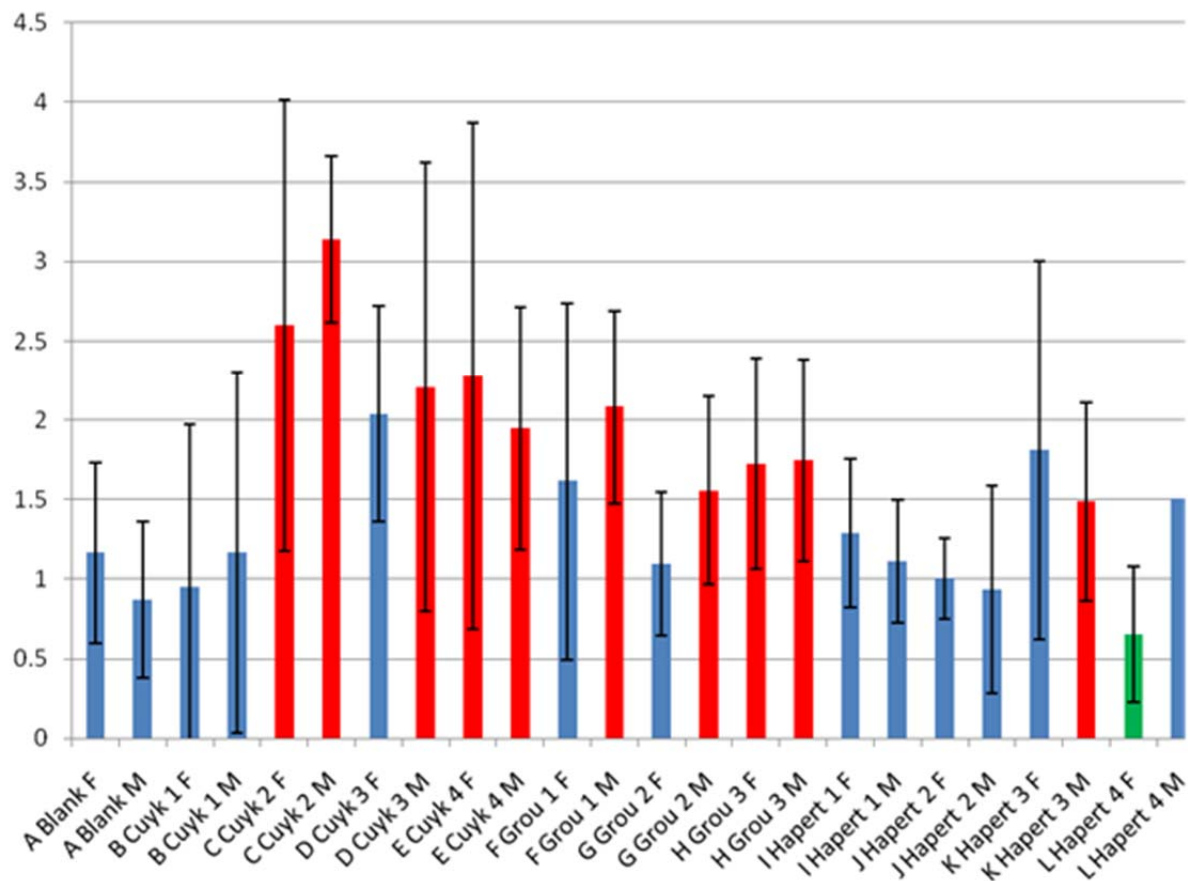


Figure 6-18 CYP1A Gene Expression

There were indications of CYP1A inducers at Cuijk and Grou but less evidence at Hapert. Males generally responded more than females, as has been found in previous studies. Interestingly at the Cuijk 1 site there was no evidence of CYP1A induction, implying different bioavailability, requirement for physical or biological activation, or antagonistic effects with other effluent components. There was no evidence of reduction in CYP1A response following bioremediation.

All F1 stickleback - Expression of DNA repair genes (normalised to overall mean)

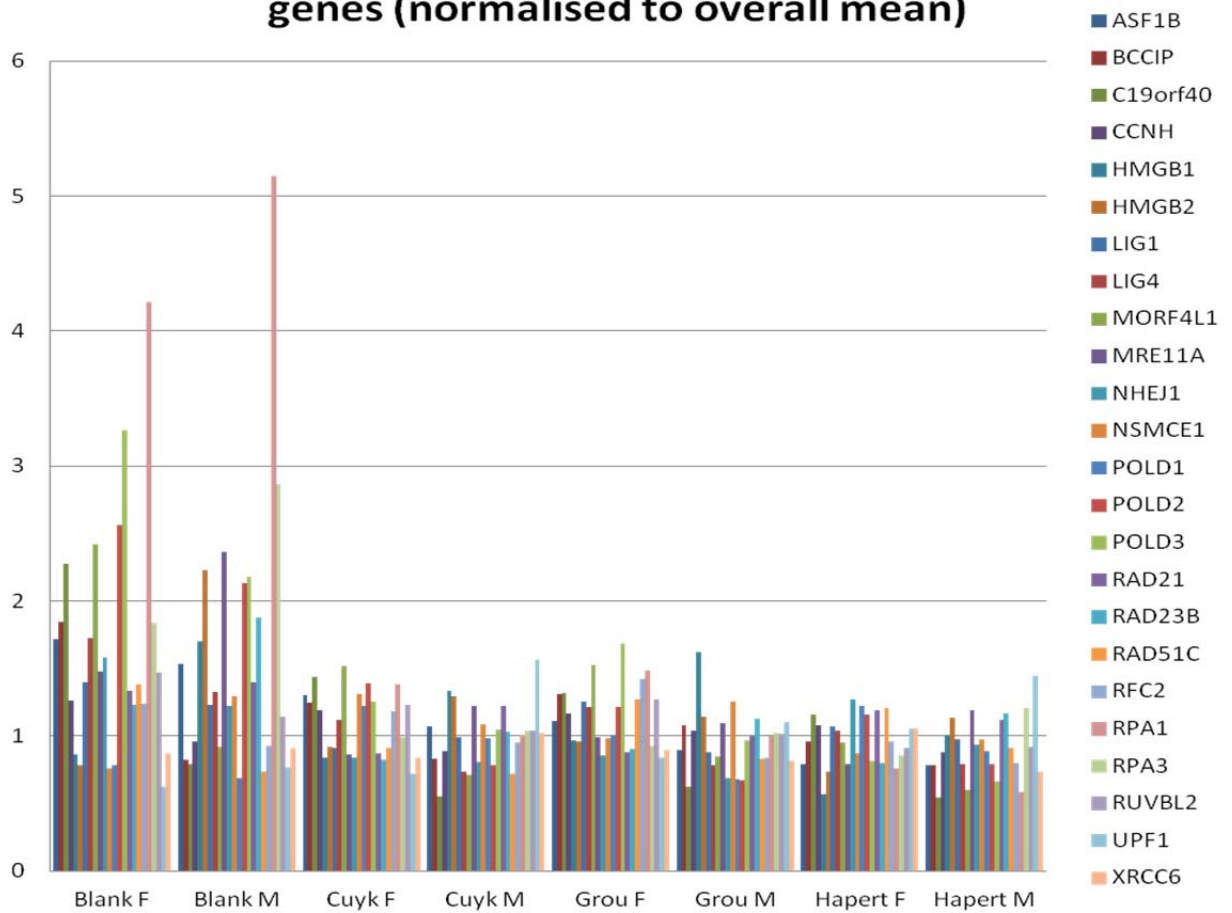


Figure 6-19 Expression of DNA Repair Genes

Figure 6-19 above illustrates the expression of DNA-repair related genes. As opposed to the pilot experiment this group of genes was not induced, but generally repressed in all WWTP effluent exposed fish. No major differences were observed between the different sites and between male and female sticklebacks. This might be partly due to the strong repression of genes that are involved with mitosis in the WWTP effluent-exposed fish. Other differences between the pilot and the main experiment were that F0 fish were transferred from a clean environment to the wetlands mesocosms and exposed for several months, while F1 fish were born in the mesocosms and exposed for one year.

Table 6-8 Genes very highly expressed versus blank controls (See Supplementary 1)

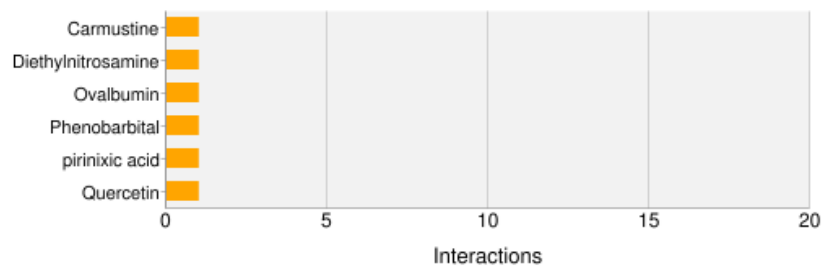
Common	Gene Symbol
Mucin 2 protein	MUC2
Insulin-like growth factor-binding protein 1	IGFBP1
Vitellogenin A	VTG1
Myosin light chain 4	MYL4
Insulin Precursor	INS
Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic	PCK1
Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform	MYL7
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	CEACAM5
Transmembrane protein 195	TMEM195
Toll-like receptor 5 Precursor (Toll/interleukin-1 receptor-like protein 3)	TLR5
Dual specificity protein phosphatase 26	DUSP26
Cytochrome P450 2C9 ((R)-limonene 6-monooxygenase)	CYP2S1
Collagen alpha-1(VIII) chain	COL8A1
Fibroblast growth factor 19 Precursor	FGF19
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1
Orosomucoid 2	ORM
Somatostatin Precursor (Growth hormone release-inhibiting factor)	SST
pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2	PYROXD2
Acidic mammalian chitinase Precursor	CHIA
Pepsin A Precursor (EC 3.4.23.1)	PGA5
Proto-oncogene protein c-fos	FOS

The above are shown as examples of some of the most highly induced genes in the study. They include oncogenes, digestive enzyme genes, growth factors, xenobiotic metabolizing and signalling pathway genes.

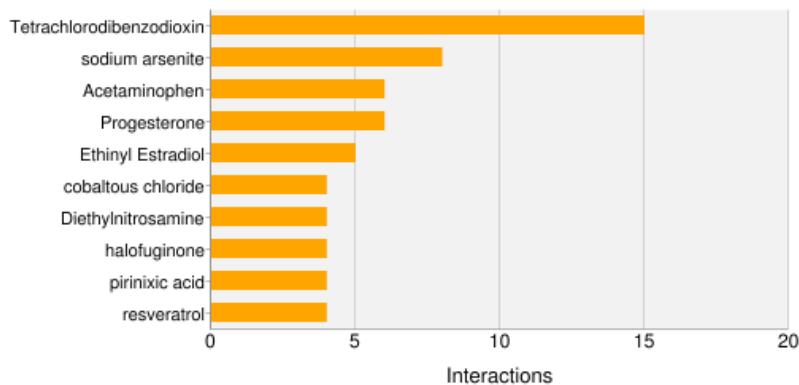
Although these genes have diverse functions, many have previously been found to interact with specific chemicals in vertebrates. Some examples are shown overleaf.

While examining individual genes is informative for biological interpretation, especially for known biomarkers like VTG and CYP1A, the large numbers of differentially expressed genes require further analysis to determine if groups of genes sharing functions, or previously found to be similarly regulated by particular chemicals, are responding in the experiment.

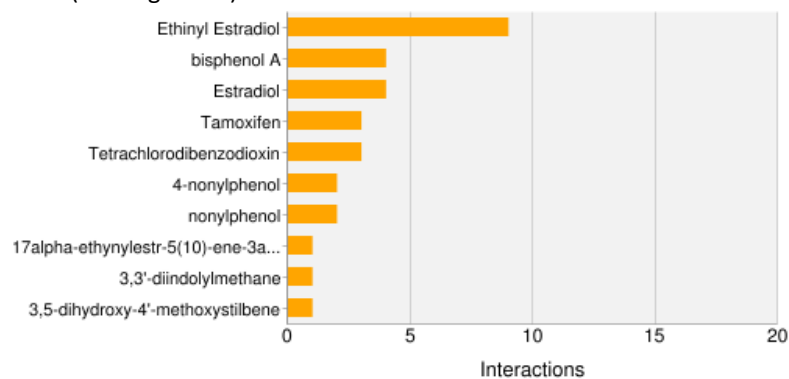
MUC 2 (Mucin 2)



IGFBP1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1)



VTG1 (Vitellogenin A)



FOS (Oncogene c-Fos)

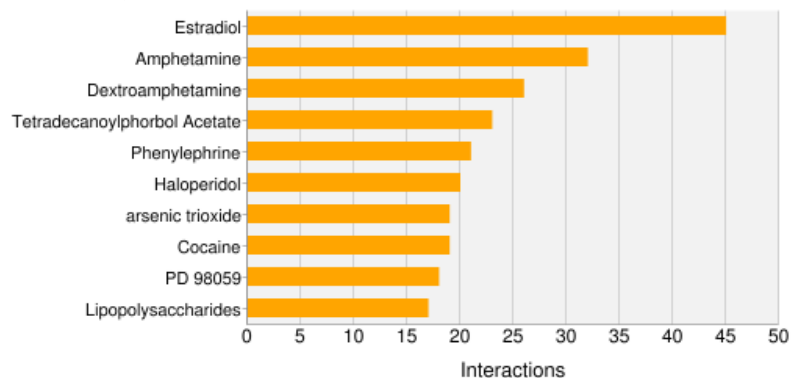


Figure 6-20 Examples of gene-chemical interactions (CTD)

Morphology and Gene Expression

However from morphological measurements (shown in WIPE Report 7) there are differences in liver and fish weights between sites and sexes.

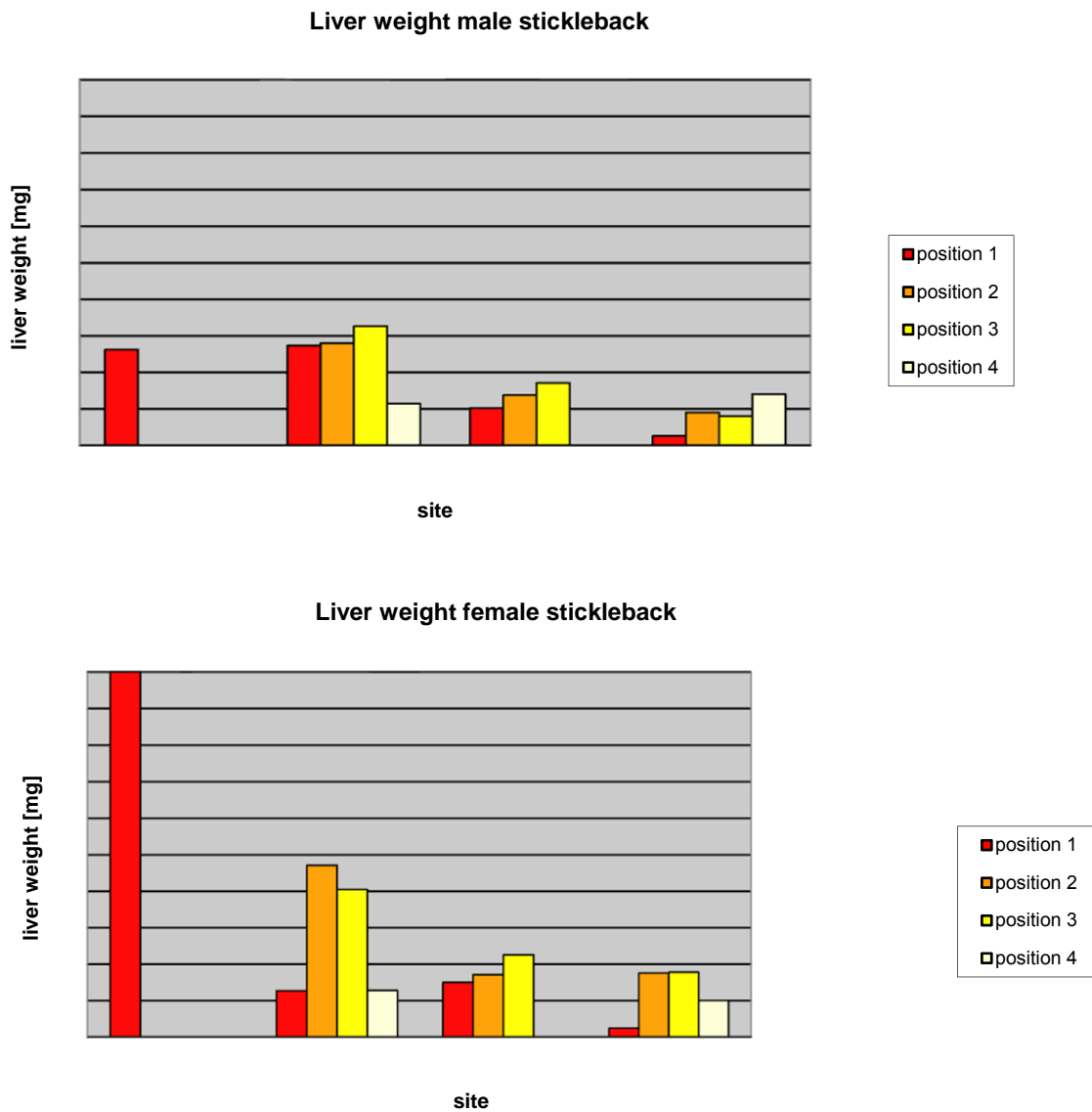


Figure 6-21 Male and female stickleback liver weights

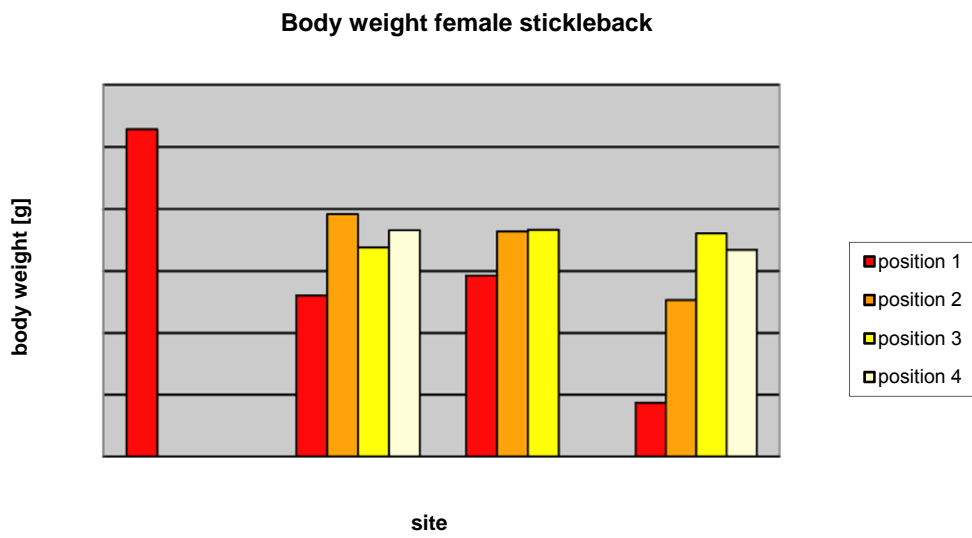


Figure 6-22 Male and female stickleback body weights

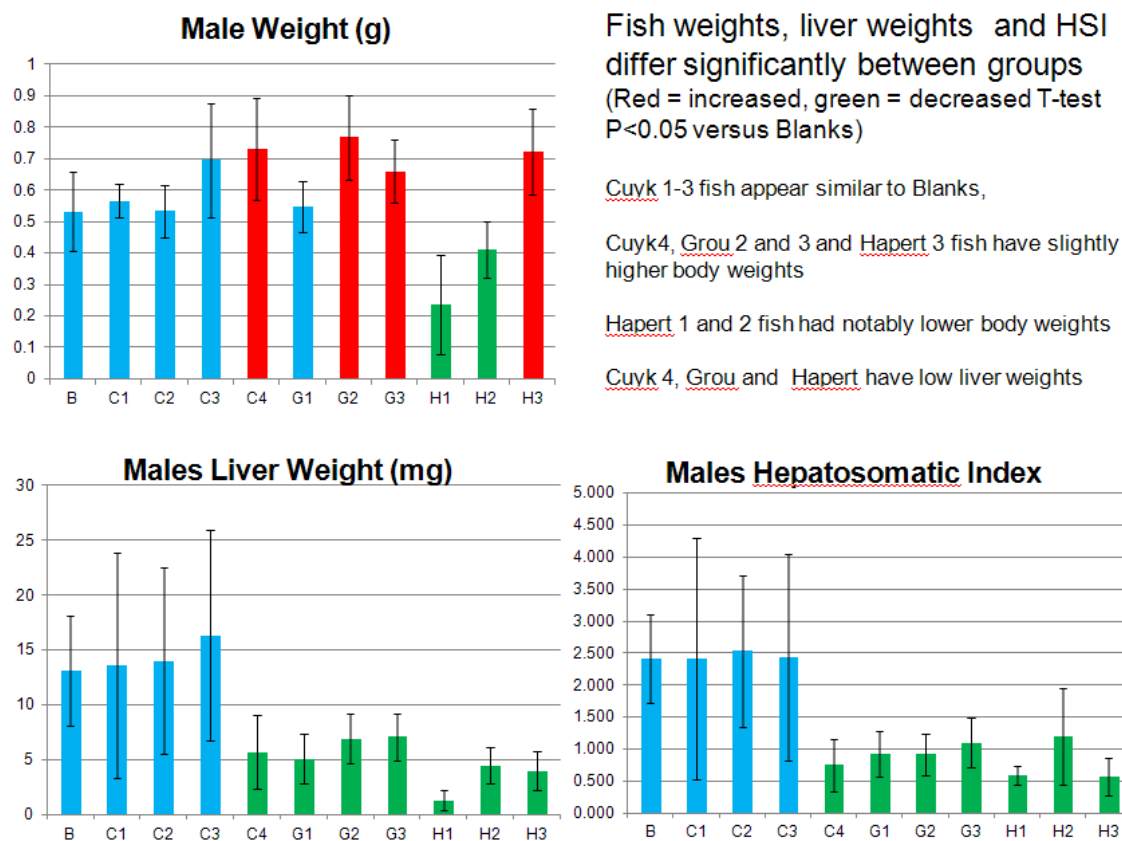


Figure 6-23 Statistical analyses of Male fish body and liver weights

As Figure 6-21 to Figure 6-23 show, the morphological characteristics included differences in fish weights and liver weights. These may be related to toxic effects of the effluent exposures or to differences in nutrition between the 'blank' and exposed groups, likely both. These differences will be reflected in gene expression data.

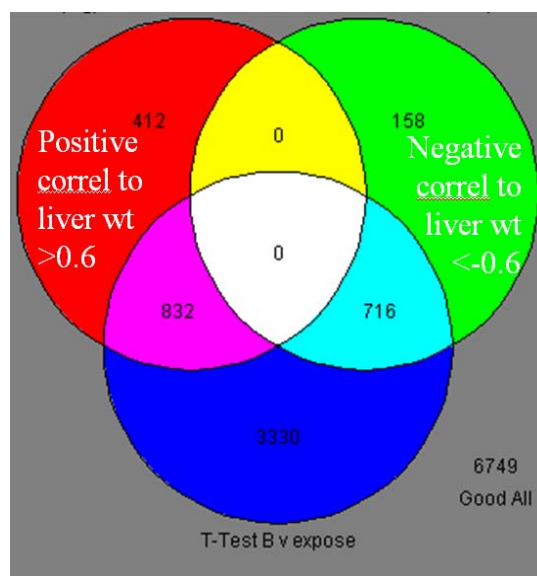


Figure 6-24 Genes correlated to liver weight and genes responsive to effluent exposure

Less than 100 transcripts correlated with fish length or hepatosomatic index. More than 1000 correlated (positively, but not strongly) with liver weight. While the majority of these were significantly differentially expressed between blank and exposed fish, they formed ~1/3 of these transcripts.

Table 6-9 Significant Parameters in Main Experiment

Parameter	Type	Association Strength	No. genes	Min P-value
Group	Parameter	134,949	10224	6.08e-31
Sex	Parameter	96,593	7110	9.79e-54
Site	Parameter	94,492	8379	3.16e-34
Position	Parameter	85,702	7227	1.45e-35
Liver wt (mg)	Parameter	78,242	7318	9.56e-33
Exposed	Parameter	58,053	5809	1.37e-48
length (mm)	Parameter	55,068	5481	3.86e-40
weight (g)	Parameter	50,891	6248	1.81e-17
HSI	Parameter	17,592	1506	5.61e-8

Using the 'find significant parameters' function of Genespring (by non-FDR corrected ANOVA), Group (combination of site and position) is the most significant variable, followed by Sex, WWTP Site, Position within each site, Liver weight, Exposed versus blank, Length, Weight and HSI (hepatosomatic index).

Gene Ontology Term enrichment

Genes are annotated with a variety of information, and one of the most commonly-used schemes for this is called 'Gene Ontology'. Gene Ontology (GO) groups genes on the basis of the biological processes, cellular location and molecular functions of the proteins they produce. Enrichment analyses compare the frequency of genes annotated with a particular term (e.g. mitochondrial) in a list of genes of interest (e.g. those significantly induced at a certain sampling site) with the frequency of genes annotated with that term in the whole list of genes that were detected in the experiment. Statistical tests such as Fisher's Exact Test can be used to determine the significance of any enrichment. Functional annotation enrichment was carried out by finding genes that were significant by ANOVA in either the male or female experiment and at least 2-fold induced or repressed versus the relevant 'Blank' control group. The DAVID website (Dennis et al., 2003) was used for functional enrichment. This is based on annotation of model organisms, and is best for humans. Therefore the human orthologs of the stickleback genes were the data input for this analysis. This approach is likely to be useful for basic metabolic and signalling pathways that are well-conserved between mammals and fish but less so for fish-specific responses, e.g. vitellogenin.

Table 6-10 GO term enrichment

GO terms enriched in genes 2-fold regulated and significantly differentially expressed (FDR<0.05) between each WWTP and Blank controls. Only selected GO terms with FDR<0.05 are shown.

GO Terms (upregulated genes)	M CvB	F CvB	M GvB	F GvB	M HvB	F HvB
GO:0032868~response to insulin stimulus	1	1	1	1	1	1
GO:0005852~eukaryotic translation initiation	1				1	
GO:0000323~lytic vacuole	1	1		1		1
GO:0006954~inflammatory response		1	1	1		1
GO:0045087~innate immune response		1	1	1	1	1
GO:0006917~induction of apoptosis		1		1	1	
GO:0045453~bone resorption		1		1		
GO:0048545~response to steroid hormone		1	1	1	1	1
GO:0006508~proteolysis		1		1		
GO:0006006~glucose metabolic process			1	1		1
GO:0007596~blood coagulation				1		1
GO:0055114~oxidation reduction						1

GO Terms (downregulated genes)	M CvB	F CvB	M GvB	F GvB	M HvB	F HvB
GO:0000278~mitotic cell cycle	1	1	1	1	1	1
GO:0055114~oxidation reduction	1	1	1		1	
GO:0006695~cholesterol biosynthetic process	1	1	1	1	1	1
GO:0000502~proteasome complex	1	1	1	1	1	1
GO:0005694~chromosome	1		1	1	1	1
GO:0006281~DNA repair	1		1		1	1
GO:0006260~DNA replication	1	1	1	1	1	1
GO:0005739~mitochondrion	1	1	1	1	1	1
GO:0005783~endoplasmic reticulum	1	1		1	1	1
GO:0015031~protein transport		1		1	1	1

Abbreviations: M = male; F = female; CvB = Land van Cuijk vs. blank; GvB = Grou vs. blank; HvB = Hapert vs. blank

Ingenuity Analyses

Ingenuity Pathway Analysis (IPA, or Ingenuity) is a proprietary software package that aids analysis of gene-lists derived from microarray experiments. Functional annotation enrichment was also carried out by Ingenuity using genes that were significant by ANOVA in either the male or female experiment and at least 2-fold induced or repressed versus the relevant 'Blank' control group. The Ingenuity Pathway Analysis suite was used for functional enrichment. This is based on annotation of model organisms, and is best for humans. Therefore the human orthologs of the stickleback genes were the data input for this analysis. This approach is likely to be useful for basic metabolic and signalling pathways that are well-conserved between mammals and fish but less so for fish-specific responses, e.g. vitellogenin.

Ingenuity finds enrichment of genes organised in a number of ways, by inferred networks, biological functions, canonical pathways (pre-defined pathways e.g. citric acid cycle, derived from KEGG and similar databases), and lists related to toxicology. Shown below, as an example, is a summary of the results for genes induced 2-fold in Cuijk females compared with Blank females. The functions and canonical pathways highlighted by these analyses are found to be associated with the induced genes at this site more frequently than would be expected by chance, as shown by the P-values.

Table 6-11 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) summary of genes induced in Cuijk females

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	View Dermatological Diseases and Conditions, Genetic Disorder, Gene Expression	40
2	View Protein Degradation, Protein Synthesis, Post-Translational Modification	38
3	View Cancer, Genetic Disorder, Hematological Disease	35
4	View Cellular Development, Connective Tissue Development and Function, Embryonic Development	34
5	View Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Reproductive System Development and Function, Cancer	30

Top Bio Functions		
Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Inflammatory Response	1.15E-25 - 1.82E-04	191
Inflammatory Disease	3.15E-18 - 1.47E-04	268
Immunological Disease	3.55E-15 - 1.82E-04	227
Infectious Disease	1.16E-12 - 1.85E-04	160
Cancer	4.97E-12 - 1.58E-04	303
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Growth and Proliferation	1.12E-16 - 1.70E-04	272
Cellular Movement	3.06E-15 - 1.74E-04	177
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	2.88E-14 - 1.78E-04	177
Cell Death	1.35E-11 - 1.43E-04	260
Cellular Function and Maintenance	2.82E-09 - 1.59E-04	115
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Hematological System Development and Function	6.17E-15 - 1.78E-04	186
Immune Cell Trafficking	6.17E-15 - 1.74E-04	138
Organismal Survival	4.00E-14 - 4.14E-11	132
Tissue Morphology	3.14E-10 - 1.61E-04	122
Tissue Development	1.65E-09 - 1.06E-04	114

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Complement System	2.45E-10	14/35 (0.4)
Acute Phase Response Signaling	9.79E-08	27/178 (0.152)
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	1.18E-05	22/187 (0.118)
Hepatic Cholestasis	6.91E-05	19/173 (0.11)
PXR/RXR Activation	6.16E-04	11/88 (0.125)

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
DUSP26	↑34.039	
AGMO	↑31.417	
CEACAM1 (includes others)	↑31.195	
GOT1	↑26.525	
FGF19	↑26.446	
CYP251	↑25.521	
MPG	↑25.354	
C4B (includes others)	↑24.616	
PCK1	↑23.969	
STAT1*	↑22.428	
Fold Change down-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart

Top My Lists		
Name	p-value	Ratio
Top My Pathways		
Top Tox Lists		
Name	p-value	Ratio
Liver Necrosis/Cell Death	8.62E-08	27/166 (0.163)
Liver Proliferation	9.97E-07	22/133 (0.165)
Positive Acute Phase Response Proteins	1.23E-05	9/30 (0.3)
Decreases Transmembrane Potential of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	3.04E-05	16/97 (0.165)
Hepatic Cholestasis	1.24E-04	19/143 (0.133)
Top Tox Functions		
Assays: Clinical Chemistry and Hematology		
Name	p-value	# Molecules
Increased Levels of LDH	8.86E-03 - 8.86E-03	3
Increased Levels of ALT	2.35E-02 - 2.35E-02	2
Increased Levels of Albumin	5.11E-02 - 9.96E-02	2
Increased Levels of CRP	9.96E-02 - 9.96E-02	1
Increased Levels of Creatinine	2.31E-01 - 2.31E-01	1
Cardiotoxicity		
Hepatotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Liver Damage	1.35E-06 - 4.08E-01	22
Liver Necrosis/Cell Death	2.22E-06 - 4.95E-01	27
Liver Proliferation	5.88E-06 - 1.46E-01	22
Liver Cholestasis	4.02E-04 - 9.96E-02	14
Liver Cirrhosis	9.60E-04 - 5.11E-02	17

Below is shown a summary of the 'Canonical Pathways' section for each sex at each WWTP site.

Canonical Pathways enriched in genes 2-fold regulated and significantly differentially expressed (FDR<0.05) between each WWTP and Blank controls. Only selected canonical pathways with FDR<0.05 are shown. Determined by Ingenuity Pathway Analysis.

Table 6-12 IPA Canonical Pathways Summary

Canonical Pathways (upregulated genes)	M CvB	F CvB	M GvB	F GvB	M HvB	F HvB
mTOR signaling	1		1		1	1
IL9 signaling	1		1	1		1
JAK signaling	1	1	1	1		
Complement system		1	1	1	1	1
Acute phase response		1	1	1	1	1
Hepatic cholestasis		1		1		1
PXR/RXR activation		1		1		
FXR/RXR activation			1	1	1	1
Relaxin signaling			1			
HMGB1 signaling			1		1	
TR/RXR activation			1	1	1	1
Coagulation system				1	1	1
LPS/IL1 mediated RXR Inhibition				1		1
Glucocorticoid receptor signaling					1	1
Toll-like receptor signaling					1	1
Type II diabetes signaling						1
Xenobiotic metabolism signaling						1
NRF2-mediated oxidative stress response						1
Canonical Pathways (downregulated genes)	M CvB	F CvB	M GvB	F GvB	M HvB	F HvB
Biosynthesis of steroids	1	1	1	1	1	1
One carbon pool by folate	1	1	1		1	1
Pyrimidine metabolism	1	1	1	1	1	1
ATM signaling	1		1		1	
Cell cycle G2/M DNA damage checkpoint	1		1		1	1
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	1		1		1	1
Protein Ubiquitination	1	1	1	1	1	1
Cell cycle control of chromosomal replication	1	1	1		1	1
Glutathione metabolism	1		1		1	
Mitotic roles of polo-like kinase	1		1	1	1	1
Fructose and mannose metabolism	1	1	1	1		1
Pentose phosphate pathway	1		1		1	
Oxidative phosphorylation	1			1	1	1
Mismatch repair in eukaryotes	1		1		1	1
Aminoacyl-tRNA Biosynthesis		1		1		1
Mitochondrial dysfunction		1		1	1	1
Mechanism of viral exit from host cells			1			
DNA ds break repair by homologous recombination			1			
NRF2-mediated oxidative stress response			1			1

Abbreviations: M = male; F = female; CvB = Land van Cuijk vs. blank; GvB = Grou vs. blank; HvB = Hapert vs. blank

One interesting finding was that DNA-repair genes were repressed, particularly in male effluent-exposed fish. This is in contrast with the results from the preliminary experiment employing F0 generation fish, where these genes were generally induced in effluent-exposed fish. As well as potential generational differences, in the F1 fish, the repression of these genes is significantly associated with a reduction in expression of mitosis genes. Mitosis is the process of cell division in non-sex cells, and it was noted that liver weights tended to be lower in the effluent exposed fish than the controls.

Below is shown an example of one of the significant canonical pathways. In this case the complement system, overlaid with expression values (in pink/red for induction) for genes differentially expressed between Cuijk females and Blanks (no genes in this pathway were repressed).

The complement system is a cascade of enzyme activations that bridge the innate and acquired immune systems. Biological effects of the complement system include opsonization, lysis of foreign cells, clearance of immune complexes and apoptotic cells, activation of inflammation and augmenting the antibody response (Ingenuity Pathway Report).

The complement system has three pathways based on initiation of the complement cascade: classical pathway, alternate pathway and lectin pathway. The classical pathway is triggered by the binding of C1 (a complex of complement associated proteins) to the antigen-antibody (Ag-Ab) complex. The lectin pathway is independent of Ag-Ab complex and is initiated by MBL (mannose binding lectin), a serum protein, binding to mannose groups on bacterial cell walls. The alternate pathway is activated by C3, a complement protein, binding to components of microbial cell surfaces.

The three activation pathways converge into a final common pathway when C3 convertase cleaves C3 into C3a and C3b where C3b is directly linked to opsonization and also goes on to form part of the complex that cleaves C5 into C5a and C5b. C5b with C6, C7, C8, and C9 form the membrane attack complex, also known as MAC, which is inserted into the cell membrane and initiates cells lysis.

In this case, all three sub-pathways and the final common pathway contained induced genes, implying a requirement for increased immune response to foreign or damaged cells and activation of inflammation. Potentially this could be caused by tissue damage arising from exposure to toxicants, or by infection, for example by bacteria or multicellular parasites.

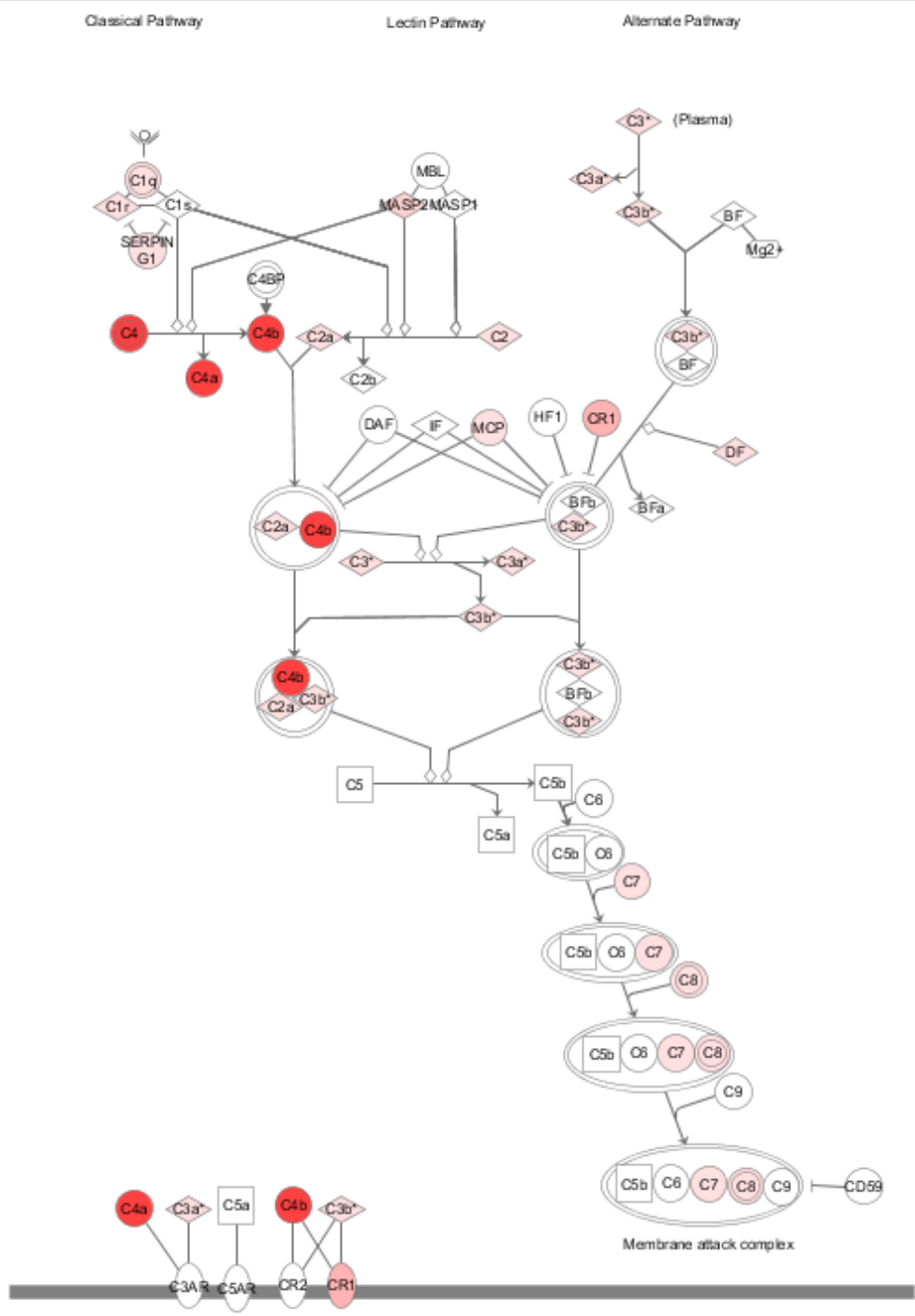
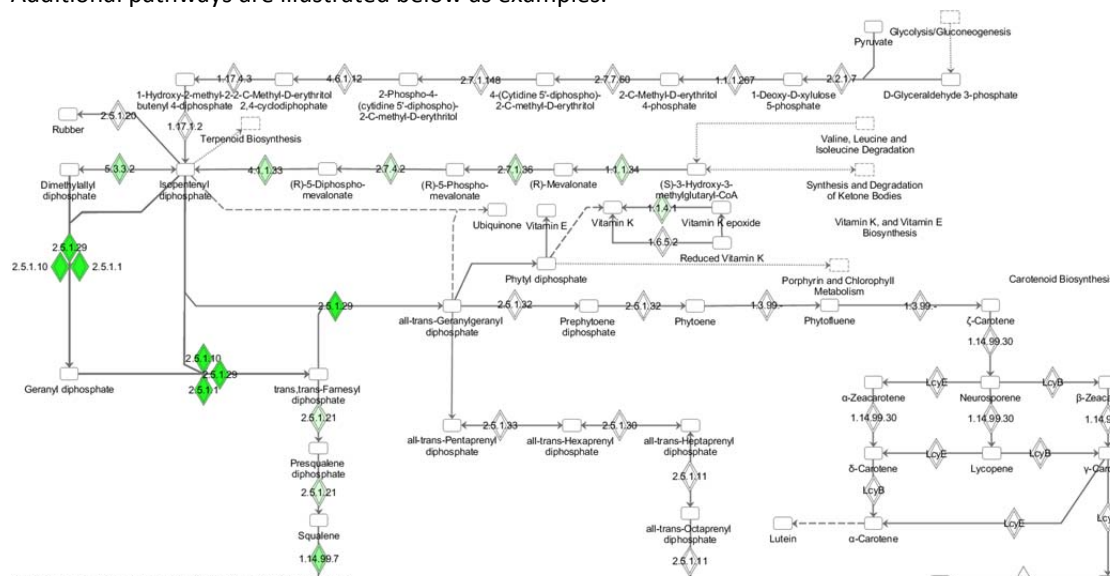


Figure 6-25 Complement Pathway in Cuijk Females

Additional pathways are illustrated below as examples.



Continued:

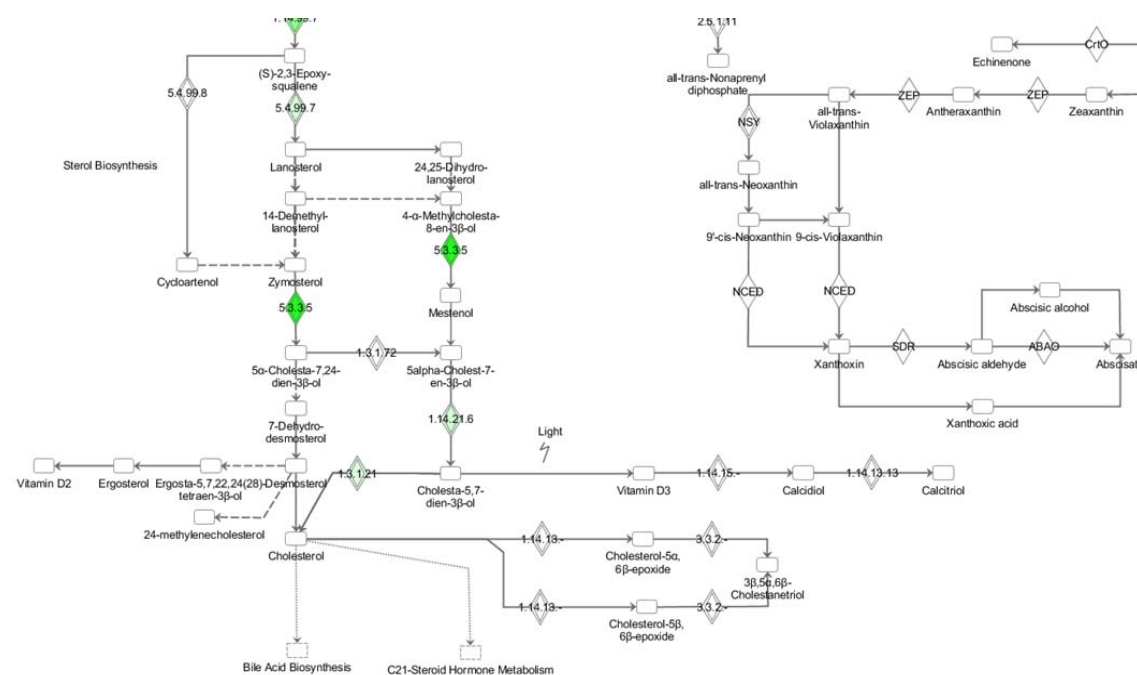


Figure 6-26 Sterol Biosynthesis coloured by expression in female Cuijk fish versus blanks

This pathway demonstrates repression of transcription (green) of enzymes leading to cholesterol synthesis in female fish from the Cuijk WWTP.

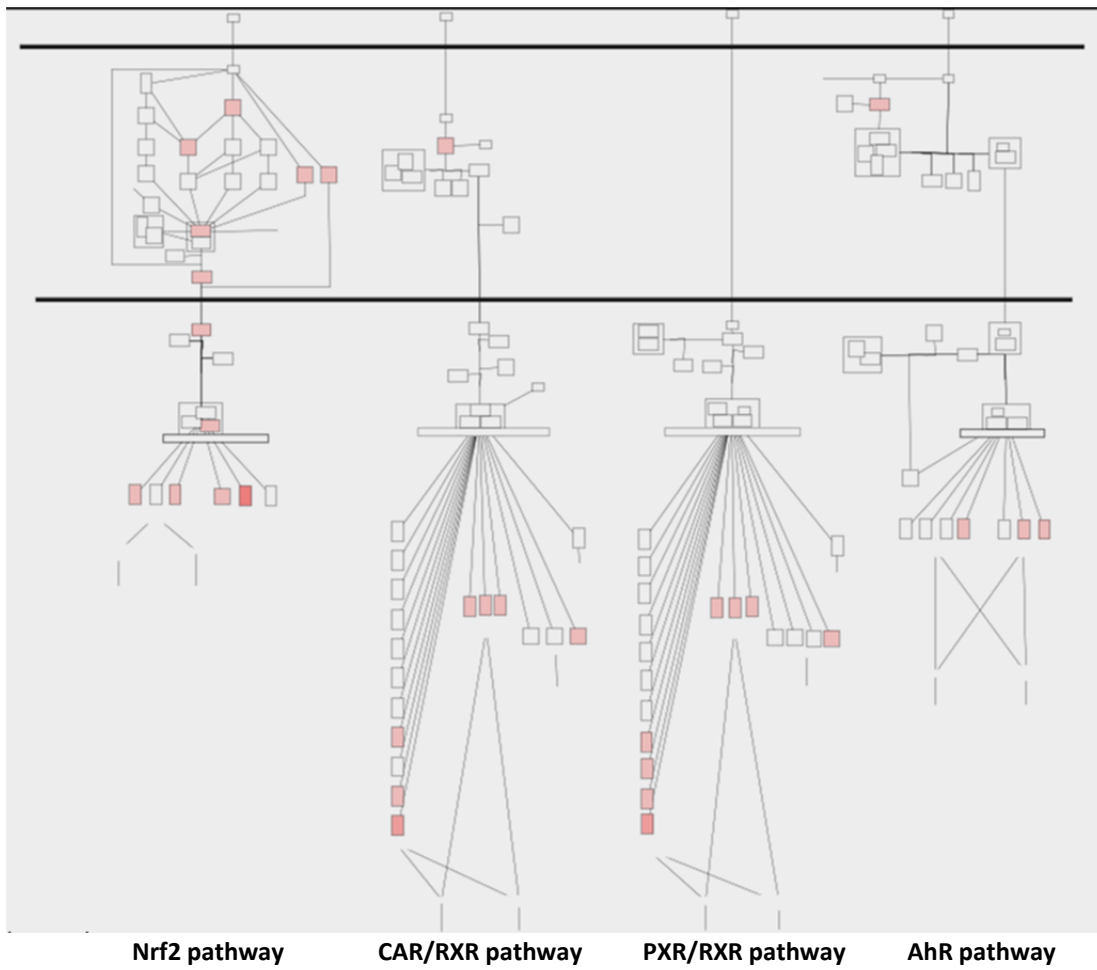


Figure 6-27 Xenobiotic Signalling (overview) in female Hapert fish compared with blanks. Genes induced are shown in pink/red.

Xenobiotic Metabolism Signaling

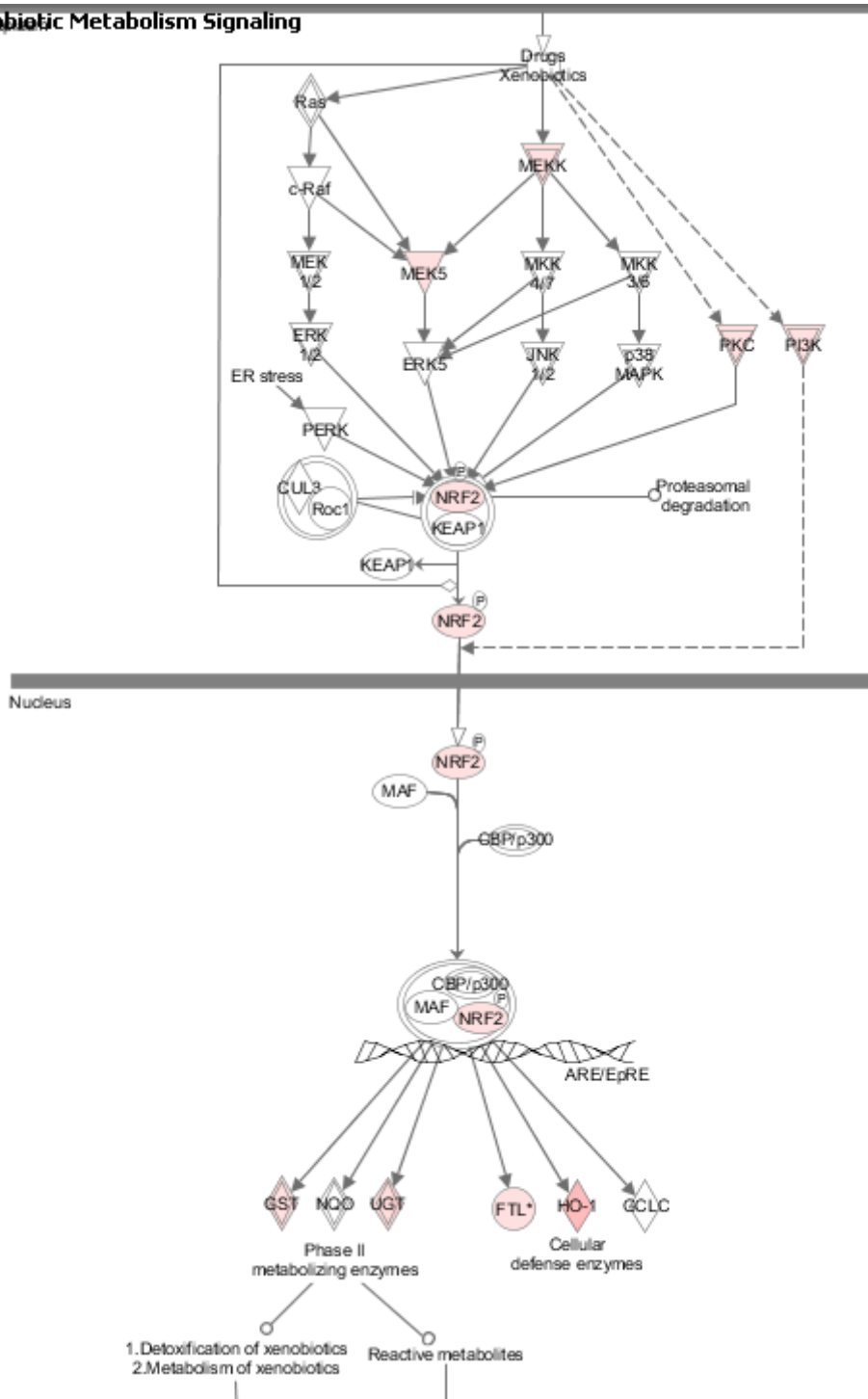


Figure 6-28 Nrf2 pathway of xenobiotic metabolism signalling in Hapert female fish v Blanks

The Nrf2 pathway induces genes containing antioxidant response elements (AREs) in their promoters, that respond to oxidative stress (e.g. HO Heme oxygenase, GST Glutathione-S-transferases).

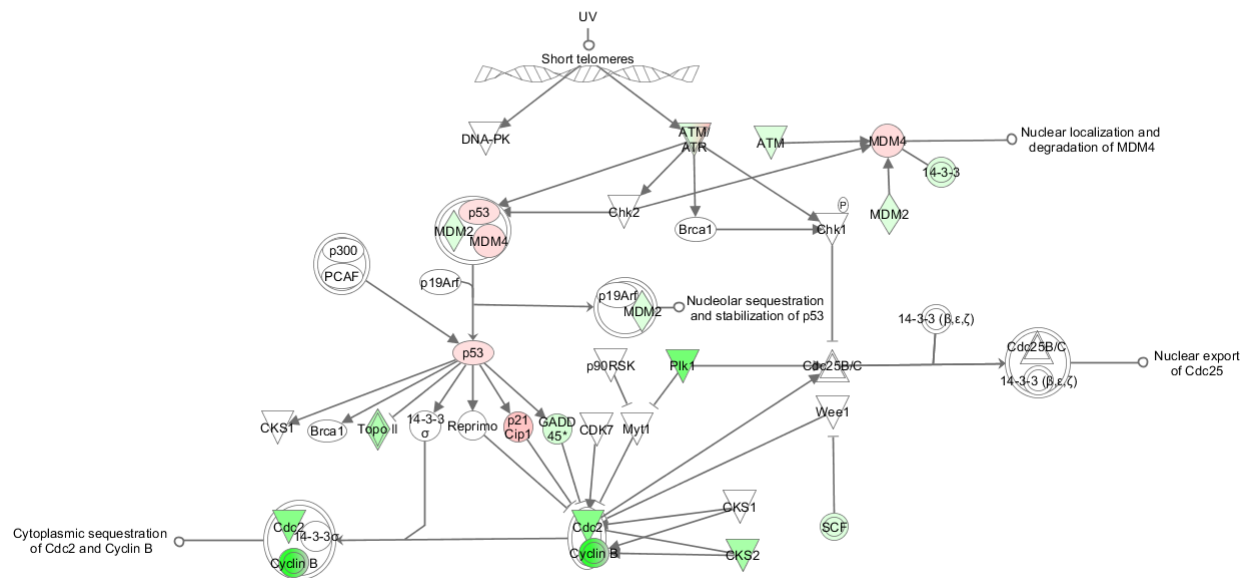


Figure 6-29 Cell cycle G2/M DNA damage checkpoint regulation in Cuijk male fish.

G2/M checkpoint is the second checkpoint within the cell cycle. This checkpoint prevents cells with damaged DNA from entering the M phase, while also pausing so that DNA repair can occur. This regulation is important to maintain genomic stability and prevent cells from undergoing malignant transformation.

Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia mutated and rad3 related (ATR) are key kinases that respond to DNA damage. ATR responds to UV damage, while ATM responds to DNA double-strand breaks (DSB). ATM and ATR activate kinases Chk1 and Chk2 which in turn inhibit Cdc25, the phosphatase that normally activates Cdc2. Cdc2, a cyclin-dependent kinase, is a key molecule that is required for entry into M phase. It requires binding to cyclin B1 for its activity.

The tumor suppressor gene p53 is an important molecule in G2/M checkpoint regulation. ATM, ATR and Chk2 contribute to the activation of p53. Further, p19Arf functions mechanistically to prevent MDM2's neutralization of p53. Mdm4 is a transcriptional inhibitor of p53. DNA damage-induced phosphorylation of Mdm4 activates p53 by targeting Mdm4 for degradation. Well known p53 target genes like Gadd45 and p21 are involved in inhibiting Cdc2. Another p53 target gene, 14-3-3σ, binds to the Cdc2-cyclin B complex rendering it inactive. Repression of the cyclin B1 gene by p53 also contributes to blocking entry into mitosis. In this way, numerous checks are enforced before a cell is allowed to enter the M phase (Ingenuity Pathway Report).

In the Cuijk males, and at the other sites, cyclin B expression is repressed in comparison with control fish. Therefore entry into mitosis tends to be repressed. As shown by GO analysis, mitosis-associated genes are generally repressed. This pathway provides a potential link between DNA-damaging toxicants and suppression of mitosis, which could result in the low liver weights observed at many sampling positions in the WWTPs.

Summary of Functional Analyses

The functional analyses shown here were conducted on genes differentially expressed between each WWTP and the blank, for each sex. Subsequently, this will be repeated for each sampling position with each WWTP.

Particularly notable from the GO analyses were the induction of genes responsive to insulin at all sites and to other steroid hormones (including glucocorticoids) at most sites. There was evidence for immune and inflammatory responses at the majority of sites, more pronounced in females. In three of six comparisons there was also induction of pro-apoptotic transcripts. The immune and inflammatory gene inductions were also highlighted by the IPA analyses, together with a number of signalling pathways, often involving RXR, the retinoid X receptor. In females genes related to hepatic cholestasis, (the bile precursor accumulation known to indicate a pro-carcinogenic environment) were induced.

At all sites, by GO, mitotic cell cycle genes were repressed, with DNA replication genes forming a subset of these. Additionally genes involved in DNA repair were repressed, particularly in males. Cholesterol biosynthetic, proteasomal and mitochondrial genes were also repressed. By IPA, genes from a number of pathways relating to mitosis were also repressed, including pyrimidine metabolism, cell cycle and polo-kinase, as well as DNA repair pathways. As with GO, steroid biosynthesis, protein ubiquitination and genes of mitochondrial energy pathways were highlighted as repressed.

Overall, the gene expression changes showed functional categories of genes were co-expressed at all WWTP sites. There were similarities between sample groups of the same sex. The different WWTPs displayed related profiles of functional change, but differed in detail.

Chemical Interaction Analyses

The above analyses are well-established within the field of genomics. However, one objective of this project was to attempt to relate gene expression changes to classes of chemicals present within the effluents. As explained in the introduction (Section 2), this is not a straightforward task. For this an experimental analysis was employed, CTD-enrichment analysis (Williams et al., 2011). This groups genes by the chemicals that have previously been found to induce or repress them and tests for enrichment of these groups within lists of significantly differentially expressed genes. The previous data used for this is derived from the Comparative Toxicogenomics Database (CTD), and was gathered from many experiments using different species, tissues, doses and exposure times. Therefore the approach is still under evaluation.

CTD enrichment analyses were carried out in a similar way to the GO and IPA analyses, using differentially expressed genes that were significant by ANOVA (FDR<0.05) and changed by 2-fold versus the Blank control group. These analyses were carried out for each sex separately on each WWTP site, and each sampling position within each WWTP site. Additionally, a combined score was generated by multiplying FDRs from the female analysis by FDRs from the male analysis. Therefore 42 (3 overall WWTP, 11 WWTP positions x 3 for male, female, both) analyses were performed.

The full data is shown in Supplementary Main 2.

Shown in Table 14 below is a list of the most significant and frequently-occurring chemical associations, ordered by the number of analyses in which they were found to be significant. These show a variety of 'predicted' chemicals including classic xenobiotic pollutants such as PAHs and PCBs, (benzo(a)pyrene and hexachlorobiphenyl). However the main chemicals highlighted are sterols, steroids and fatty acids and pharmaceuticals and personal care products.

Table 6-13 Most common significant CTD chemical-gene associations

Chemical	Number	Stressor Type
22-hydroxycholesterol	41	Oxysterol, LXR ligand
Tretinoin	41	ATRA, retinoic acid, Vit A, RAR ligand
bexarotene	40	Antineoplastic, RXR ligand
arsenite	40	Inhibits pyruvate dH and lipoamide
Corticosterone	40	Glucocorticoid, anti inflamm/immun
Dexamethasone	40	Glucocorticoid, anti inflamm/immun
Acetaminophen	40	Paracetamol, GSH depletion
Streptozocin	38	Pancr. islet toxicity, insulin reduced
bis(tri-n-butyltin)oxide	37	TBTO, immunosuppression
Paraquat	37	Oxidative stress
Lipopolysaccharides	37	Immune response inducer
bicalutamide	37	Anti-androgen
methylselenic acid	36	Se-Met metabolite, antioxidant
trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid	36	Anti-obesity, increases imm&inf
Raloxifene	36	Selective ER modulator
resveratrol	36	Anti-inflamm, topoisomerase inhib
Progesterone	35	Steroid hormone
Zinc Sulfate	35	Heavy metal, essential
sodium arsenite	33	Inhibits pyruvate dH and lipoamide
Ozone	32	Oxidative stress
Caffeine	31	Xanthine alkaloid
2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl	31	Polychlorinated biphenyl
Calcitriol	31	Active form Vitamin D
cobaltous chloride	31	Hypoxia-like response, erythropoiesis
Carbon Tetrachloride	30	Liver toxin non-genotoxic carcinogen
Cyclosporine	30	Immunosuppressant
4-hydroxytamoxifen	30	Afimoxifene Selective ER modulator
Fluorouracil	29	Chemotherapeutic, TK inhibitor
2-methylbutyric acid 4-((1,3)dioxan-5-ylmethoxyimino)-8-(2-(4-hydroxy-6-oxo-tetrahydropyran-2-yl)ethyl -7-methyl-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthyl)heptanoate	29	Naphthylene cpd, HMG-CoA reductase inhibitor
Benzo(a)pyrene	29	Cholesterol reducer
Naloxone	29	PAH, AhR inducer, mutagenic
fulvestrant	29	Opioid antagonist
Clofibrate	28	Anti estrogen, ER antagonist
irinotecan	28	Lipoprotein lipase inducer, lipid redu
Cytarabine	28	Chemotherapeutic, Top1 inhibitor
Thioacetamide	27	Chemotherapeutic, DNA damage
AM 251	27	Organosulfur, T3 T4 repressor
1-Naphthylisothiocyanate	27	Cannabinoid receptor antagonist
	27	P450 inhibitor

Results can also be illustrated by heatmaps, as below. Here the female and male associations are shown at each site, then the more significant combined associations (calculated by multiplying the independent results for males and females, therefore by definition more significant).

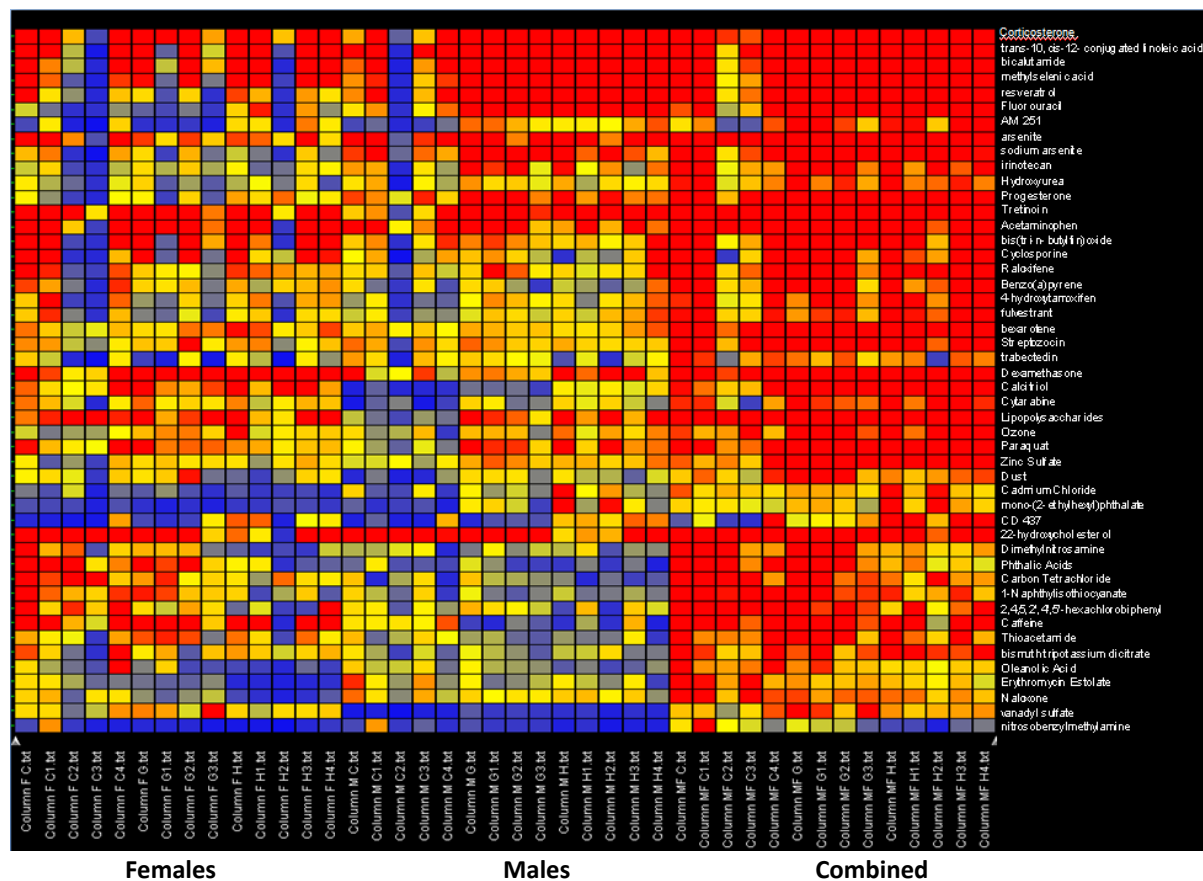


Figure 6-30 Heatmap of CTD Chemical-gene associations. Colouring is relative to statistical significance of the association. Red= highly significant, blue= not significant (best viewed at 200% zoom).

Comparison of CTD analyses and Passive Sampler Chemistry

The CTD database does not include all chemicals tested for by analytical chemistry of the passive sampler extract, nor were all CTD chemicals measured by chemistry. Of those that were, the chemicals shown below were detected by both methods (Figure 6-31A) or only detected by chemistry (Figure 6-31B). Mean values for each chemical over all sampling periods were employed.

Passive Sampler Mean Dissolved (ng/l)	C1	C2	C3	C4	G1	G2	G3	H1	H2	H3	H4	#CTD	#Samp
Acetaminophen	64	95	135	121	121	50	96	46	82	57	35	11	11
Benzo(a)pyrene	0.23	0.29714	0.08829	0.13271	0.12843	0.08686	0.1054	0.60286	0.25	0.44429	0.25143	11	11
Progesterone			0.28		0.075	0.052	0.109	0.65	0.32	0.098	0.084	11	8
Caffeine	1160	1138.5	994.25	907.5	1279	1159.75	1373.5	811.5	589	748	692.75	10	11
Lindane		2.5					5.1	30	20			10	4
Carbamazepine	34.8	35.8	42.4	43.6	59.4	62.2	73.4	26.2	27	27.6	36.8	9	11
Chlorpyrifos	8.348	10.372	2.55	4.106	1.002	0.808	0.56	30.36	17.4333	18.38	14.04	9	11
Hexachlorobenzene	0.21833	0.1835	0.096	0.32667	0.35	0.20433	0.197	0.46	0.4025	0.26167	0.25	9	11
vinclozolin	3.8	2.19	1.885	1.105				4.6		6.3	6.3	9	7
Dieldrin	0.83					0.33			0.56	0.21	0.56	9	5
Diethylhexyl Phthalate	48.5	35.5	71.5	47	24	30.5	60.5	61	32.5	36.5	47	6	11
Diethylstilbestrol	0.33825	0.3025	0.32525	0.284	0.09533	0.0535	0.11867	0.1115	0.0335	0.08675	0.313	6	11
pyrene	3.88571	4.71429	2.37143	3.06143	4.12857	2.9	2.16714	5.57143	4.62	4.58571	5.18571	5	11
bisphenol A	0.13667	0.28	0.21267	0.19933	0.127	0.341	0.25	0.53	0.543	0.28733	0.17	4	11
Estradiol	0.063	0.1	2.2	0.042	0.042	0.026	0.43	8	7.3	4.7	6.6	4	11
naphthalene	2.38714	2.96714	3.89	4.45714	1.70286	3.58571	2.68857	2.19286	2.13	2.95714	3.22429	4	11
fluoxetine	0.01867	0.03467	0.0685	0.05475	0.0755	0.0665	0.08225	0.398	0.575	0.7775	0.4275	3	11
endosulfan				1.9	1.9	2.1			3.5			3	4
alpha-hexachlorocyclohexane								4.5	3.4		2.9	3	3
Dichlorodiphenyl Dichloroethylene										0.044		3	1
difenoconazole	0.4975	3.1675	2.4325	2.3075	0.66	0.57	0.72	5.43333	0.57	2.46	2.76667	2	11
prochloraz	0.54	1.99667	1.51	1.38333	0.48	0.44667	0.74	2.79	0.54	1.245	1.29	2	11
Methyl Parathion												2	0
Fenofibrate	0.0792	0.1414	0.12025	0.1478	0.358	0.41	0.442	0.1636	0.19267	0.2034	0.2808	1	11
Ibuprofen						0.39	0.29	0.087	0.064			1	4

Figure 6-31A Chemicals detected by passive sampler (number of sites shown), present within CTD, and significant at least one site by CTD analyses

Shown in red are those sites where there was significant association (FDR<0.05) between gene expression changes and CTD chemical-gene data.

4-dichlorobenzene	11	fluorene	11	Simazine	11	beta-hexachlorocyclohexane	4
benzo(a)anthracene	11	flutolanil	11	Thiabendazole	11	DDT	4
benzo(k)fluoranthene	11	Gemfibrozil	11	dinonylphthalate	10	Diflubenzuron	4
butylbenzyl phthalate	11	imidacloprid	11	Methiocarb	10	Endrin	4
chrysene	11	Linuron	11	Permethrin	7	tetramethrin	4
Clotrimazole	11	nonylphenol	11	Estrone	6	Parathion	3
Diazinon	11	pentachlorobenzene	11	captafol	5	Methomyl	2
Dibutyl Phthalate	11	pirimicarb	11	Naproxen	5	Dimethoate	1
Diuron	11	propiconazole	11	Aldrin	4		

Figure 6-31B: Chemicals detected by passive sampler (number of sites shown), present within CTD, but not significant by CTD analyses

Disease Association Analyses

In a similar manner to enrichment of chemical-gene associations, disease associations of differentially expressed genes were also analysed. This analysis is similarly experimental and results should be interpreted with caution. They indicate that genes differentially expressed in a particular comparison have been associated more strongly with a certain disease than the entire collection of detected genes. Unlike the chemical associations, these analyses do not take into account direction of change i.e. induction or repression, but are simply based on all statistically significant genes differentially expressed at least 2-fold in each group relative to controls.

Table 6-14 Disease Associations

	Cuyk	FDR	Grou	FDR	Hapert	FDR
Males	Urinary Bladder Neoplasms	5.62E-07	Osteoporosis, Postmenopausal	2.42E-14	Esophageal Neoplasms	1.98E-14
	Nose Neoplasms	5.62E-07	Brain Injuries	2.42E-14	Liver Neoplasms, Experimental	1.83E-12
	Carcinoma, Non-Small-Cell Lung	2.28E-06	Liver Cirrhosis	8.15E-13	Sarcoma, Ewing's	1.31E-11
	Melanoma	3.05E-06	Encephalomyelitis, Autoimmune	1.62E-12	Stomach Neoplasms	6.82E-11
	Thrombophilia	3.05E-06	Cardiovascular Diseases	2.57E-12	Osteoporosis, Postmenopausal	8.75E-11
	Venous Thrombosis	3.05E-06	Brain Hemorrhage, Traumatic	2.83E-12	Uterine Cervical Neoplasms	8.75E-11
	Encephalomyelitis, Autoimmune	3.14E-06	Diabetic Neuropathies	2.83E-12	Fatty Liver	8.75E-11
	Panic Disorder	3.27E-06	Myocardial Infarction	3.04E-12	Adenocarcinoma	1.81E-10
	Hypospadias	3.27E-06	Salivary Gland Neoplasms	3.20E-12	Hodgkin Disease	1.89E-10
	Cholestasis	3.29E-06	Spinal Cord Injuries	3.20E-12	Liver Neoplasms	1.89E-10
	Infertility, Female	3.30E-06	Myocardial Reperfusion Injury	7.83E-12	Encephalomyelitis, Autoimmune	1.89E-10
	Cardiovascular Diseases	3.30E-06	Alzheimer Disease	1.52E-11	Bronchial Hyperreactivity	1.89E-10
	Renal Insufficiency	4.49E-06	Liver Neoplasms, Experimental	1.84E-11	Dermatitis, Allergic Contact	2.02E-10
	Alzheimer Disease	4.89E-06	Atherosclerosis	1.84E-11	Uterine Neoplasms	2.29E-10
	Vaginal Neoplasms	4.89E-06	Endometriosis	2.31E-11	Carcinoid Tumor	2.42E-10
	Acne Vulgaris	4.89E-06	Pneumonia	2.56E-11	Carcinoma, Renal Cell	2.65E-10
Nephrotic Syndrome	4.89E-06	Obesity	4.59E-11	Peritonitis	3.44E-10	
Head and Neck Neoplasms	4.89E-06	Carcinoma, Lewis Lung	7.71E-11	Diabetes Mellitus, Type 2	5.34E-10	
Thrombosis	4.89E-06	Neoplasms, Experimental	7.71E-11	Bone Marrow Neoplasms	5.34E-10	
Brain Injuries	4.89E-06	Esophageal Neoplasms	7.71E-11	Carcinoma, Hepatocellular	9.13E-10	
Females	Encephalomyelitis, Autoimmune	7.38E-14	Arthritis, Experimental	2.20E-13	Salivary Gland Neoplasms	2.70E-12
	Liver Cirrhosis	1.74E-13	Encephalomyelitis, Autoimmune	2.20E-13	Brain Hemorrhage, Traumatic	2.70E-12
	Fatty Liver	1.74E-13	Liver Cirrhosis	3.78E-13	Diabetic Neuropathies	2.70E-12
	Arthritis, Experimental	1.44E-12	Fatty Liver	1.19E-12	Spinal Cord Injuries	2.98E-12
	Peritonitis	7.52E-12	Pneumonia	1.27E-12	Encephalomyelitis, Autoimmune	2.22E-11
	Alzheimer Disease	1.30E-11	Peritonitis	1.27E-12	Endometriosis	1.38E-09
	Asthma	2.50E-11	Dermatitis, Allergic Contact	2.85E-12	Fatty Liver	2.09E-09
	Pneumonia	5.96E-11	Bronchial Hyperreactivity	5.65E-12	Arthritis, Experimental	5.84E-09
	Dermatitis, Allergic Contact	9.79E-11	Salivary Gland Neoplasms	1.53E-11	Brain Injuries	9.88E-09
	Brain Injuries	9.79E-11	Spinal Cord Injuries	2.93E-11	Hepatitis	9.88E-09
	Bronchial Hyperreactivity	9.79E-11	Brain Hemorrhage, Traumatic	2.93E-11	Diabetes Mellitus, Type 2	9.90E-09
	Salivary Gland Neoplasms	1.15E-10	Hepatitis	2.93E-11	Dermatitis, Allergic Contact	1.07E-08
	Metaplasia	1.19E-10	Liver Neoplasms, Experimental	3.10E-11	Bronchial Hyperreactivity	2.12E-08
	Spinal Cord Injuries	1.19E-10	Diabetic Neuropathies	3.10E-11	Metaplasia	4.55E-08
	Hepatitis	1.19E-10	Metaplasia	4.04E-11	Peritonitis	4.55E-08
	Brain Hemorrhage, Traumatic	1.43E-10	Liver Failure	5.63E-11	Liver Cirrhosis, Experimental	5.59E-08
	Diabetic Neuropathies	1.67E-10	Hyperbilirubinemia	1.32E-10	Liver Neoplasms, Experimental	7.11E-08
	Arthritis, Rheumatoid	4.18E-10	Cholestasis	3.33E-10	Neovascularization, Pathologic	7.11E-08
	Obesity	4.86E-10	Alzheimer Disease	3.54E-10	Pneumonia	1.10E-07
	Cholestasis	6.71E-10	Thrombophilia	3.84E-10	Thrombosis	1.23E-07

Some interesting results are highlighted in red. These include many associations with carcinogenesis, which is unsurprising given the frequency of differential expression of cell-cycle and xenobiotic metabolism genes. There are indications of liver damage, including hepatitis, cholestasis, fatty liver and liver failure. Also, in Cuijk males, terms related to the endocrine system are highlighted, including hypospadias and female infertility. Many terms relate to immunity and inflammation, such as arthritis, asthma and autoimmune diseases. Additionally terms related to diet including obesity and diabetes occur, which may reflect the differential sizes and nutrition of exposed and control fish.

Comparisons of gene expression data with in vitro bioassays

A number of different bioassays were carried out using extracts of hydrophobic contaminants from the different wetland sampling positions. These are shown in full in WIPE Report 2. As discussed in the introduction section, there are many reasons why the fish gene expression data and bioassay data may not be comparable. These include different biomagnification, uptake, absorption and metabolism characteristics in the different systems employed, and species differences. For example the algae are more likely to be affected by herbicides than are the fish.

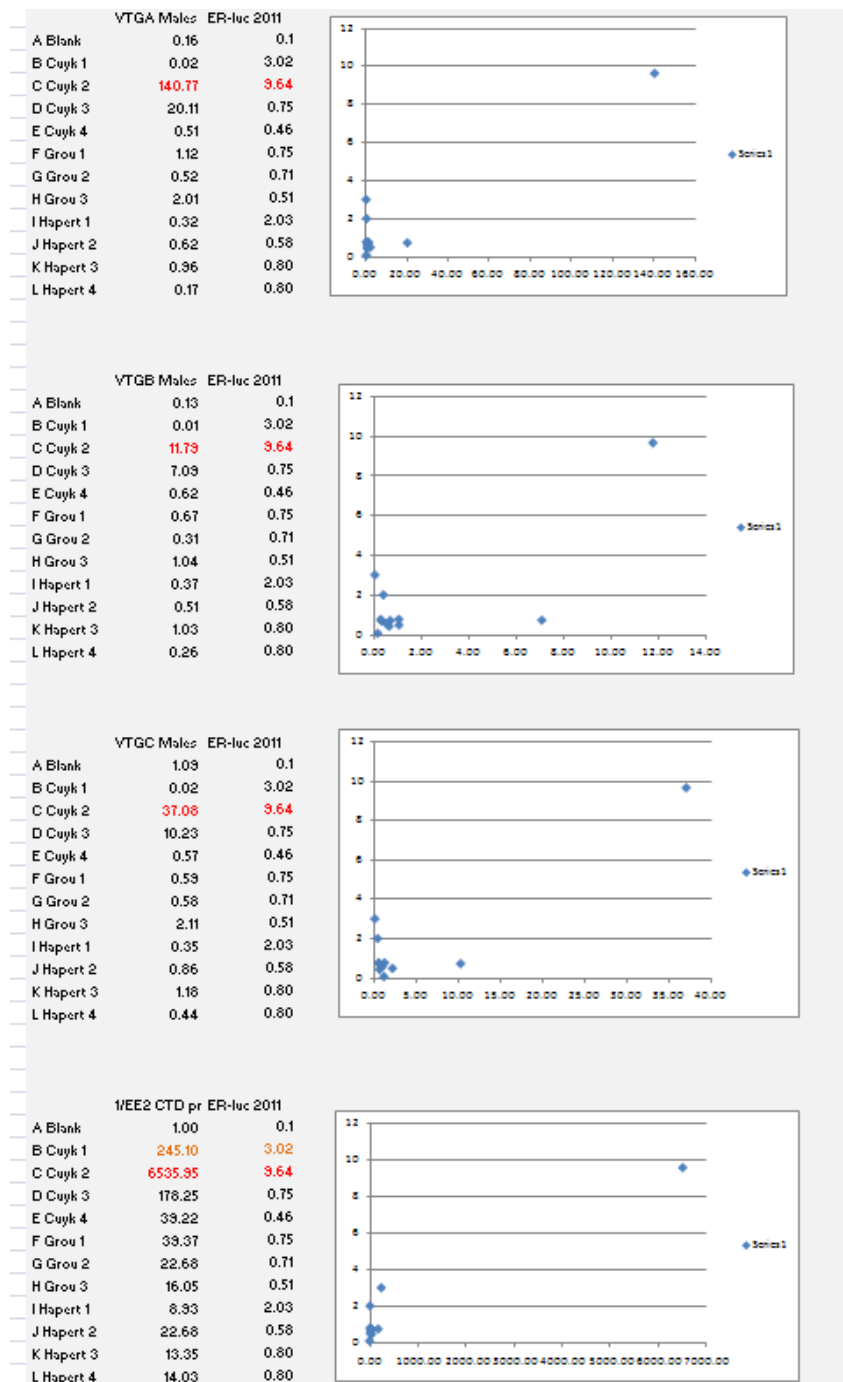


Figure 6-32 Comparison of ER-luc Bioassay data with stickleback gene expression

Comparison of male VTG expression (VTG A,B,C) or significance of detection of EE2 by CTD analysis with ER-luc bioassay data for last sampling date (1/2011), closest to fish sampling.

All highlight Cuijk 2 as the site with greatest estrogenic activity, but there is little effective differentiation between less-affected sites.

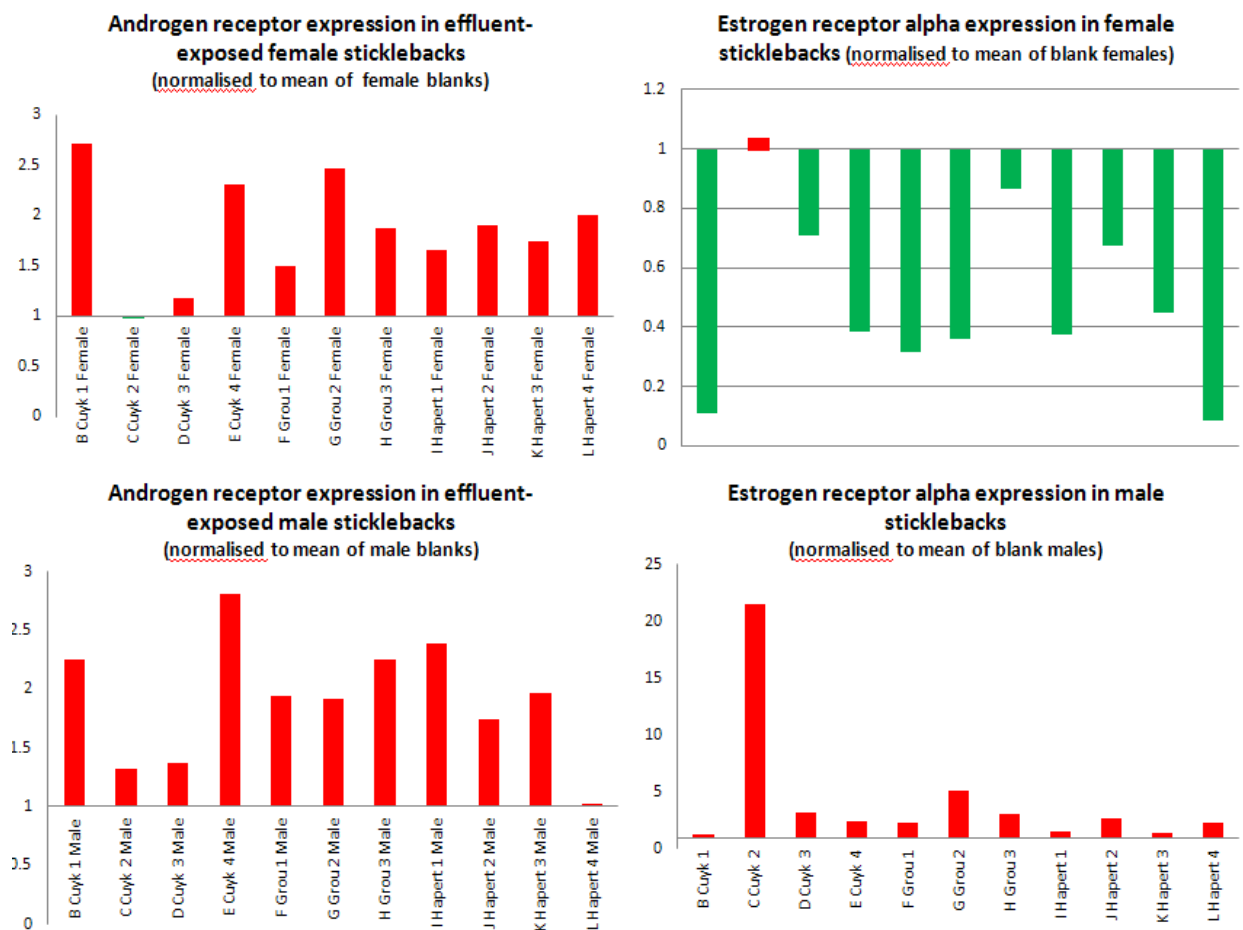


Figure 6-33 Estrogen and Androgen receptor expression

The expression of estrogen receptor alpha in female sticklebacks shows a general repression in comparison with blank females. Notably Cuijk 2 fish do not show this repression, and Cuijk 1 and Hapert 4 fish show the most severe repression. This matches well with the profile of vitellogenin expression. Male fish generally show induction of ER alpha, particularly at Cuijk 2, but not at Cuijk 1, again matching with vitellogenin expression. Androgen receptor expression is generally induced in females, apart from at Cuijk 2 and 3, and is particularly high at Cuijk 1. Males show a similar profile, although the single Hapert 4 sample shows no induction of AR.

The profiles are consistent with the presence of androgens/anti-estrogens at all sites except Cuijk 2 and 3 and a strong estrogenic stimulus at Cuijk 2 with a weak estrogenic stimulus at other sites. ER alpha expression therefore highlighted Cuijk 2 as a pro-estrogenic site in common with VTG expression and ER-luc induction in-vitro.

Androgen Receptor expression in sticklebacks agreed with the in vitro tests for AR-luc activity in that it was generally higher at all sampling sites than the blank controls. However, AR expression in sticklebacks did not correlate well in detail with AR-luc in-vitro data, which also varied with sampling date.

The TRE-luc assays, which assessed induction of the thyroid hormone receptor in-vitro, showed generally low effects of thyroid-active compounds at all sites. The expression of the thyroid hormone receptor in sticklebacks appeared to differ between the sexes and was generally higher in effluent-

exposed females than controls, although not displaying a high magnitude of change. Male fish were more variable.

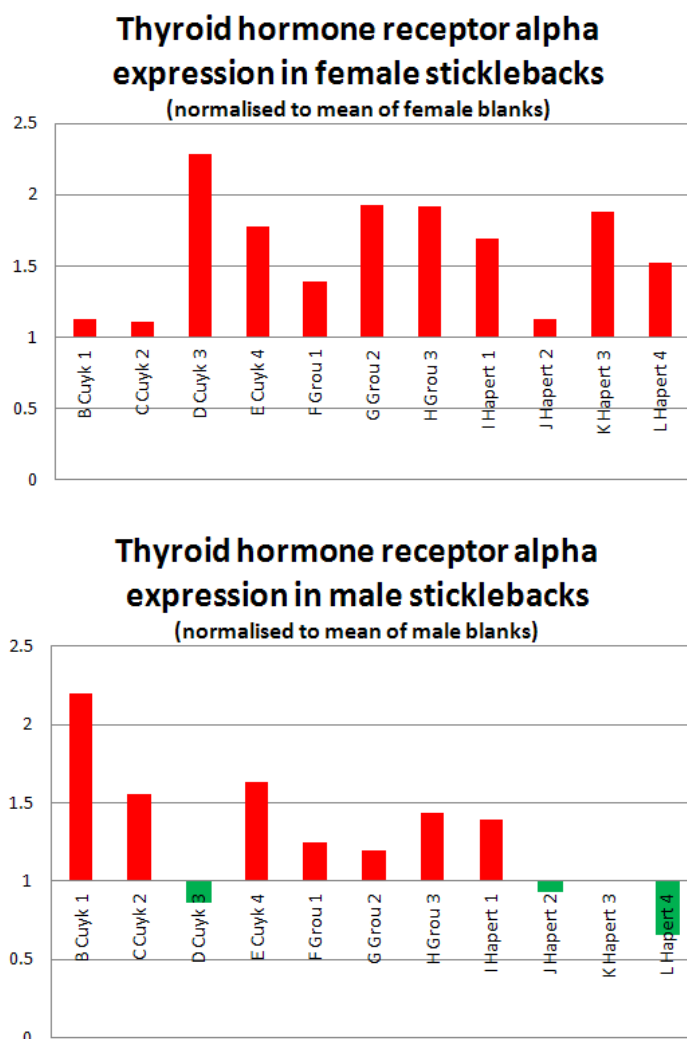


Figure 6-34 Thyroid hormone receptor expression in sticklebacks

The CEPIA in-vitro assay measures the percentage inhibition of cellular efflux in response to treatments. One notable cellular efflux pump is P-glycoprotein, a member of the ABCB family of trans-membrane transporter proteins (multi-drug resistance, MDRs). This gene family differs in detailed composition between humans and stickleback, but expression of the most orthologous MDR gene to human P-glycoprotein 1 in stickleback (annotated as P-glycoprotein 3) is shown below.

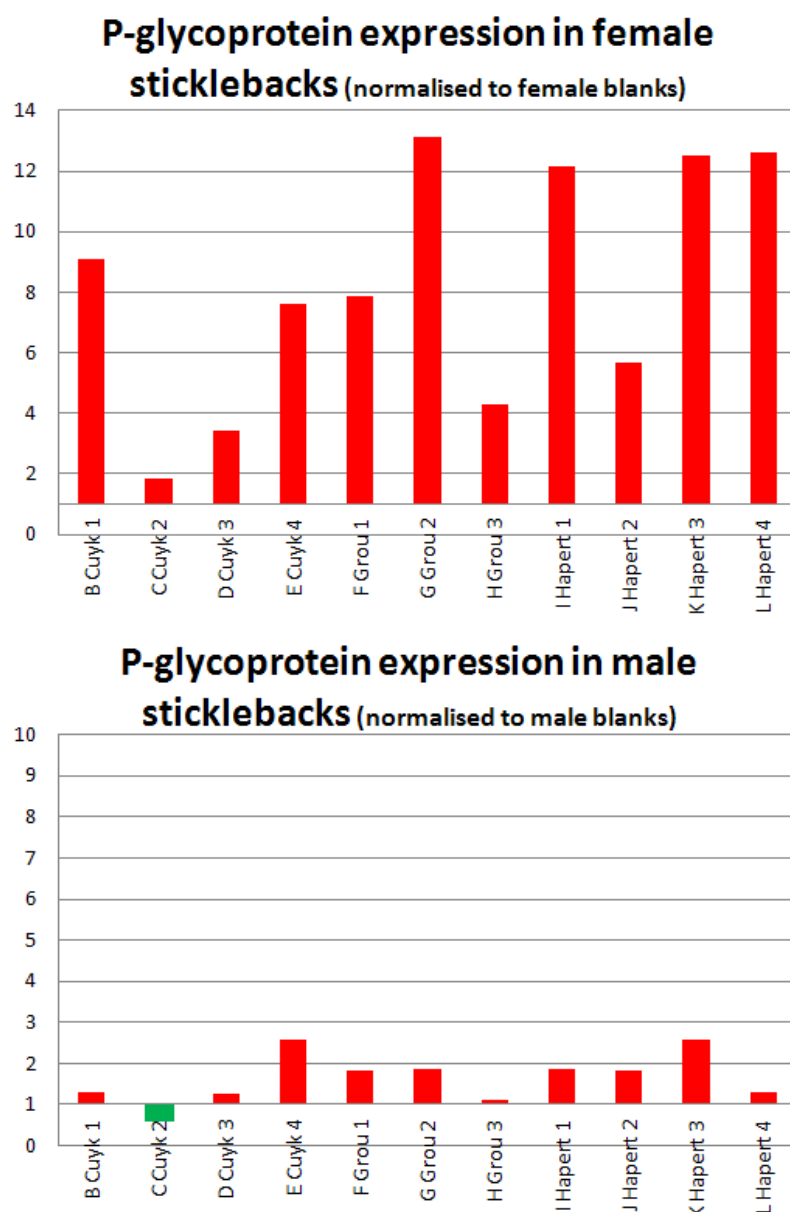


Figure 6-35 P-glycoprotein expression in sticklebacks

The average inhibition of cellular efflux found by the CEPIA assay with WWTP samples varied between the control level and up-to 2-fold this level (4.3% to 7.2%) although the response varied with sampling date. In contrast P-gp expression in sticklebacks was generally higher in effluent exposed fish than controls. Notably, expression was sex-dependent with generally high induction in females compared with males. As there are a number of different cellular efflux proteins it is not surprising that these data were in disagreement. One hypothesis that could be put forward is that repression of the activity of cellular efflux pump proteins by contaminants may require an induction of gene expression as a method to restore homeostasis by increasing the number of efflux pumps per cell. However, at present this is speculative.

A number of assays were carried out for each sampling position, including in vivo toxicity and in vitro bioassays. These results were correlated with gene expression data in a preliminary attempt to determine relationships between the various data types. This approach is limited as only the mean

expression per position could be correlated for 11 sampling positions, thus tending to find differences between sites rather than those specifically linked to the measured parameters .

Table 6-15 Functional groups of genes that correlated with other assays

Assay	Types of genes correlating in males	Types of genes correlating in females
Microtox	Ribosome, Translation	Immune & Inflammatory responses
Daphnia Toxicity	Ribosome General metabolism	Fatty acid metabolism Immune & Inflammatory responses
Algae Toxicity	Electron transport Oxidative phosphorylation, ATP synthesis	Aerobic respiration Ribosome
MTT	Oogenesis, thermoregulation Apoptosis	Death Apoptosis
DR-luc	Cytolysis Coagulation	Complement, Inflammation Coagulation
ER-luc	Translation Cytoskeleton	Response to xenobiotics
AR-luc	RNA metabolism	Chromatin, DNA packaging
CEPIA	Chromatin Muscle contraction	Ribosome

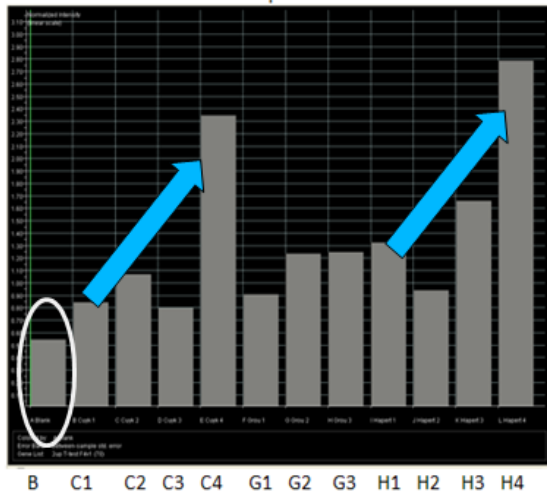
Table 6-15 shows the results of these preliminary correlations. Genes that correlated with each measured parameter were determined by Pearson correlation with a P-value cut-off of 0.05 and no multiple testing corrections. This is therefore not a statistically stringent test. Subsequently Gene ontology enrichment was carried out upon these genes, demonstrating the main functional classes that were enriched amongst correlating genes as compared with all detected genes. The data employed for the cellular assays was a mean value derived from all sampling dates, which tended to vary considerably. Despite the drawbacks of the analyses a number of interesting relationships emerged.

Algal toxicity was correlated with stickleback genes involved in energy pathways such as ATP synthesis, electron transport and aerobic respiration. The MTT assay, indicating cellular viability, correlated with genes of the apoptotic pathways leading to cell death. The DR-luc data correlated with expression of genes involved in coagulation, cytolysis and inflammation. In this complex mixture situation it is not necessarily specific DR-luc inducers, for example, that cause a response in the sticklebacks, but may well represent other compounds whose prevalence correlated with DR-luc inducers.

Does wetland remediation return gene expression profiles towards the 'control state'?

A comparison was carried out to determine if gene expression profiles tended to become more similar to those of the control fish after wetland remediation.

A- Genes induced in site 4 compared with site 1 in females



B – Genes repressed in site 4 compared with site 1 in females

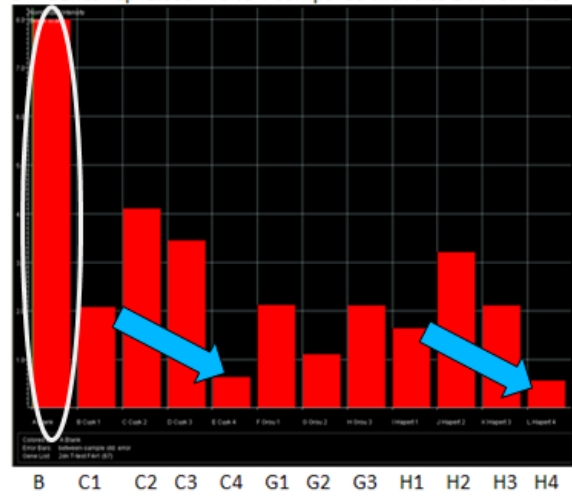
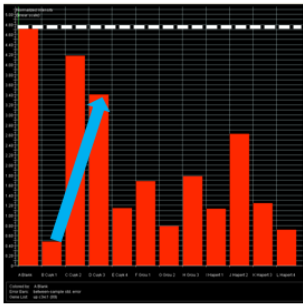


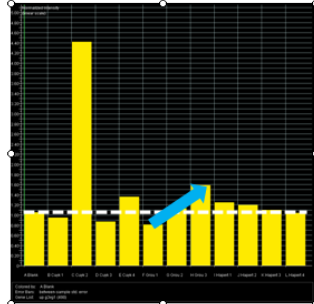
Figure 6-36 Average expression of genes differing between positions 4 and 1

Figure 6-36 shows the average expression of all genes significantly changing in expression (FDR<0.05) between positions 1 and 4. For the induced genes (A) and repressed genes (B), all show that, in general, position 4 gene expression does not return towards control levels ('B', circled in white). According to the other WIPE reports, however, the impact of the last compartments of the three wetlands (fish spawning pond, forest wetland and efflux ditch) was negligible. Therefore the analysis was repeated on all genes that significantly changed in expression between positions 1 and 3, separately analysed for males and females from all three wetlands. The results of this analysis (Figure 6-37, next page) show that both up- and downregulated genes at Cuijk (only ♀) and Hapert returned towards control levels, while levels at Grou slightly diverged from controls, but remained close. This might indicate a weak bioremediation effect of the first two compartments of the Waterharmonica, the sedimentation ponds and helophyte fields.

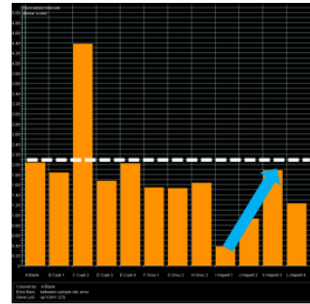
A. Females



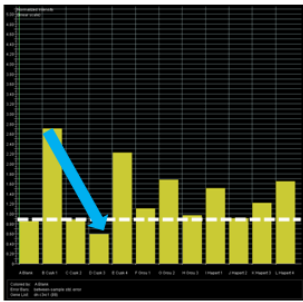
Up C3 vs. C1



Up G3 vs. G1



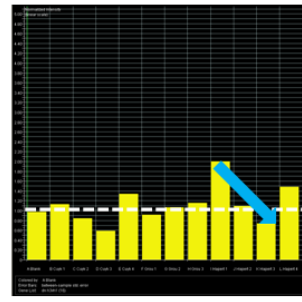
Up H3 vs. H1



Down C3 vs. C1



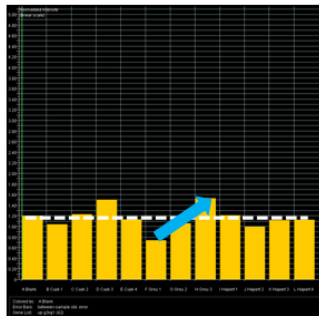
Down G3 vs. G1



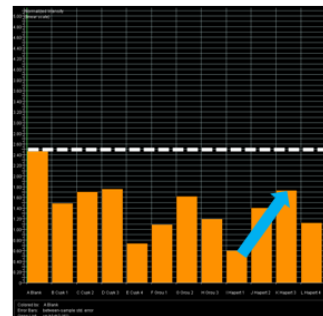
Down H3 vs. H1

B. Males

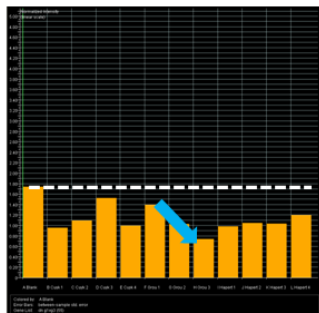
Cuyk males
No significant genes
between C3 and C1 (likely
due to low sample
numbers)



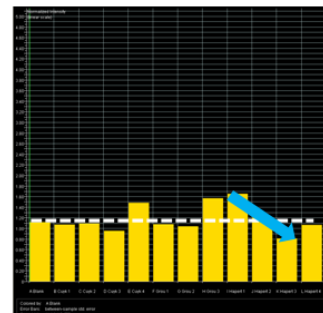
Up G3 vs. G1



Up H3 vs. H1



Down G3 vs. G1



Down H3 vs. H1

Figure 6-37 Average expression of genes differing between positions 3 and 1 at each site in A. females and B. males.

6.5 Discussion

6.5.1 Potential environmental risks of WWTP effluents

The gene expression data, and functional and chemical analyses, clearly showed that fish exposed to WWTP effluents are different from the 'blank' control fish. Statistically significant gene expression changes were observed between every effluent exposed group of fish and the control group, where replicates were available (Figure 6-15). Blank and exposed fish showed different overall gene expression profiles (Figure 20C).

Particular biomarker genes, vitellogenins (Figure 6-17) and CYP1A (Figure 6-18) responded to effluent exposure. High expression of VTGs occurred in male fish from the Cuijk site, suggesting estrogenic endocrine disruption. Significant repression of VTGs occurred in female fish from particular sampling points in all three sites, suggesting the presence of anti-estrogens. Indeed, a mixture of both classes of compounds, varying between sampling positions, would be consistent with the data. Cytochrome P450 1A (CYP1A gene) was induced at Cuijk and Grou sampling sites, implying a response to PAH or PCB planar aromatic hydrocarbons.

The gene expression changes between the 'blank' controls and exposed fish cannot, however, all be assigned to effluent exposure effects. For example, the control sticklebacks were maintained on a different diet from the exposed fish and the body-weights and liver-weights of fish statistically significantly differed between groups (Figure 6-21 and Figure 6-22). These effects are difficult to isolate from the effects of effluents, as toxicants can affect growth, and hepatotoxicants can cause liver necrosis, reducing liver weights. Correlation and parametric analyses (Figure 6-23, Table 6-9) showed that although liver weight, length, weight and HSI were related to gene expression changes, they were not the most significant parameters in the experiment, and indeed liver weight (the strongest influence) was not related to the majority of genes differentially expressed between blank and exposed fish. However, this will be the subject of further analyses.

Functional enrichment analyses again showed that groups from all sites displayed changes in functionally related groups of genes in comparison with the 'blank' fish. Important responses identified included an induction of genes related to inflammation and immunity, and in some cases induction of apoptosis and blood coagulation. This could imply tissue damage. There was a notable decrease in expression of genes involved in mitosis. Pathways were identified whose component genes were significantly induced or repressed in effluent-exposed fish. These matched well with the functional groups of genes identified by GO analysis. Additionally the IPA results could inform on potential health outcomes, with the pathway 'hepatic cholestasis' (indicator for liver cancer) being identified as having its component genes induced in female fish.

The experimental technique of CTD enrichment analysis was applied, both to enhance biological-chemical interpretation of the results, and to provide an overview of the modes of action predicted by the gene expression changes. It is not necessarily the case that these particular chemical compounds are always themselves present in sufficient concentrations to drive gene expression responses, although this may be so in some situations. Instead each chemical represents a mode of action, which is reflected in the gene expression changes. Of particular note, and reflected in the functional analyses above, are the predicted presence of RXR and RAR ligands at most sites (22-hydroxycholesterol, ATRA, bexarotene). There is some evidence of oxidative stress response (ozone, paraquat). Chemotherapeutic drugs that inhibit mitosis are well-represented (resveratrol, fluorouracil, irinotecan, cytarabine), as are endocrine modulators including anti-androgen

(bicalutamide), ER modulators (raloxifene, 4-hydroxytamoxifen) and anti-estrogen (fulvestrant) as well as immune and inflammatory response inducers and repressors. Progesterone is represented at most sites. Ethinyl-estradiol is highly significant only at the Cuijk site, in common with the male VTG induction results shown above.

The passive sampler chemistry data showed that many important environmental toxicants were detected at the sampling sites. However, few of these exceeded the predicted no-effect concentrations (PNEC) when considered individually. Where comparison of CTD-predictions and chemical analyses was possible, gene expression responses characteristic of these chemicals were found in a number of cases (Figure 6-31A) but the match between chemicals and CTD was not good when considering individual sites and there were also chemicals present that were not identified by CTD (Figure 6-31B). This is not a surprising result as, in the main, these chemicals were below the PNEC, but the CTD analyses are likely to detect classes of chemicals that are bioavailable, bioconcentrated, and have additive effects with similar modes of action. Comparison of the ER-luc bioassay data with vitellogenin gene expression in males, and CTD prediction of ethinyl-estradiol was successful in identifying Cuijk position2 as the site most highly affected by estrogenic endocrine disruption in all cases. However, sites with lower ER-luc activities were not well correlated with VTG expression. One explanation for this might be the presence of anti-estrogens, as predicted by CTD analysis.

In the context of wastewater effluents, there were indications of effects of 'traditional' pollutants (PAHs, PCBs, heavy metals) and responses (oxidative stress) but the major responses were consistent with, but not necessarily due to, pharmaceutical products. The pharmaceuticals generally interact with particular biological pathways, either stimulating or repressing their actions, thus mimicking the effects of endogenous molecules (e.g. estradiol). Therefore in some cases what appear to be effects of pharmaceuticals, could instead be due to endogenous molecules. An obvious example is the induction of VTGs in female fish due to increases in estradiol during the breeding season. Therefore, whether the CTD predictions for pharmaceuticals (e.g. Table 14) reflect pharmaceutical exposure or endogenous or exogenous processes remains to be shown in each case. The exact aetiology of each response is likely to be complex. For example the induction of immune and inflammatory responses is apparent in effluent-exposed fish. This may be caused by exposure to organisms such as bacteria at higher levels in effluent than the controls, and is supported by the induction of genes responsive to lipopolysaccharide, alternatively this may be an indicator of response to tissue damage, such as fibrosis, caused by exposure to hepatotoxins. The responses may also be modulated by a number of immunosuppressive and anti-inflammatory pharmaceuticals.

However, some results are highly suggestive of exposure. One of the major responses seen at all sites, in contrast to control fish, was the reduction of expression of genes involved in mitosis. CTD analyses identified the chemotherapeutics resveratrol, fluorouracil, irinotecan and cytarabine as potential causes of this response. Some chemotherapeutic drugs have been shown to be persistent, and their environmental effects not yet been well-established (Johnson et al., 2008). The presence of anti-mitotic agents is therefore consistent between the gene expression and chemical data, and is also consistent with lower liver-weights in effluent exposed fish.

6.5.2 Reduction of environmental risks of WWTP effluents by the Waterharmonica

From this initial analysis of the gene expression data, the majority of responses to effluents appear to be preserved, and in some cases increased, between the four (or three for Grou) sampling positions throughout the wetlands (Figure 6-15). Although there are significant gene expression differences between the sampling positions at each site (Figure 6-16D,E,F), these generally result in the overall

gene expression profiles at the final sampling point differing more strongly from the controls (Figure 6-16B). If risks were reduced by the bioremediation, then one might expect gene expression in the 'position 4' samples to more closely resemble the controls. It is worth noting, however, that in the smaller-scale pilot project using fewer replicates of F0 fish (not F1) there was an apparent return towards the profile of the controls by Cuijk samples, but not by Grou (Figure 6-10D). Indeed when the genes that differ between position 1 and position 4 are examined (Figure 40), on average their expression is more similar in controls and site 1 than in controls and site 4. Since the impact of the third compartments at all constructed wetlands was negligible, the analysis was repeated on all genes that significantly changed in expression between positions 1 and 3. The results of this analysis (Figure 6-37) shows that both induced and repressed genes at Cuijk (only ♀) and Hapert returned towards control levels, while levels at Grou slightly diverged from controls, but remained close. This might indicate a weak bioremediation effect of the first two Waterharmonica compartments, the sedimentation ponds and helophyte fields. CTD analyses generally fail to show an overall diminution of response post-remediation (Figure 6-29).

There is evidence that the effects of the class of pollutants of major current concern, the estrogenic endocrine disrupters, are reduced by the Waterharmonica process. As seen in Figure 21, the site showing highest vitellogenin induction in male fish was the Cuijk WWTP. Male VTG levels at positions 2 and 3 were orders of magnitude above those of the control males. By position 4, however the VTG expression had returned towards the baseline level. This broadly agrees with the ER-luc bioassay data (Figure 6-32) where, at Cuijk data are high at positions 1 and 2, reduced by positions 3 and 4. This is also supported by the CTD genes predicted to respond to ethinyl-estradiol (Figure 6-32). This interpretation is complicated, however, by the potential presence of anti-estrogens.

6.5.3 Recommendations to optimise the wetlands for bioremediation

There was a beneficial effect on reducing responses to estrogenic endocrine disrupters, achieved at the Cuijk site after the helophyte (reed-bed) treatment. This is so far the clearest demonstration of bioremediation effectiveness in reducing gene expression responses that have been associated with environmental pollutants.

There were reports of occasional overflow or backwash of non-bioremediated effluents into sampling position 4 at some sites, which may explain the continuation of responses at these positions and should be avoided. One question that is unclear is to what extent pollutants are concentrated within the sediments in each bioremediation compartment, with continual flow-through of treated effluent. Also to what extent these may partition back into the surface water or be consumed and biomagnified via the biota, affecting predatory species. While the Waterharmonica has been shown to be effective in removing suspended particles from the water column, the future availability of pollutants, especially lipophilic contaminants, that are sedimented in this way must be considered.

6.6 Conclusions & recommendations

In conclusion, fish exposed to waste-water treatment plant effluents display many differences in gene expression from control fish. These can be identified as genes involved in important biological processes, both individually, and by functional and pathway membership. These analyses are as yet incomplete, and data integration between the different studies comprising the WIPE project is still at an early stage. Reed-beds at the Cuijk site have successfully reduced estrogenic endocrine disruption in males, but there is as yet little evidence that other pollutants are successfully removed, based upon associated gene expression responses. One major finding is the numbers of genes changing that are expected to be responsive to pharmaceuticals. While this is at present indicative, future investigation may benefit from a focus on chemical monitoring for these particular classes of compounds and on their laboratory-based exposure to fish with assessment of gene expression changes and fitness traits including survival, morphology and reproduction.

Additional Files

Supplementary Main 1 shows genes that were differentially expressed between groups of fish from the blank and effluent exposures, male and female fish are normalised separately. This is best viewed using MS-Excel.

Supplementary Main 2 shows CTD chemical associations that were significantly associated with differentially expressed genes between the blank and effluent-exposed groups. This is best viewed using MS-Excel.

Acknowledgements

This work was supported by the WIPE grant, funded by the Dutch Ministry of Transport, Public Works and Water Management. The WIPE project was conceived of by Edwin Foekema (IMARES) and designed together with Ron van der Oost (Waternet), Tinka Murk (Wageningen University) and Erwin Roex (Deltares). Fish exposures and sampling were conducted by Ron van der Oost and Edwin Foekema. RNA preparations were carried out at the University of Wageningen (Hilde van Pelt). Microarray experiments were carried out with Lorraine Wallace at The University of Birmingham Functional Genomics Laboratory.

6.7 References

Agilent EArray Website <https://earray.chem.agilent.com/earray/>

Agilent microarray user manual:

http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G414090040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf

Arukwe, A. and Goksoyr, A. (2003) Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol.* **2**, 4

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R.Statist.Soc.B.* **57**, 289-300

Biomart: <http://www.ensembl.org/biomart/martview/e8f8cc5d8c6005f9e4eefa85f037b585>

Davis, A. P., Murphy, C. G., Saraceni-Richards, C. A., Rosenstein, M. C., Wiegers, T. C. and Mattingly, C. J. (2009) Comparative Toxicogenomics Database: a knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks. *Nucleic Acids Res.* **37**, D786-792

Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, P3

Depledge, M.H. and M.C. Fossi, 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Ecotoxicology* 3: 161-172.

Fent, K., Weston, A. A. and Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* **76**, 122-159

Genbank Unigene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>

Geoghegan, F., Katsiadaki, I., Williams, T.D. and Chipman, J.K. (2008) A cDNA Microarray for the three spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., and analysis of the interactive effects of oestradiol and dibenzanthracene exposures. *J. Fish Biol.* **72**, 2133-2153.

Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talon, M., Dopazo, J. and Conesa, A. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3420-3435

Johnson, A. C., Jürgens, M. D., Williams, R. J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A. and Sumpter, J. P. (2008) Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology.* **348**, 167-175

Kampf, R., Claassen, T. H. L., Dokkum, v. H. P., Foekema, E. M., and Graansma, J. (2005). Increasing the natural values of treated wastewater. In 'Ecological Engineering: Bridging between ecology and civil engineering'. (Ed. H. D. Bohemen.) pp. 90-97. (Aeneas, Technical Publishers: Delft.)

Katsiadaki, I., Scott, A.P., Mayer, I., (2002) The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Mar Environ Res* **54**, 725-728.

Katsiadaki, I., Sanders, M., Sebire, M., Nagae, M., Soyano, K. and Scott, A. P. (2007) Three-spined stickleback: an emerging model in environmental endocrine disruption. *Environ Sci.* **14**, 263-283

Katsiadaki, I., Williams, T.D., Ball, J.S., Bean, T.P., Sanders, M.B., Wu, H., Santos, E.M., Brown, M.M., Baker, P., Ortega, F., Falciani, F., Craft, J.A., Tyler, C.R., Viant, M.R., Chipman, J.K., (2010) Hepatic

- transcriptomic and metabolomic responses in the Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to ethinyl-estradiol. *Aquat Toxicol* **97**, 174-187.
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M. and Flick, R. W. (2007) Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 8897-8901
- Leder, E.H., Cano, J.M., Leinonen, T., O'Hara, R.B., Nikinmaa, M., Primmer, C.R., Merila, J., (2010) Female-biased expression on the X chromosome as a key step in sex chromosome evolution in threespine sticklebacks. *Mol Biol Evol* **27**, 1495-1503.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. and Oberdorster, J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* **113**, 823-839
- Peichel, C.L., Ross, J.A., Matson, C.K., Dickson, M., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Mori, S., Schluter, D., Kingsley, D.M., (2004). The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr Biol* **14**, 1416-1424
- Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* **132**, 365-386
- Santos, E.M., Ball, J.S., Williams, T.D., Wu, H., Ortega, F., van Aerle, R., Katsiadaki, I., Falciani, F., Viant, M.R., Chipman, J.K., Tyler, C.R., (2010) Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. *Environ Sci Technol* **44**, 820-826.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. and Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* **270**, 467-470
- Saeed, A. I., Bhagabati, N. K., Braisted, J. C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E. A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J. A. and Quackenbush, J. (2006) TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol.* **411**, 134-193
- Sebire, M., Katsiadaki, I., Taylor, N. G., Maack, G. and Tyler, C. R. (2011) Short-term exposure to a treated sewage effluent alters reproductive behaviour in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat Toxicol.* **105**, 78-88
- Spurgeon, D. J., Jones, O. A., Dorne, J. L., Svendsen, C., Swain, S. and Sturzenbaum, S. R. (2010) Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci Total Environ.* **408**, 3725-3734
- Stickleback Genome Sequence. http://www.ensembl.org/Gasterosteus_aculeatus/Info/Index
- Sumpter, J. P. and Jobling, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect.* **103 Suppl 7**, 173-178
- Van Aggelen, G., Ankley, G. T., Baldwin, W. S., Bearden, D. W., Benson, W. H., Chipman, J. K., Collette, T. W., Craft, J. A., Denslow, N. D., Embry, M. R., Falciani, F., George, S. G., Helbing, C. C., Hoekstra, P. F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P. G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E. J., Santos, E. M., Skirrow, R. C., Snape, J. R., Tyler, C. R., Versteeg, D., Viant, M. R., Volz, D. C., Williams, T. D. and Yu, L. (2010) Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ Health Perspect.* **118**, 1-5
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **13**, 57-149
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* **10**, 57-63

Waterharmonica Project Pages. www.waterharmonica.nl

Williams, T.D., Wu, H., Santos, E.M., Ball, J., Katsiadaki, I., Brown, M.M., Baker, P., Ortega, F., Falciani, F., Craft, J.A., Tyler, C.R., Chipman, J.K., Viant, M.R. (2009) Hepatic transcriptomic and metabolomic responses in the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to environmentally relevant concentrations of dibenzanthracene. *Environ Sci Technol* **43**, 6341-6348

Hrydziuszko, O., Lyons, B.P., Stentiford, G.D., Herbert, M.J., Abraham, K.J., Katsiadaki, I., Leaver, M.J., Taggart, J.B., George, S.G., Viant, M.R., Chipman, J.K. and Falciani, F. (2011) [Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: A network biology approach](#) *PLOS Computational Biology* **7**: e1002126.

7 Factors determining the disinfection capacity of constructed wetlands

Bram T.M. Mulling	University of Amsterdam; Institute of Biodiversity and Ecosystem Dynamics ¹
Yolanda Dullemont	Waternet, Department of Research and Engineering, Water Technology Team
Daan Mes	University of Amsterdam; Institute of Biodiversity and Ecosystem Dynamics ¹
Anne de Valença	University of Amsterdam; Institute of Biodiversity and Ecosystem Dynamics ¹
Ron van der Oost	Waternet, Department of Research and Engineering, Water Technology Team

¹ University of Amsterdam (UvA); Institute of Biodiversity and Ecosystem Dynamics, department of Aquatic Ecosystems and Ecotoxicology (IBED-AEE)

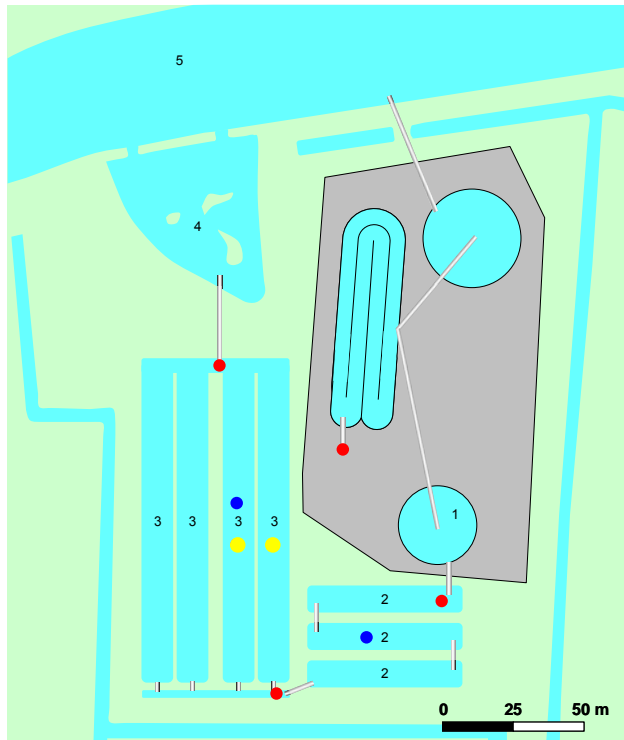


Dutch summary

1. Beschrijving van de metingen

In dit werkpakket is de concentratie ziekteverwekkers in het effluent van een waterzuivering geanalyseerd en is bestudeerd in hoeverre de hoeveelheid ziekteverwekkers tijdens het verblijf in een zuiveringsmoeras verminderd. Tevens wordt getracht de belangrijkste processen voor verwijdering van ziekteverwekkers in verschillende compartimenten van het zuiveringmoeras (vooral bezinkingsvijvers en rietvelden) te identificeren. Hiervoor zijn er maandelijkse metingen verricht in het zuiveringsmoeras in Grou, Friesland, waarbij de hoeveelheid van drie verschillende indicatoren van ziekteverwekkers is bepaald in het effluent van de waterzuivering, het water tussen de bezinkingsvijvers en de rietvelden en het water aan het einde van de rietvelden (Figuur 7-1). De bacteriën *Escherichia coli*, *Enterococci* en *Clostridium perfringens*, worden als indicatorsoorten gebruikt om de hygiënische waterkwaliteit te bepalen van afvalwater tot drinkwater. Uit de bepalingen van deze bacteriën op cruciale locaties in het zuiveringsmoeras is de potentiële verwijdering van ziekteverwekkers in het RWZI effluent tijdens het verblijf in het zuiveringsmoeras bepaald. Met een innovatieve analyse met bacterioiden en bacteriofagen, die een schatting geeft voor de verhouding tussen bacteriën van humane en de dierlijke herkomst, is gekeken naar mogelijke toevoeging van bacteriën tijdens het verblijf in zuiveringsmoerassen door watervogels en andere dieren.

Om te bekijken of zoöplankton, zoals watervlooien, dat van nature aanwezig is in het zuiveringsmoeras een bijdrage leveren aan de verwijdering van ziekteverwekkers, zijn monsters genomen binnen de verschillende compartimenten. In deze monsters zijn het aantal individuen per geslacht/soort bepaald doormiddel van een microscopische telling. Omdat de rietstengels in de rietvelden een grote oppervlakte:water ratio hebben, is het mogelijk dat naast vrij in het water levend zoöplankton ook epifauna een bijdrage kan leveren aan de verwijdering van ziekteverwekkers. Epifauna zijn dezelfde type organismen als zoöplankton, maar leven vastgehecht aan een solide ondergrond zoals een rietstengel. Vanuit deze tellingen zijn met behulp van literatuurgegevens graassnelheden bepaald. Deze graassnelheden geven aan hoeveel zwevende deeltjes (inclusief ziekteverwekkers) er per tijdeenheid uit het water kunnen worden opgegeten door zoöplankton en epifauna.



Figuur 7-1 Een overzicht van de bemonsterde locaties in het zuiveringsmoeras in Grou, Friesland, bestaande uit de toevoerende waterzuivering (1), bezinkingsvijvers (2), rietsloten (3), visvijver (4) en ontvangende rivier de Kromme Grou (5). De rode stippen geven aan waar concentraties van ziekteverwekkers zijn bepaald, de blauwe stippen waar zooplankton aantallen zijn bepaald en de gele stippen waar epifauna aantallen zijn bepaald.

Naast deze monitoring campagne zijn er ook laboratoriumexperimenten uitgevoerd waarbij effluent van de waterzuivering is geïncubeerd onder gecontroleerde condities. Gedurende deze incubaties werden dagelijks monsters genomen om de concentratie *E.coli* over de tijd te kunnen monitoren. Door deze monsters met verschillende filtraties voor te behandelen en onder verschillende condities te incuberen werd het mogelijk de effecten van verscheidene factoren op de verwijdering van *E.coli* te bepalen:

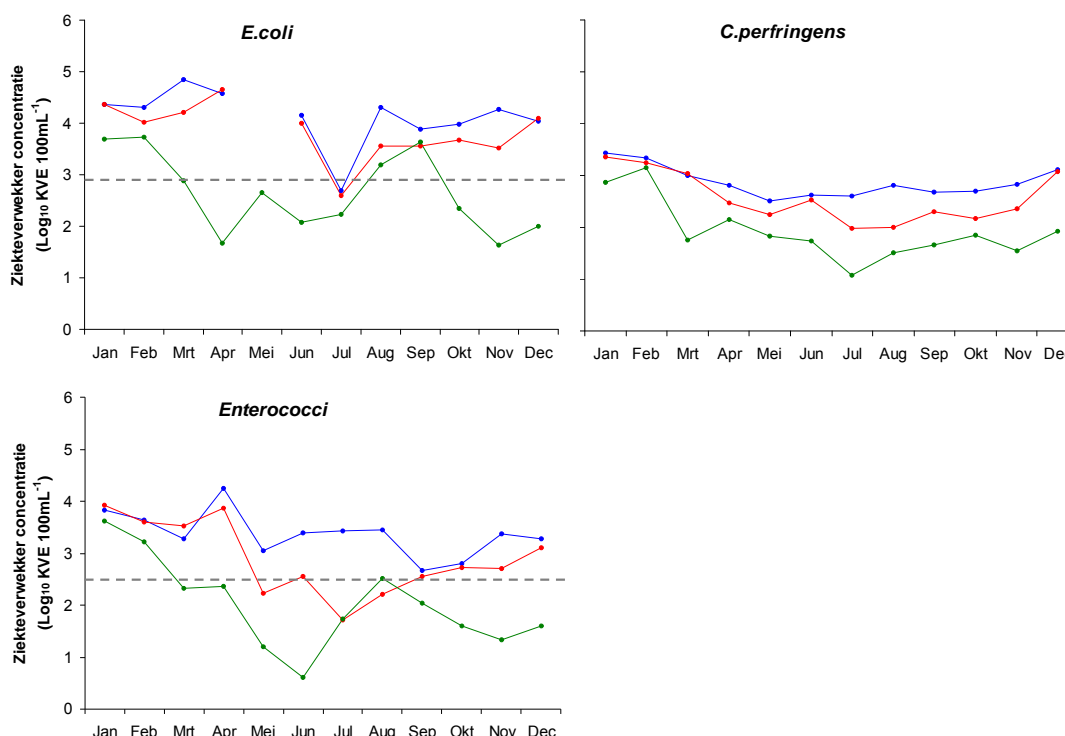
- Klein zoöplankton (tussen de 5 en 25µm groot)
- Groot zoöplankton (groter dan 25µm)
- Natuurlijke sterfte
- Temperatuur
- Zuurstof gehalte
- UV-straling

2. Belang van de metingen

Door deze monitoring en experimenten moet duidelijk worden of de hoeveelheden ziekteverwekkers die aanwezig zijn in het effluent van rioolwaterzuiveringen een gezondheidsrisico kunnen vormen als dit effluent direct op het oppervlakte water geloosd wordt en of zuiveringsmoerassen deze mogelijke gezondheidsrisico's kunnen verminderen of voorkomen. Indien dit inderdaad het geval blijkt te zijn, is het ook belangrijk dat er in dit onderzoek duidelijk wordt hoe deze desinfectie tot stand komt om eventuele mogelijkheden tot verbetering aan te geven. Om dit te realiseren is gekeken naar de bijdrage van de verschillende compartimenten van het zuiveringsmoeras en welke processen in deze compartimenten de verwijderingsbijdrage bepalen.

3. Het (milieu)risico van de rwzi-effluenten

Uit de resultaten blijkt dat de gemiddelde hoeveelheid *E.coli* in het effluent van de waterzuiving in Grou 4.33 log₁₀ kolonie vormende eenheden per 100 milliliter bedroeg, voor *Enterococci* lag dit gemiddelde op 3.57 en voor *C.perfringens* op 2.97 (Figuur 7-2, blauwe lijnen). Voor alle drie ziekteverwekkers zijn deze waarden normaal voor waterzuiveringseffluent. De waarden voor *E.coli* en *Enterococci* zijn echter wel beide ruim boven de zwemwaternorm (*C.perfringens* is niet opgenomen in de zwemwater norm) (EU 2006). Waterzuiveringen hoeven niet aan deze norm te voldoen tijdens het lozen van effluent, maar dit geeft wel aan dat er mogelijke gezondheidsrisico's zijn als het RWZI effluent direct op oppervlakte water wordt geloosd. In Hapert en Cuijk hebben minder bemonsteringen plaatsgevonden, maar de hoeveelheden bacteriën zijn vergelijkbaar met de waarden in Grou en ook daar liggen de hoeveelheden *E.coli* en *Enterococci* boven de zwemwaternorm.



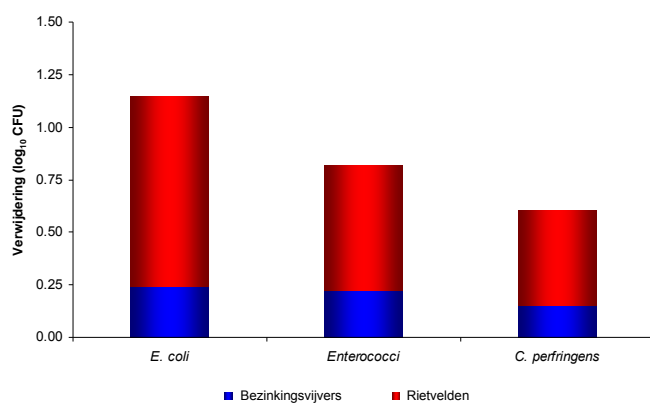
Figuur 7-2 De kolonie vormende eenheden (KVE) *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* per 100mL in het effluent van RWZI Grou (blauw), effluent van de sedimentatie vijvers (rood) en effluent van de rietvelden (groen) gedurende 2010. De stippellijnen vertegenwoordigen de zwemwaternorm voor *E.coli* en *Enterococci*.

4. Vermindering van het milieurisico van het RWZI effluent door het zuiveringsmoeras

De metingen op de andere bemonsteringspunten laten zien dat de hoeveelheid ziekteverwekkers, *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens*, tijdens het verblijf in het zuiveringsmoeras (Grou) afnemen (Figuur 2; verschil tussen de blauwe, rode en groene lijnen). In het effluent van het zuiveringsmoeras waren de *E.coli* concentraties acht van de twaalf maanden lager dan de zwemwaternorm, met overschrijdingen in de winter (januari en februari) en aan het einde van de zomer (augustus en september). Voor *Enterococci* werd de grens twee maal overschreden in het zuiveringsmoeras effluent in januari en februari. Ook bij *Enterococci* was een piek te zien aan het einde van de zomer, maar deze bleef wel onder de norm. De gemiddelde verwijdering van *C.perfringens* was laag in Hapert (0.20 log₁₀ KVE 100mL⁻¹) in vergelijking met Cuijk (0.99) en Grou (1.16). Hapert had een lagere verwijdering van *Enterococci* (0.26 log₁₀ KVE 100mL⁻¹) in vergelijking met Grou in dezelfde periode (0.88), in Cuijk werd zelfs een toename van *Enterococci* (-1.45) waargenomen. Vanwege het lage aantal metingen in zowel Hapert als Cuijk en gelet op de variatie die bij de metingen van Grou is

waargenomen, moeten de waarnemingen in Hapert en Cuijk met grote voorzichtigheid worden geïnterpreteerd. Op basis van de metingen in Grou is echter wel duidelijk dat zuiveringsmoerassen een sterke bijdrage kunnen leveren aan de vermindering van gezondheidsrisico's die effluent van waterzuiveringen kunnen vormen.

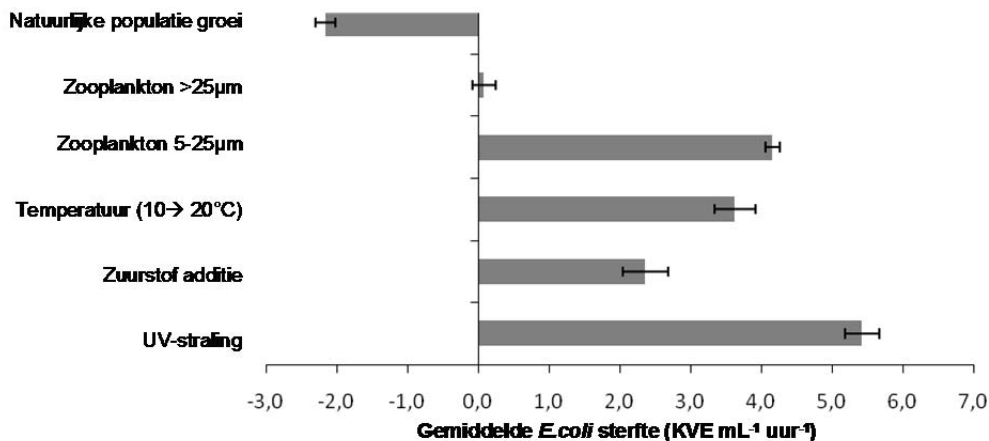
De verwijdering van ziekte verwekkers is in zowel de bezinkingsvijvers als de rietvelden waargenomen. De verwijdering van *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* is echter sterker in de rietvelden dan in de bezinkingsvijver. Dit verschil in verwijdering is waarschijnlijk gedeeltelijk te verklaren doordat de verblijftijd in de rietvelden 36% langer is dan in de bezinkingsvijvers. Het percentage in gemiddelde logverwijdering van *Ecoli*, *Enterococci* en *C.perfringens* in de rietvelden is respectievelijk 79%, 73% en 75%. Dit suggereert dat verwijderingsprocessen effectiever zijn in de rietvelden en/of dat er andere processen in de rietvelden plaats vinden ten opzicht van de bezinkingsvijvers. Ook in de moerassen van Hapert en Cuijk vinden de grootste verandering in de hoeveelheden bacteriën plaats in de rietvelden. De gemiddelde verwijdering van de drie indicatoren van ziekteverwekkers zijn weergegeven in Figuur 7-3.



Figuur 7-3 Gemiddelde verwijdering van *E.coli*, *Enterococci* en *C.perfringens* na verblijf in de sedimentatie vijvers (blauw) en de rietvelden (rood) van 12 maandelijkse bemonsteringen in 2010.

In de bezinkingsvijvers is een sterke bezinking van zwevende stof waargenomen. De sedimentatie van zwevende stof was het sterkst in de eerste bezinkingsvijver en nam af in de tweede en derde bezinkingsvijver. De hoeveelheid *E.coli* nam in de sedimentatie vallen af tussen de eerste en derde bezinkingsvijver, wat vergelijkbaar is met de eerder genoemde verwijdering van *E.coli* (bezinkingsvijvers). De hoeveelheid *E.coli* in de sedimentatie vallen nam echter niet toe in de tijd. Dit wijst erop dat sedimentatie niet of weinig bijdroeg aan de verwijdering van *E.coli* in de bezinkingsvijvers. Daarnaast wijst het erop dat *E.coli* in het effluent van waterzuiveringen waarschijnlijk voornamelijk voorkomt als losse cellen, wat werd bevestigd met een filtratie experiment.

De begrazing van individuele soorten zooplankton correleerde sterk met de verwijdering van bacteriën. Voornamelijk de aanwezigheid van kleine (<30µm) trilhaardiertjes en amoeben lijken samen te hangen met de verwijdering van ziekteverwekkers in de bezinkingsvijvers. Dit werd ook waargenomen in de laboratoriumexperimenten (Figuur 4) waarin de verwijdering van *E.coli* voornamelijk werd veroorzaakt door aanwezigheid van kleine zooplankton soorten (<25µm). In de rietvelden lijkt deze samenhang tussen de aanwezigheid van zooplankton en de verwijdering van ziekteverwekkers relatief af. Dit kan worden veroorzaakt doordat andere processen zoals sedimentatie en het invangen door biofilm mogelijk invloed hebben op de verwijdering van ziekteverwekkers. Uit de laboratoriumexperimenten bleek dat *E.coli* in het effluent van een waterzuivering zonder begrazing door zooplankton en onder goede condities (10°C, geen extra zuurstof en geen UV-straling) in staat is om zich te vermenigvuldigen (Figuur 7-4).



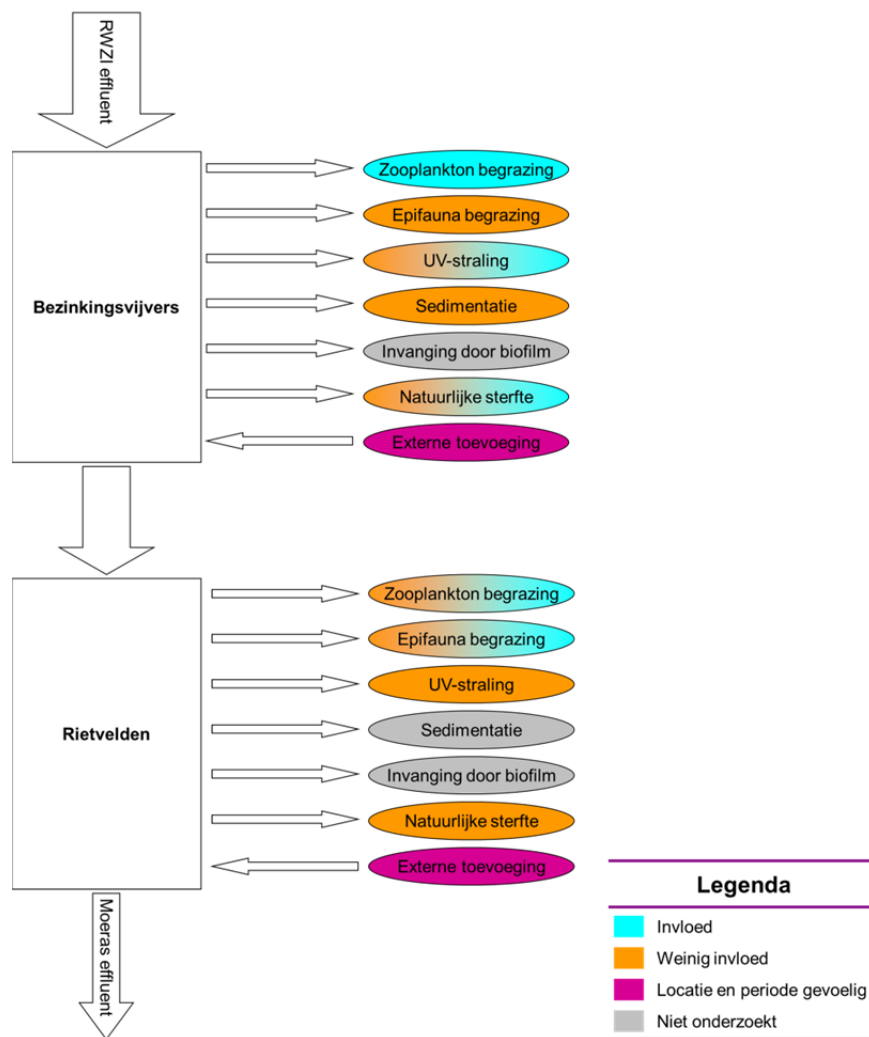
Figuur 7-4 De invloed van verschillende factoren op de verwijdering van *E.coli*.

De intensiteit van de UV-straling in het laboratoriumexperiment is lager dan de instraling van de zon op het oppervlakte water. Hoewel de UV-straling in het laboratoriumexperiment een groot effect vertoonde op de verwijdering van *E.coli* is dit in de bezinkingsvijvers waarschijnlijk niet het geval. Dit wordt veroorzaakt door het verschil in waterdiepte tussen de bezinkingsvijvers en de laboratoriumincubaties. Doordat de hoeveelheid opgeloste organische koolstof (DOC) in het effluent van de waterzuivering tussen de 10 en 20 mg L⁻¹ ligt, wordt UV-straling door ca.20 cm water geabsorbeerd. Doordat de bezinkingsvijvers veel dieper zijn (± 1.6 m) zal UV-straling waarschijnlijk weinig bijdragen aan de verwijdering van ziekteverwekkers in de bezinkingsvijvers. In de rietvelden zal hetzelfde het geval zijn, doordat het wateroppervlak daar grote delen van het jaar wordt overschaduwd door riet.

De laboratoriumexperimenten suggereerden dat het verhogen van de zuurstof concentratie positieve effecten heeft op de verwijdering van ziekteverwekkers, wat in overeenstemming is met de wetenschappelijke literatuur. Het zuurstofgehalte in Grou was erg laag door het gehele zuiveringsmoeras heen, waardoor de bijdrage van zuurstof op de verwijdering van ziekteverwekkers waarschijnlijk klein is geweest.

Omdat er ook bacteriën in het moeras kunnen komen via uitwerpselen van dieren (vooral watervogels), is getracht om met een innovatieve techniek de herkomst van de bacteriën te achterhalen. Uit de metingen van de bacteriofagen (virussen) en bacteroïdes in het water, kan een indruk worden gekregen over het aandeel humane bacteriën. Hierbij bleek dat watervogels waarschijnlijk ook ziekteverwekkers toevoegen aan de zuiveringsmoerassen. De sterkte van deze mogelijke toevoeging leek sterk locatie afhankelijk, waarbij Hapert en Cuijk een veel sterkere toevoeging leken te krijgen dan Grou. Deze waarnemingen zijn echter gebaseerd op een klein aantal metingen.

In Figuur 7-5 is een schematisch overzicht gegeven van de processen die vanuit dit onderzoek mogelijk belangrijk zijn bij de verwijdering van ziekteverwekkers in zuiveringsmoerassen.



Figuur 7-5 De bijdrage van verschillende factoren op de verwijdering van ziekteverwekkers in de bezinkingsvijvers en de rietvelden, waarbij factoren met invloed (blauw), factoren met weinig invloed (oranje) op de verwijdering van ziekteverwekkers, factoren die erg variabel zijn in tijd en locatie (paars) en factoren waarvan de bijdrage niet onderzocht is (grijs).

5. Aanbevelingen ter optimalisering van het zuiveringsmoeras

De zuiveringsmoerassen hebben een duidelijk positief effect op de hygiënische waterkwaliteit van RWZI-effluent. Om de verwijdering van ziekteverwekkers door zuiveringmoerassen te verbeteren en/of te optimaliseren kunnen uit dit onderzoek verschillende aanbevelingen worden gedaan:

- Het verhogen van de verblijftijd en dan voornamelijk in de rietvelden. Dit zorgt ervoor dat de factoren die bijdragen aan de verwijdering van ziekteverwekkers langer invloed uitoefenen en daardoor een hogere verwijdering kunnen veroorzaken. Het verhogen van de verblijftijd kan worden gerealiseerd door zuiveringsmoerassen groter te maken en/of door de stroomsnelheid te verlagen.
- Het verhogen van de zuurstof concentratie. Het verhogen van de zuurstof concentratie blijkt de eliminatie van anaerobe ziekteverwekkers te bevorderen. Dit kan komen door de directe (toxische) effecten van zuurstof op bacteriën of door het verhogen van de activiteit van zooplankton. Het verhogen van de zuurstof concentratie kan worden gerealiseerd door mechanistische beluchting (waarbij rekening moet worden gehouden met het voorkomen van aerosolvorming), het inbouwen van cascades in de zuiveringsmoerassen of door het toevoegen van een compartiment met ondergedoken waterplanten. Doordat het verwijderen van stikstof

een anaeroob proces is kan het verhogen van de zuurstof concentratie negatieve effecten hebben op de stikstof verwijdering in de rietvelden. Het verhogen van de zuurstof concentratie zal dus pas na een eerste passage van rietvelden moeten worden uitgevoerd.

- Het benutten van UV-straling. De effecten van UV-straling zouden kunnen worden verhoogd door het zeer sterk verlagen van DOC gehaltes in waterzuiveringseffluent ($<2 \text{ mg L}^{-1}$), door ondiepe gedeeltes toe te voegen aan het zuiveringsmoeras ($<30\text{cm}$ diep) of cascades toe te voegen die op het invallende zonlicht gericht zijn. Omdat UV-straling van de zon een niet te reguleren externe factor is, kan deze geen constante bijdrage leveren aan verwijdering van ziekteverwekkers.
- Verhogen van de volume:oppervlakte verhouding in de zuiveringsmoerassen. Dit zal de interactie tussen waterzuiveringseffluent en biofilm en epifauna bevorderen. Dit kan worden bereikt door de rietvelden groter te maken of door het inbouwen van kunstmatige honingraat-achtige constructies loodrecht op de stroomrichting, bijvoorbeeld met borstelmetaal (zoals microvilli in het celmembran van darmepitheel).

Veel van de hierboven genoemde aanbevelingen beogen de toevoeging van andere compartimenten aan het zuiveringsmoeras en het veranderen van de wateromstandigheden. Verschillende compartimenten zorgen voor variatie in factoren die belangrijk zijn voor de verwijdering van ziekteverwekkers uit RWZI-effluent. De verwijdering van ziekteverwekkers zal samenhangen met de diversiteit aan compartimenten in het moeras en de verblijftijd van het RWZI-effluent in het zuiveringsmoeras.

7.1 Introduction on pathogen removal

The removal of pathogens is one of the positive effects of constructed wetlands on wastewater treatment plant effluent quality (Diaz *et al.*; Schreijer *et al.* 1997; Decamp & Warren 1998; Quinonez-Diaz *et al.* 2001; Arias *et al.* 2003; Kampf 2003; Karim *et al.* 2004; Toet *et al.* 2005; Knox *et al.* 2008; Molleda *et al.* 2008; Reinoso *et al.* 2008; Boutilier *et al.* 2009), which is not sufficiently studied to formulate optimal design guidelines. During retention of treated wastewater in a constructed wetland, several processes are affecting the concentration of pathogens (Decamp & Warren 1998; Brookes *et al.* 2004; Chabaud *et al.* 2006; Boutilier *et al.* 2009). Sedimentation, natural mortality, grazing, biofilm trapping and UV-disinfection are processes which reduce the concentration of pathogens in constructed wetlands. Defecation by higher organism like waterfowl, resuspension of sedimentated pathogens and natural growth are processes contribution to addition of pathogens in constructed wetlands. In this study we aim to identify and quantify the driving processes that influence the removal of pathogens in each functional part of a constructed wetland (Figure 7-1). The study consisted of a twelve month monitoring program of pathogen concentrations in a fully operational constructed wetland and laboratory experiments. The main focus of this research was concentrated on the removal effect of zooplankton and epifauna of indicator pathogens.

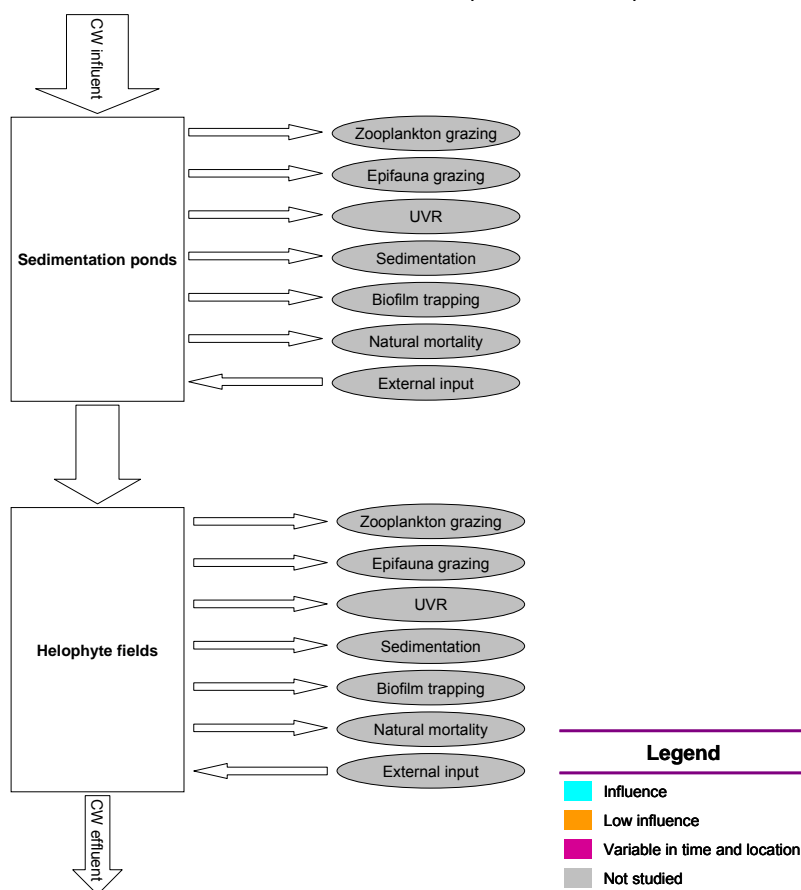


Figure 7-1 Schematic representation of the flow of WWTP effluent through a constructed wetland, consisting of sedimentation ponds and helophyte fields, and an indication of the influence of individual processes on the disinfection of pathogen.

7.2 Principle of applied measuring techniques

This study consists of two different types of research. The first part is a field monitoring campaign in which we monitored the disinfection capacity of a constructed wetland by determining the concentration of several indicator pathogens along the flow of WWTP effluent through the constructed wetland. During this monitoring campaign the abundance and composition of zooplankton and epifauna was also determined to study possible effects of grazing on the disinfection capacity. The second part is a set of laboratory experiments, to ascertain the effects of individual processes on the disinfection capacity.

7.2.1 Field monitoring

Samples were taken at the inflow and outflow of the major compartments of the constructed wetlands and stored for further analysis including:

- Suspended particles
 - o This method determines the concentration of suspended particles in the water by filtering a known volume of water over a glass fibre filter after which it is completely dried in an oven. By weighing the dried filter and subtracting the weight of the filter before filtration the amount of suspended particles can be calculated.
- Indicator pathogens
 - o All indicator pathogens (*E.coli*, *Enterococci* and *C.perfringens*) were determined by culturing methods. A known amount of water is filtered over a membrane filter, which is sequentially placed on a specific medium and cultivated for a period of time. Both the media and culturing conditions are specifically chosen to optimize the growth of the indicator pathogens, by suppressing the growth of other bacteria. After the incubation period the amount pathogen colonies grown on the membrane filter is considered to equal the pathogens concentration in the original known amount of water.
- Bacteriophages
 - o The concentration of bacteriophages (phages that infect bacteriodes indigenous to the intestines of warm-blooded animal and humans) was determined by infection experiments. In these experiments a certain amount of water was added to a plate with bacteriodes, after a culturing period the amount of plaque can be counted, which are considered to equal the Bacteriophages concentration in the original known amount of water. Two types of bacteriophages were determined, the first infects bacteriodes originating from the intestines of most warm-blooded organisms, the second type of Bacteriophages only infect bacteriodes originating from human intestines. In addition, a polymerase chain reaction (PCR) technique was used to determine bacterioid levels. PCR is a scientific technique in molecular biology to amplify a single piece of DNA across several orders of magnitude, generating thousands to millions of copies of a particular DNA sequence.
- Grazing by zooplankton
 - o Zooplankton and epifauna abundance was determined by manually counting the numbers of individual zooplankton and epifauna genera/species using a microscope. By multiplying the abundance of species with species specific grazing rates (= amount of particles a species ingests in a known time period), the grazing rate of (individual) zooplankton and epifauna populations could be calculated.
- Sedimentation
 - o The amount of particles and pathogens that sedimentate was determined using sedimentation traps. These consisted of tubes (one end closed, one end open) that were placed underwater, retaining anything that sedimentated into the tube during a certain period of time. After this time period the traps were collected and the content was

analysed for suspended particles and *E.coli* concentration using the above described methods. By dividing the concentrations from these analyses by the time period they were submersed, the sedimentation rates were calculated.

7.2.2 Laboratory experiments

WWTP effluent samples were incubated in a laboratory. To determine the effect of different factors influencing *E.coli* concentrations several different pre-treatments and incubation conditions were used. The incubations were maintained for four days and sub-samples were taken every 24 hours. The *E.coli* concentration was determined from these daily subsamples by a culturing method similar to the previously mentioned method (indicator pathogens).

7.3 Materials & method

7.3.1 Field monitoring

For this research three constructed wetlands, Hapert, Land van Cuijk and Grou (the Netherlands), were studied for the removal of indicator pathogens *E.coli*, *Enterococci* and *Clostridium perfringens* and the driving factors affecting this removal. All three constructed wetlands are surface-flow wetlands consisting of sedimentation ponds, helophyte fields and an ecological connection area (different compartments are connected in series). The constructed wetland in Grou was chosen for a detailed monitoring campaign with monthly sampling during 2010. The constructed wetlands in Hapert and Cuijk were sampled twice in order to be able to compare the three constructed wetlands.

7.3.2 Study areas and sampling

The constructed wetland (CW) at Grou, the Netherlands was chosen as the main area of study. Effluent from the wastewater treatment plant (WWTP) is pumped from the settling tank (Figure 7-2; 1) at a constant rate of $48 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ into the sedimentations ponds (Figure 7-2; 2). These consist of three in series connected ponds with a total retention time of 17.9 hours. The effluent of the sedimentation ponds flows in four parallel connected helophyte fields (Figure 7-2; 3) into a collection pond. From the collection pond water is pumped into the ecological connection pond designed for fish spawning (Figure 7-2; 4) which is in open connection with the surface water (Figure 7-2; 5). Samples are taken monthly from January till December 2010. Samples were taken monthly between 09.00 and 10.00 am to reduce the effect of daily fluctuations (Decamp *et al.* 2000). To monitor the removal of suspended particles and indicator pathogens samples were taken at the in- and outflow of each compartment (WWTP, sedimentation ponds and helophyte fields; Figure 7-2; red dots). In the sedimentation ponds and helophyte fields samples were taken for zooplankton and phytoplankton analyses (Figure 7-2; blue dots) and for epifauna in the sedimentation ponds (Figure 7-2; yellow dots). Samples were also taken at the outflow of the ecological connection pond. The double connection between the ecological connection pond and the river caused inflow of river water into the ecological connection pond. For this reason the results of these analyses were not included in this report. Sampling was conducted by "Het Waterlaboratorium" (HWL), Haarlem, the Netherlands. Between sampling and further analysis all samples were stored at 4 °C.

The same measurements were also conducted in two constructed wetlands in Cuijk and Hapert, the Netherlands. Both locations have a similar construction as the CW in Grou; surface flow wetlands, consisting of a sedimentation pond(s) and helophyte fields. The retention times of both Cuijk and Hapert are not determined and are probably quite different. Samples were taken to make a

comparison between all three CW's. Grou was subjected to a detailed study. Cuijk and Hapert were both sampled only twice (August and September). To compare the three CW's, only data of the months August and September were used for the CW in Grou.

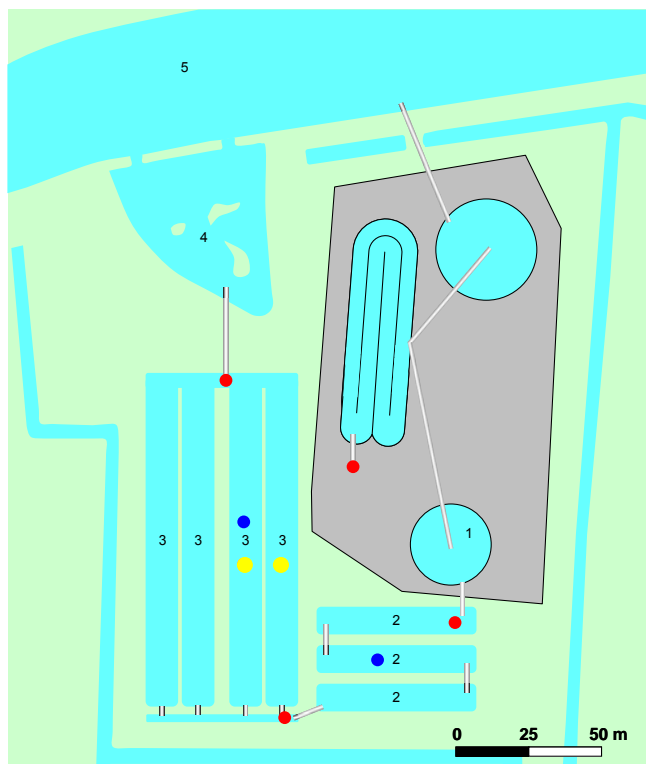


Figure 7-2 Overview of study area in Grou, the Netherlands, consisting of 1) the wastewater treatment plant, 2) sedimentation ponds, 3) helophyte fields, 4) ecological connection pond and 5) surface water (river "de Kromme grou"). At this study site samples were taken for suspended particles and microbial analysis (red dots) zooplankton, (blue dots) and epifauna (yellow dots).

7.3.3 Analyses

All analyses were conducted by "Het Waterlaboratorium" (HWL), Haarlem, the Netherlands.

Suspended particles

The concentration of suspended particles was determined by filtration of the samples using glass fibre filters. After drying the filters at $105 \pm 2^\circ\text{C}$ the weight and the concentration of suspended particles were calculated. This analysis was performed according to (NEN-EN-872 2005).

To determine the total count of suspended particles between 2 and 500 μm , water was analysed with a PAMAS waterviewer particle counter (PAMAS GmbH; Stuttgart in Germany; sensor: HCB-LD-100). These analyses have been performed in a separate experiment and were not part of the monthly sampling campaign.

Sedimentation traps

Sedimentation traps were placed at twelve locations in the sedimentation ponds (5, 4 and 3 locations in first, second and third sedimentation pond respectively). At each location 8 sedimentation traps (Figure 7-3) were placed on top of the sediment. After 29, 49, 93 and 168 hours two sedimentation traps (total volume of 1.3L) from each of the twelve locations were recovered, the content was well mixed and transferred in glass 2L bottles. From these bottles samples were taken to determine the

concentration of suspended particles and *E.coli*. The method for determining these concentrations was performed as in the previous (suspended particles) and next (*E.coli*) paragraph.

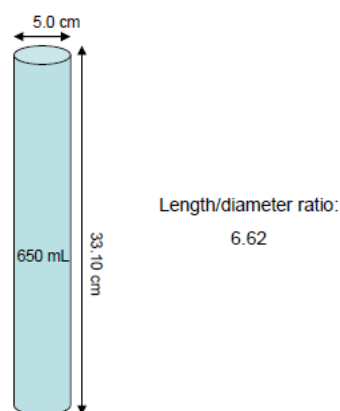


Figure 7-3 Schematic representation of one sedimentation trap.

Indicator pathogens

E.coli concentrations were determined by filtrating the samples over 0.45 µm membrane filter (Cellulose Nitrate; Ø 47 mm). Filters were incubated consecutively on DP-Medium at 36 ± 2°C for 4-5 hours and 44 ± 0.5°C for 19-20 hours. After incubation filters *E.coli* colonies were stained with James-reagent and counted. This analyses was performed according to (NEN-EN-ISO-9308-1 2000).

Concentrations of *Enterococci* were analysed by membrane filtration. Samples were filtrated over a 0.45 µm membrane filter (Cellulose Nitrate; Ø 47 mm) and filters were transferred onto Slanetz and Bartley Agar (SBA) and incubated at 36 ± 2°C for 44 ± 4 hours. Colonies were transferred onto Gal-esculine-azide-agar (GEAA) and incubated at 44 ± 0,5°C for 2 hours. Colonies which showed yellow-brown to black coloration were counted as *Enterococci*. This analyses was performed according to (NEN-EN-ISO-7899-2 2000).

Clostridium perfringens concentrations were measured by membrane filtration using 0.45µm membrane filters (Cellulose Nitrate; Ø 47 mm). Filters were placed on Tryptose Sulfiet Cyclocerine medium (TSC-medium) under anaerobic conditions for 24 ± 2 hours at 45 ± 1°C. After incubation black colonies were counted as *Clostridium perfringens*. For conformation several colonies were transferred into Mobility-Nitraatredution medium (BN-medium) and Lactose-Gelatine medium (LG-medium) and incubated at 37 ± 1 °C for 24 ± 2 hours. In BN-medium *Clostridium perfringens* should produce gas, colour the medium yellow and prevent solidification of the medium, in LG-medium *Clostridium perfringens* should colonise the complete medium volume and colour the medium red, after addition of zinc this colour should diminish after ten minutes. This method is based on (ISO/TC-147/SC4/WG5), (ISO-6461-2 1986)and (NEN-EN-ISO-8199 2007).

The disinfection capacity (DC) for each indicator pathogen was calculated by subtracting the log outflow concentration from the log inflow concentration of the CW or individual compartments:

$$DC = \log_{10}(C_{out}) - \log_{10}(C_{in}) = \log_{10}(C_{in} / C_{out}) \quad (1)$$

Bacteriophages and bacteroids

Water samples were taken and incubated on plates with with *Bacteriodes* host cells according to (ISO-10705-4 2001) to determine the concentration of bacteriophages, by counting the number of plaque areas. Two different host *Bacteriodes* were used to enable differentiation between general and

human specific bacteriophages. For the concentration of general bacteriophages *Bacteroides fragilis* was used, for the human specific bacteriophages *Bacterioides*-strain HB13 was used as hosts. Levels of bacterioides in the water were determined with a quantitative polymerase chain reaction assay (qPCR). This technique enabled multiplication of a certain gene that is specific for the bacteroid, and quantifying this gene by adding a fluorescent label.

Zooplankton, epifauna and phytoplankton: biovolume and grazing rate

For zooplankton determination and abundance, water samples (10L) were filtered over a 30 µm filter. Zooplankton abundance was counted using an inverted light microscope (Olympus; IX70-71) with a minimal magnification of 60x. Samples were then fixated with lugol, left for 15 minutes for settling and recounted for zooplankton abundance. The difference between the first and second counting was interpreted as living organisms.

Epifauna was sampled by placing a PVC tube around five reed stems, cutting of the reed stems and incubating them in 250 mL of water from inside the PVC tube. By scraping, epifauna was removed from the reed stems and added to the 250mL of surrounding field water. Samples were fixated using lugol, left for 15 minutes settling and counted at minimal magnification of 60x.

Phytoplankton samples were taken mainly for counting small amoeba and ciliates (<30µm) which were excluded in the above described zooplankton counting. Water samples (3L) were fixated with Lugol and left for settling for 5 days. Overlying water was carefully removed and the remaining sample (4-5 mL) was transferred into a smaller container. Phytoplankton, amoeba and ciliate abundance were counted at a magnification of 400-600x using an inverted light microscope.

The abundance of zooplankton, phytoplankton and epifauna was transformed into biovolume using a conversion factor (appendix: table A1-A4). These conversion factors from abundance to biovolume were derived using the average size of the organisms (Streble & Krauter 2006), regarding all organisms as spherical. Conversion factors between abundance and grazing rate were gathered from literature (appendix: table A1-A4). Organisms with no determined grazing rate and a minimal abundance or biovolume of 0.1% of the total amount were estimated using closely related organisms (appendix: table A1-A4).

7.3.4 Labexperiment

One-litre samples of each pre-treatment (i.e. unfiltered, 25 µm and 5 µm filtered) were incubated under four different conditions, yielding a total of twelve treatments. The four conditions consisted of: i) control treatment: incubation at 10 °C with an air humidity of 70% and a 16/8 light/dark-cycle; ii) temperature treatment: incubation at 20 °C with an air humidity of 65% and a 16/8 h light/dark-cycle; iii) oxygen treatment: incubation conditions were the same as the control treatment, but samples were aerated; iv) UVR treatment: incubation conditions were the same as the control treatment, but samples were exposed to extra UVR, using UV-lamps (Exoterra Repti Glo 40 W 10% UVB 33% UVA). The lamps were suspended at 5 cm distance from the surface of the water and were continuously emitting light. All combinations of filtration and treatment were performed in triplicates. *Escherichia coli* concentrations were determined in all samples at the start of the incubation and each subsequent 24 hours for three days using a bacterial culture technique.

Culture method

Each 24 hours, an aliquot (0.5 to 5 ml, depending on the bacterial density of the water) was taken from each sample. The bacteria in these aliquots were visualized with Coliscan® S Easygel® (Micrology Laboratories, Goshen, IN, USA), according to the manufacturer's instructions. The plates were incubated in a stove at 36 °C, and after 20 hours of incubation, the plates were photographed. The

number of CFU of *E. coli* were counted with ImageJ 1.44 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) using the Cell Counter plugin, and from these data, slopes of the linear regression lines were computed. To determine the appropriate volume of the aliquot that should be incubated, a range (0.5 to 5 ml) of aliquot volumes was taken at the start of the experiment. From this series, an appropriate aliquot volume for the following day could be estimated.

7.4 Results

7.4.1 Disinfection capacity

In general the concentration of *E. coli*, *Enterococci* and *C. perfringens* decreased during retention in both the sedimentation ponds and the helophyte fields (Table 7-1). The average disinfection capacity (\log_{10} CFU) of *C. perfringens* (0.6) was lower compared with the disinfection capacity of both *Enterococci* (0.8) and *E. coli* (1.1) (Figure 7-4). The disinfection for all three pathogens was much higher during residence in the helophyte fields compared with the sedimentation ponds (Figure 7-4).

Table 7-1 The average year concentration (\pm s.d.) of *E. coli*, *Enterococcus* and *C. perfringens* at the three sample locations of CW Grou. Samples were taken monthly during 2010. ($n \geq 11$ per location)

	<i>E. coli</i> (CFU 100mL ⁻¹)	<i>Enterococci</i> (CFU 100mL ⁻¹)	<i>C. perfringens</i> (CFU 100mL ⁻¹)
CW influent	21136 (18929)	3736 (4623)	935 (758)
Sedimentation pond effluent	12121 (13059)	2232 (2995)	662 (749)
CW effluent	1525 (2110)	568 (1204)	233 (430)

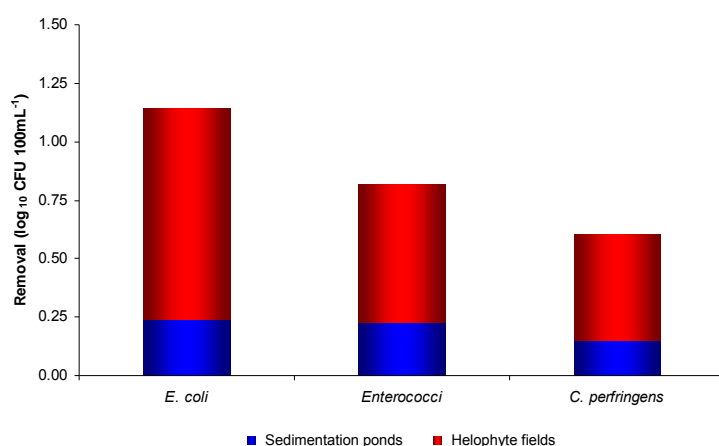


Figure 7-4 Average removal *E. coli*, *Enterococci* and *C. perfringens* during retention in the sedimentation ponds (blue) and the helophyte fields (red). Samples were taken monthly during 2010.

7.4.2 Suspended particles, sedimentation and pathogens

The average (s.d.) removal of suspended particles during retention in the constructed wetland was 2.51 (\pm 3.45) mg L⁻¹. The reduction of suspended particles mainly occurred during retention in the helophyte fields (7.99 \pm 12.13 mg L⁻¹), while an average increase of suspended particles was observed during retention in the sedimentation ponds (5.48 \pm 10.22 mg L⁻¹). The reason for this large increase of suspended particles is unclear, especially because several other studies in the same CW show stable or decreasing suspended particles concentrations during retention in the sedimentation ponds. It is possible that at the sedimentation ponds effluent the sediment was disturbed during sampling, which could increase the suspended particle concentration. The average contribution of

pathogens to the total suspended particle concentration decreased from 1.8% in CW influent to 0.2 % in the CW effluent (Figure 7-5).

The sedimentation traps were placed in the sedimentation ponds and showed sedimentation of suspended particles in all three sedimentations ponds (Figure 7-6). In the first sedimentation pond a sedimentation rate of 5.2 ($R^2 = 0.96$) $\text{mg cm}^2 \text{day}^{-1}$ was observed, in the second and third sedimentation ponds the sedimentation rates were 1.62 ($R^2 = 0.96$) and 0.39 ($R^2 = 0.56$) $\text{mg cm}^2 \text{day}^{-1}$ respectively. During the same period the concentration of *E.coli* remained stable and comparable with the concentration of *E.coli* in the surrounding water in the three sedimentation ponds.

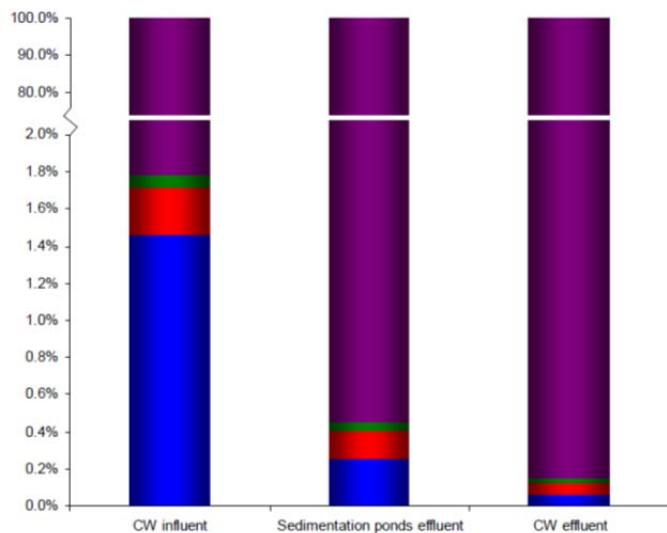


Figure 7-5 The average percentage of *E.coli* (blue), Enterococci (red), *C. perfringens* (green) and other particles (purple) of the total suspended particles in the CW influent, sedimentation ponds effluent and CW effluent.

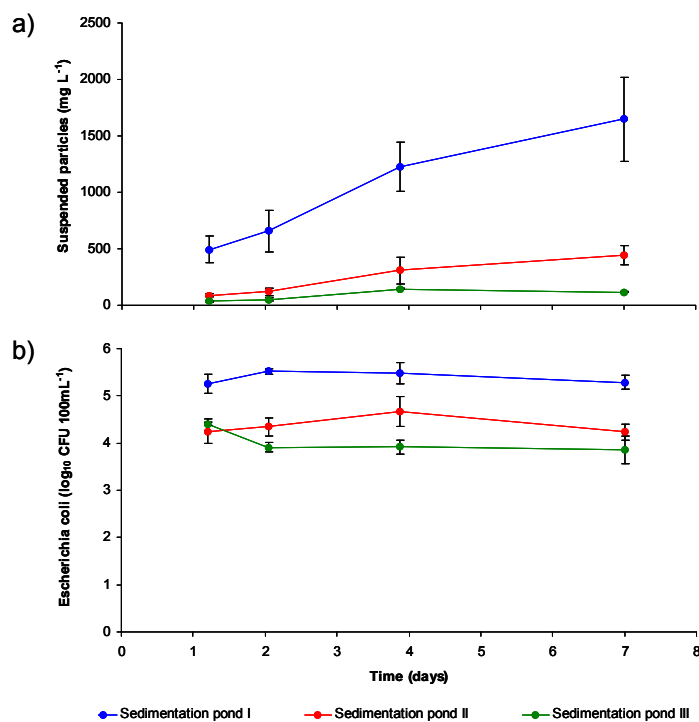


Figure 7-6 Average concentration (\pm s.d.) of suspended particles (a) and *E.coli* (b) in sedimentation traps over time in the first section (blue), second (red) and third (green) sedimentation ponds.

7.4.3 Biofiltration

The average zooplankton density (\pm s.e.) in the sedimentation ponds and helophyte fields was similar, 1.5×10^5 ($\pm 6.2 \times 10^4$) and 1.4×10^5 ($\pm 5.0 \times 10^4$) individuals L^{-1} respectively. Surprisingly no nano-flagellates were observed in any samples, this could be caused by grazing of nano-flagellates by other zooplankton. Another possible reason could be disintegration by the Lugol fixation. In both the sedimentation ponds and helophyte fields three zooplankton blooms were observed in May, July and October (Figure 7-7). The grazing rate in the sedimentation ponds appears to follow the same pattern as the abundance with two small peaks during May and October, and a large increase in July. In the reeds beds the grazing rate only increases in July. The average grazing rate (\pm s.e.) in the sedimentation ponds was 9.0×10^6 ($\pm 3.6 \times 10^6$) particles $h^{-1} L^{-1}$. The helophyte fields had a 57% higher average grazing rate of 1.4×10^7 ($\pm 6.0 \times 10^6$) particles $h^{-1} L^{-1}$, which could be caused by an increase in zooplankton density or changes in zooplankton composition.

The total grazing rate of zooplankton showed weak correlations with the removal of pathogens *E.coli* (0.30 and 0.19), *Enterococci* (0.22 and 0.28) and *C.perfringens* (0.22 and 0.14) in the sedimentation ponds and the helophyte fields respectively (appendix; fig. A2). In both the sedimentation ponds and the helophyte fields the grazing rate was mostly determined by *Ciliophora* and *Amoebzoa* which *Ciliophora* smaller than 30 μm being responsible for more than 90% of the total grazing rate (Table 7-2)

In the sedimentation ponds the removal of *E.coli* was correlated (Pearson's correlation coefficient; p) with *Amoebzoa* <30 μm (0.88; 0.001) and *Ciliophora* <30 μm (0.66; 0.10), *Enterococci* with *Nauplius* larvae (0.80; 0.002) and *Daphnia* sp. (0.70; 0.01) (Figure 7-8). The removal of *C.perfringens* showed a high correlation with the grazing rate of *Nauplius*-larvae (0.85; <0.01) and *Polyarthra* (0.60; 0.04) (Figure 7-8).

In the helophyte fields the removal of pathogens correlates less with the grazing rate of specific genera. *E.coli* removal correlated (Pearson's correlation coefficient; p) best with the grazing rate of *Nematoda* (0.69; 0.02) and *Nauplius*-larvae (0.67; 0.02) (Figure 7-9). *Enterococci* removal showed weak correlations with *Ciliophora* sp. (0.51; 0.09) and *Brachionus* sp. (0.49; 0.11). The weak, but strongest correlations for *C.perfringens* removal were found with the grazing rates of *Diffugia* (0.34; 0.28) and *Synchaeta* (0.31; 0.33).

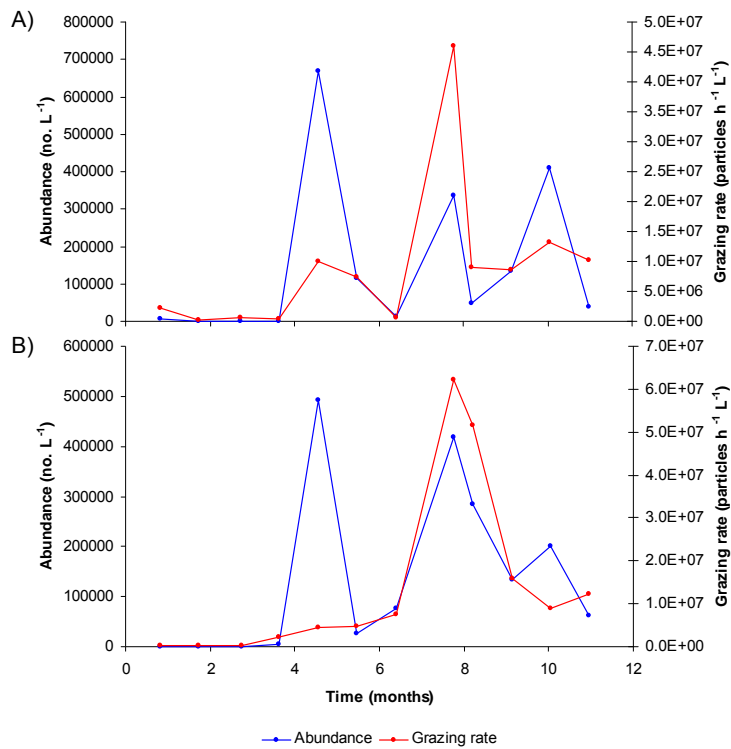


Figure 7-7 The total zooplankton abundance (blue) and grazing rate (red) in the sedimentation ponds (A) and the helophyte fields (B) from January to December 2010.

Table 7-2 Year average grazing rate of zooplankton in the sedimentation ponds and helophyte fields ranked on contribution percentage of total grazing rate.

		Grazing rate (no. particles h ⁻¹ L ⁻¹)	
		Average (s.e.)	% of total
Sedimentation ponds	Ciliophora <30 µm	12430938 (3355)	93.5%
	Amoebozoa <30 µm	375885 (563)	2.8%
	Vorticella	252838 (327)	1.9%
	Ciliophora sp.	190412 (390)	1.4%
	Other zooplankton	48947	0.4%
Helophyte fields	Ciliophora <30 µm	19208619 (3971)	92.7%
	Ciliophora sp.	801757 (780)	3.9%
	Amoebozoa <30 µm	320900 (576)	1.5%
	Vorticella	206020 (277)	1.0%
	Other zooplankton	206020	0.9%

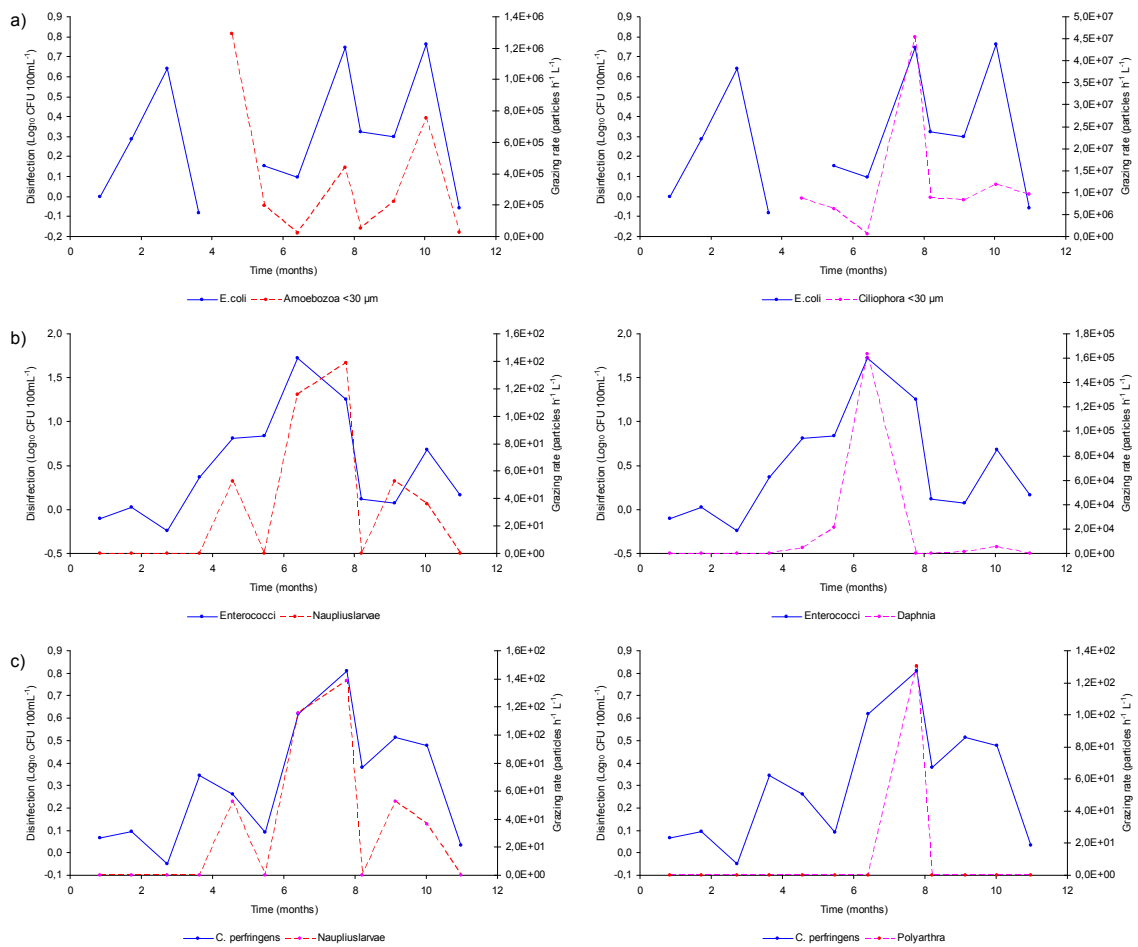


Figure 7-8 The disinfection (blue) of *E.coli* (A), *Enterococci* (B) and *C.perfringens* (C) in the sedimentation ponds and the grazing rate of the two strongest correlating organisms (left, right) from January to December 2010.

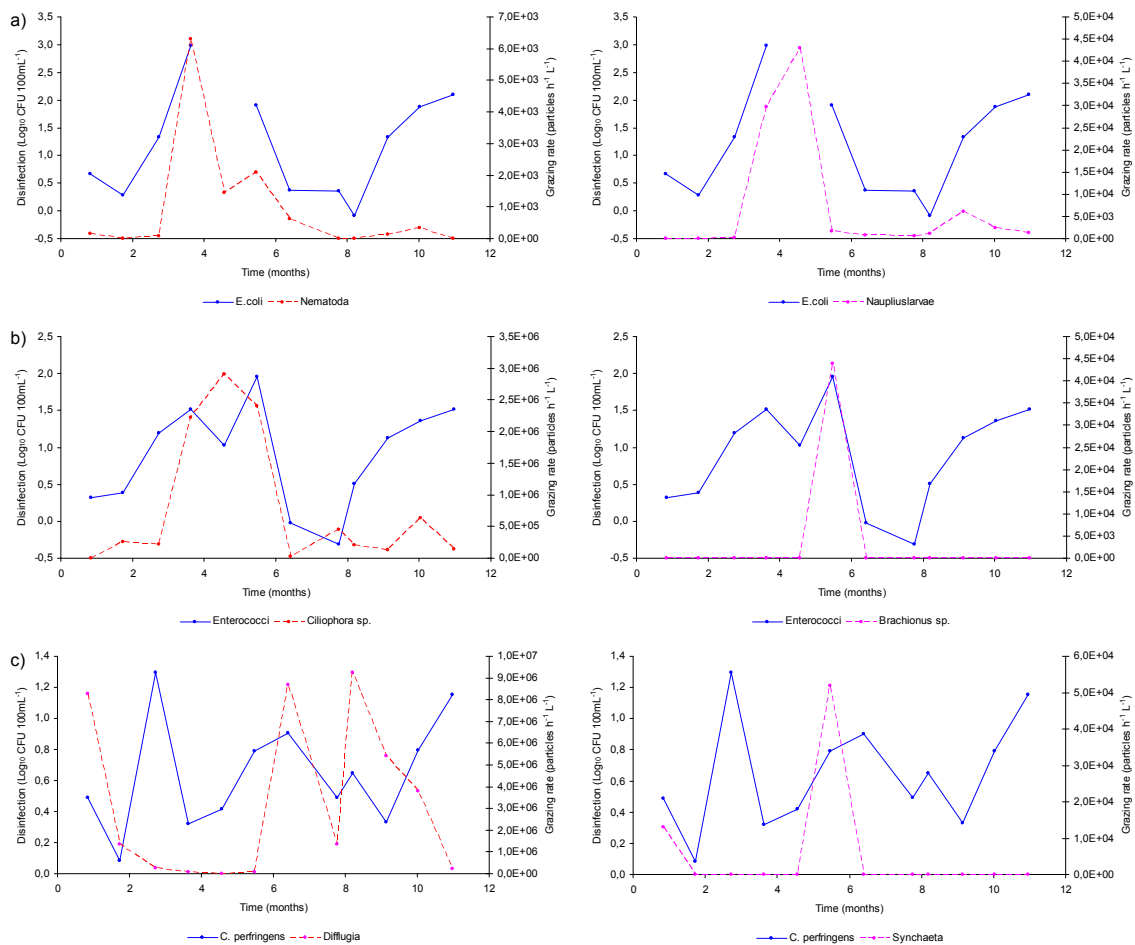


Figure 7-9 The disinfection (blue) of *E.coli* (A), *Enterococci* (B) and *C.perfringens* (C) in the helophyte fields and the grazing rate of the strongest correlating organisms (left, right) from January to December 2010.

The average abundance (\pm s.e.) of epifauna in the helophyte fields was 3.06×10^4 ($\pm 9.2 \times 10^3$) individuals L⁻¹, the average grazing rate 1.48×10^7 (5.1×10^6) particles h⁻¹ L⁻¹. Similar to the seasonal zooplankton dynamics epifauna showed two small blooms in May and October and a large bloom in July, both in abundance and total grazing rate (Figure 7-10). Although the fraction smaller than 30 μ m was not included in these analyses *Ciliophora* and *Amoebzoa* were the main contributors to the grazing rate, with *Ciliophora sp.* and *Diffugia sp.* as the most important groups (Table 7-3). In general the correlation coefficients between the removal of pathogens and the grazing rate of individual groups were similar between epifauna and zooplankton (appendix; fig. A2,3). The removal of *E.coli* correlated with the grazing rate of *Harpacticoida*, *Nauplius-larvae* and *Gymnamoebae* (0.62-0.65; <0.05). *Enterococci* removal was strongest correlated with *Daphnia sp.* and *Gymnamoebae* (0.48-0.50; >0.1). For *C.perfringens* removal *Rotifera sp.* and *Cyphoderia* correlated strongest (0.41-0.45; >0.14).

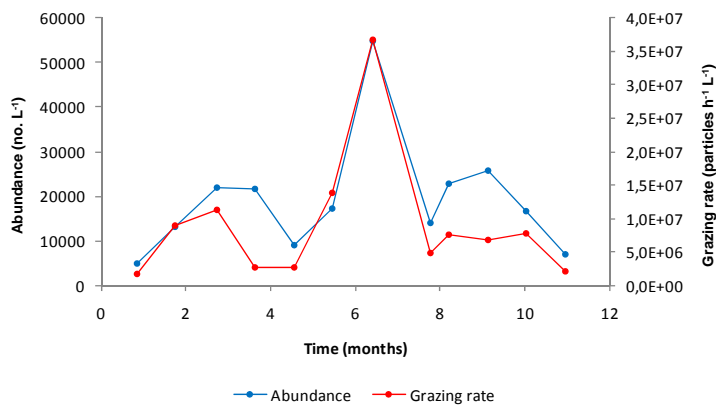


Figure 7-10 The total epifauna abundance (blue) and grazing rate (red) in the helophyte fields (B) from January to December 2010.

Table 7-3 Year average grazing rate of epifauna in the helophyte fields.

		Grazing rate (no. particles h ⁻¹ L ⁻¹)	
		Average (s.e.)	% of total
Helophyte fields	Ciliophora sp.	6493695 (2121)	74.4%
	Diffugia	1317025 (1055)	15.1%
	Arcella	308375 (409)	3.5%
	Vorticella	285211 (351)	3.3%
	Daphnia sp.	123333 (189)	1.4%
	Rotifera sp.	87798 (274)	1.0%
	Other zooplankton	123333	1.3%

7.4.4 External import

At all three locations several measurements were below the detection limit, for these analyses the sample size was 9 for CW influent, 7 for sedimentation ponds effluent and 6 for CW effluent. The average concentration (\pm s.e.) of bacteriophages infectious to *bacteriodes*-strains HB13 (specific to human bacteriodes) showed a decrease in both the sedimentation ponds and the helophyte fields from 232 (\pm 92), to 61 (\pm 23) and 35 (\pm 48) plaque forming units (PFU) L⁻¹ (Figure 7-11). The average concentration (\pm s.e.) of bacteriophages infectious to *Bacteroides fragilis* decreased from 316 (\pm 76) to 68 (\pm 68) PFU L⁻¹ to 22 (\pm 9) PFU L⁻¹. These results indicate no addition of pathogens during the residence of WWTP effluent in the constructed wetland.

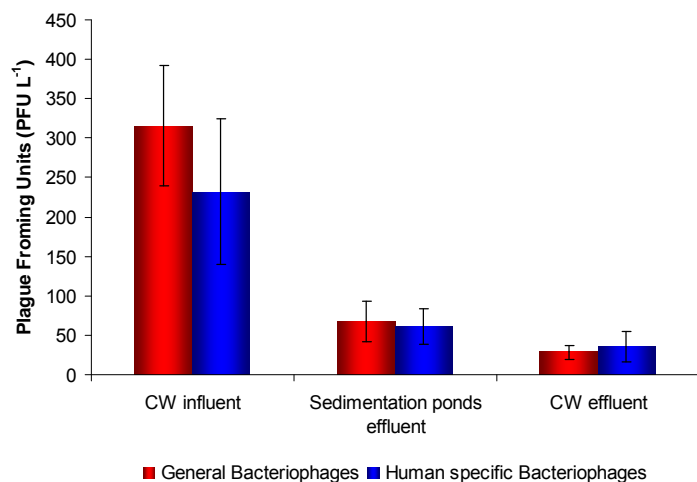


Figure 7-11 The average (s.e.) concentration of bacteriophages in CW influent, sedimentation ponds effluent and CW effluent which are infectious specifically to human bacteriodes (blue) or other bacteriodes (red).

7.4.5 Comparison between locations (Grou, Cuijk and Hapert)

Concentrations of *E.coli*, *Enterococci* and *C.perfringens* (Figure 7-12) in CW influent are similar between the locations Grou, Cuijk and Hapert. During retention in all three CW's the concentration of *E.coli* was reduced. The *E.coli* concentration in Hapert increased slightly during retention in the sedimentation ponds and decreased during retention in the helophyte fields. Cuijk showed an opposite pattern with a decrease during retention in the sedimentation ponds and increase during retention in the helophyte fields. In Grou the *E.coli* concentration decreased during retention in both CW compartments. The total disinfection (\log_{10} CFU 100mL⁻¹; \pm s.d) of *E.coli* was higher in Grou (0.67; \pm 0.61) compared with Hapert (0.10) and Cuijk, (0.02; \pm 0.41). The *Enterococci* concentration decreases during retention in the CW of Grou (0.78; 0.22). This decrease in *Enterococci* concentration was mainly generated during retention in the sedimentation ponds. The *enterococci* concentration in Hapert appeared to be rather stable throughout the CW, with a concentration between 3.4 en 3.1 \log_{10} . An large increase in *Enterococci* concentration was observed in Cuijk, -1.45 \log_{10} CFU 100mL⁻¹, mostly caused during retention in the helophyte fields. In both Grou and Cuijk the disinfection of *C.perfringens* was roughly similar, 1.16 and 0.81 \log_{10} CFU 100mL⁻¹ respectively. In Hapert the disinfection of *C.perfringens* was minimal with 0.30 \log_{10} CFU 100mL⁻¹.

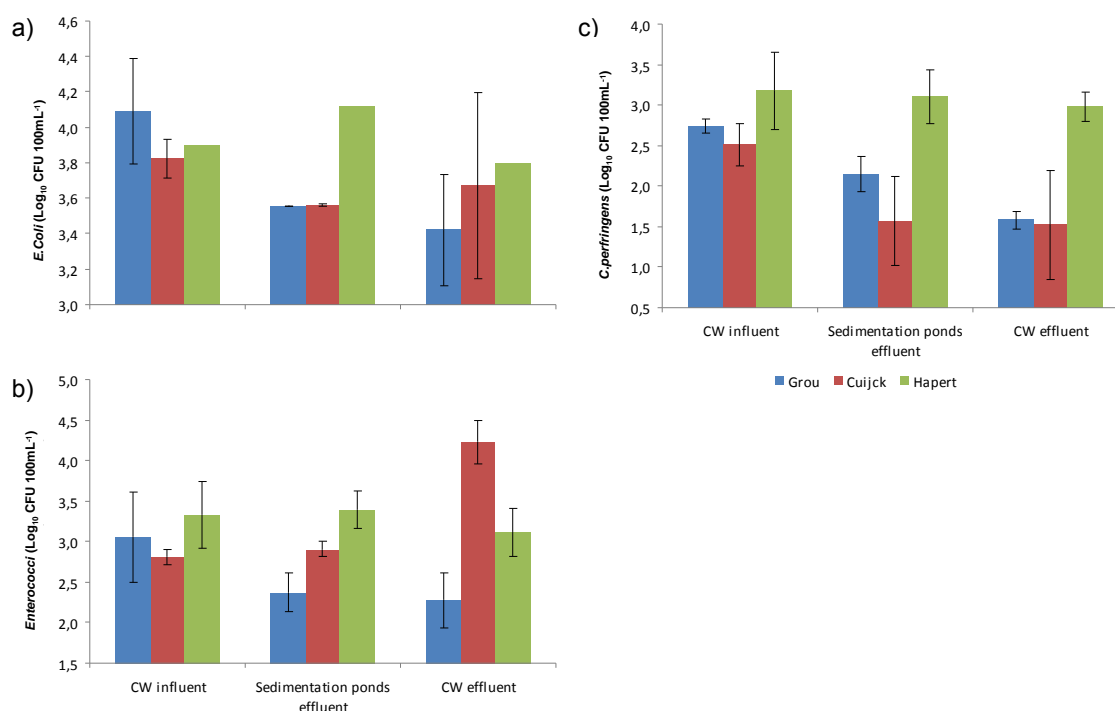


Figure 7-12 The average (s.d.) log concentration of *E.coli* (A), *Enterococci* (B) and *C.perfringens* (C) in CW influent, sedimentation ponds effluent and CW effluent in Grou (blue), Cuijk (red) and Hapert (green). ($n \leq 2$)

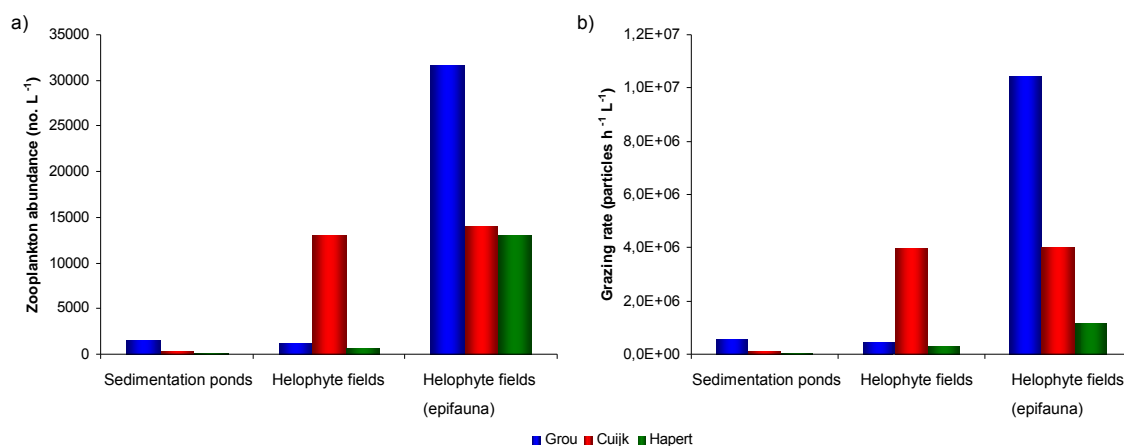


Figure 7-13 The average abundance of zooplankton (A) and grazing rate (B) in sedimentation ponds, helophyte fields Grou (blue), Cuijk (red) and Hapert (green). ($n \leq 2$)

Table 7-4 Average grazing rate of the five most contributing zooplankton groups in the sedimentation ponds and helophyte fields ranked on contribution percentage of total grazing rate in Grou (left), Cuijk (middle) and Hapert (right). ($n \leq 2$)

Grou		Cuijk		Hapert	
Sedimentation ponds					
Ciliophora sp.	(61%)	Gymnamoebae	(44%)	Ciliophora sp.	(66%)
Arcella	(10%)	Arcella	(20%)	Vorticella	(20%)
Rotifera sp.	(10%)	Ciliophora sp.	(15%)	Rotaria	(13%)
Vorticella	(9%)	Vorticella	(7%)	Arcella	(0%)
Chydorus	(4%)	Ceriodaphnia	(6%)	Ceriodaphnia	(0%)
Helophyte fields					
Ciliophora sp.	(55%)	Gymnamoebae	(62%)	Ciliophora sp.	(68%)
Vorticella	(11%)	Arcella	(25%)	Euglypha	(24%)
Rotifera sp.	(9%)	Diffugia	(8%)	Diffugia	(4%)
Ceriodaphnia	(6%)	Ciliophora sp.	(5%)	Vorticella	(2%)
Centropixis	(6%)	Rotaria	(0%)	Arcella	(1%)
Helophyte fields (epifauna)					
Diffugia	(52%)	Gymnamoebae	(55%)	Ciliophora sp.	(33%)
Ciliophora sp.	(31%)	Arcella	(14%)	Euglypha	(26%)
Arcella	(9%)	Diffugia	(14%)	Diffugia	(18%)
Vorticella	(3%)	Ciliophora sp.	(11%)	Vorticella	(8%)
Euglypha	(3%)	Rotaria	(3%)	Arcella	(6%)

In all three CW's the abundance and grazing rate of zooplankton and epifauna larger than 30 μm are higher in the helophyte fields compared with the sedimentation ponds (Figure 7-13). The abundance of epifauna in the helophyte fields of Grou and Hapert were much higher than the zooplankton in both the helophyte fields and the sedimentation ponds. In Cuijk zooplankton and epifauna contribution similarly to the abundance and grazing rate in the helophyte fields. Although there were differences in contribution in all three CW's Amoebozoa, Ciliophora and Rotifera are the main group of organisms contributing to the community grazing rate (Table 7-4).

The initial concentrations of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* were similar at Grou and Hapert, ± 480 PFU L^{-1} (Figure 7-14; a,c). The initial concentration of Bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in Cuijk was with 20 PFU L^{-1} much low compared with the other two CW's (Figure 7-14). During retention in the CW at Grou both human specific and general bacteriophages decreased respectively from 232/316 to 61/68 in sedimentation ponds effluent and 35/22 PFU L^{-1} in CW effluent. In Cuijk the concentration of bacteriophages infecting human specific bacteriodes decreased during

the total residence in the CW, from 20 to 4 PFU L⁻¹. This decrease in bacteriophages specific to human bacteriodes occurred in the helophyte fields. The bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* increased from 30 to 55 PFU L⁻¹ during residence in the sedimentation ponds. In the helophyte fields the concentration decreased again to 30 PFU L⁻¹ (Figure 7-14; b). In Hapert the bacteriophages infecting human specific bacteriodes increased from 54 to 75 PFU L⁻¹ during retention in the CW. The general bacteriophages showed an increased during residence in the helophyte fields from 480 to 715 PFU L⁻¹ (Figure 7-14; c)

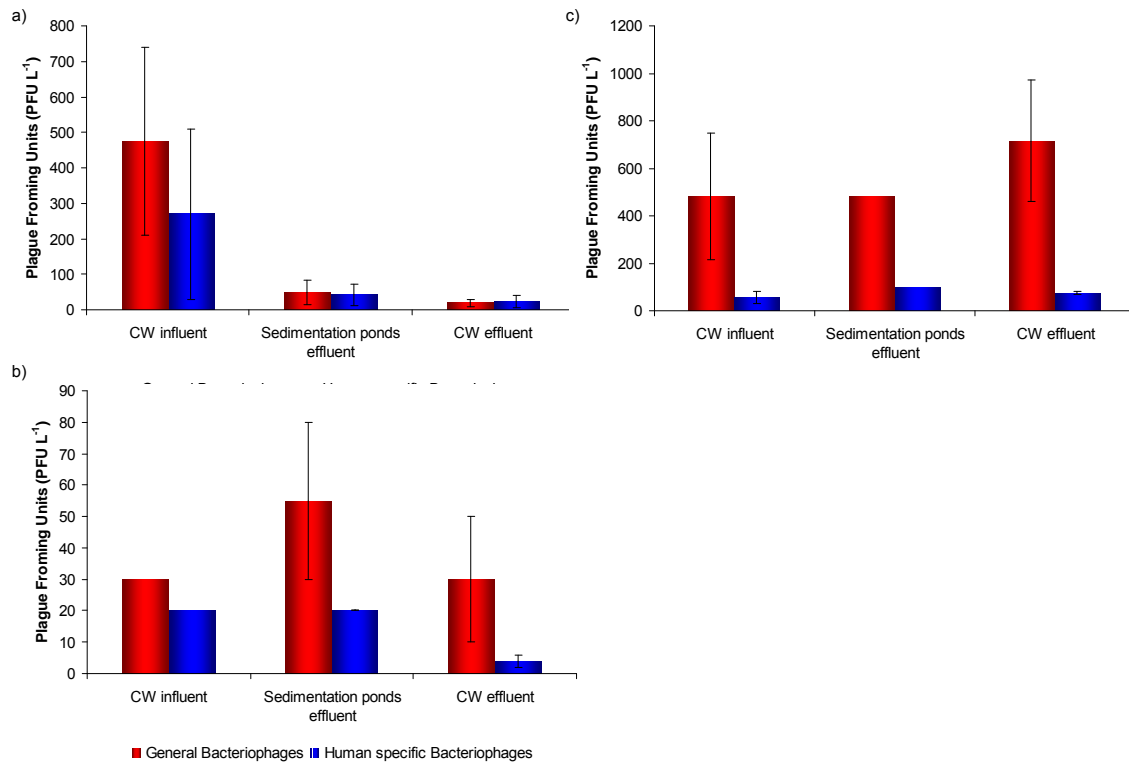


Figure 7-14 The average concentration of bacteriophages in CW influent, sedimentation ponds effluent and CW effluent which are infectious specifically to human bacteriodes (dark) or other bacteriodes (light) at Grou (A), Cuijk (B) and Hapert (C). ($n \leq 2$)

7.4.6 Lab experiment

At the start of the experiment, mean *E. coli* concentrations (\pm s.e.) were 217 ± 4.7 CFU ml⁻¹ for the unfiltered pre-treatment, 255 ± 4.7 CFU ml⁻¹ for the 25 μ m filtrate, and 233 ± 7.4 CFU ml⁻¹ for the 5 μ m filtrate. Hence, no *E. coli* were lost in the filtering process. *Escherichia coli* is known to adsorb to particles larger than 5 μ m (Boutilier et al., 2009), which would result in a loss of *E. coli* when filtered through a 5 μ m membrane filter. However, our water-samples were taken from effluent of a sedimentation tank. It is likely that most adsorbed *E. coli* settled in the tank, so only free-floating *E. coli* could leave the tank as effluent. With most *E. coli* in the water sample being free-floating, they had little trouble passing through the 5 μ m pores of the filter. From the culture results (Figure 7-16), slopes of the linear regression lines were calculated, yielding *E. coli* population mortality rates. The population mortality rates were used to determine the relative contributions of the factors. The mean (\pm s.e.) natural population growth rate in Grou was 2.16 ± 0.14 CFU ml⁻¹ h⁻¹ (Figure 7-15).

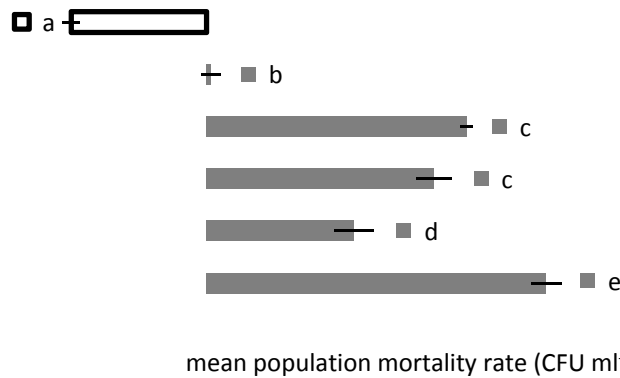


Figure 7-15 Relative contributions of various factors on the population mortality rate of *E. coli* in a controlled incubation experiment using water from a constructed wetland in Grou, the Netherlands ($n=3$ for each bar). Letters indicate significant similarity (student's *T*-test, $p < 0.05$). Error bars represent s.e.

In favourable conditions, without the presence of zooplankton, *E. coli* populations were able to grow. Ultra-violet radiation had the largest effect on population mortality rate with 5.43 ± 0.24 CFU ml⁻¹ h⁻¹. Biofiltration by zooplankton from the 5-25 μm fraction had the second largest effect on population mortality rate with 4.42 ± 0.09 CFU ml⁻¹ h⁻¹. This fraction contained a high abundance of protozoa such as ciliates and amoebae. In contrast to the profound effect of zooplankton between 5-25 μm on *E. coli* mortality rates, biofiltration by zooplankton >25 μm had only a small effect on population mortality rates with 0.08 ± 0.16 CFU ml⁻¹ h⁻¹. Zooplankton >25 μm, for example some cladocerans, are known to feed on bacteria (DeMott, 1982). However, the filter residue >25 μm from the water from Grou contained little zooplankton >25 μm. An increase in temperature had the third largest effect on population mortality rates with 3.63 ± 0.28 CFU ml⁻¹ h⁻¹. This result may be counter-intuitive, considering that the optimal growth temperature of *E. coli* is 37 °C. However, this result does support the findings of Boutilier et al. (2009) and McFeters and Stuart (1972), who also found a strong negative correlation between temperature and *E. coli* survival. The increased population mortality at higher temperature is probably related with higher metabolic rates. Oxygenation had the fourth largest effect on population mortality rate with 2.36 ± 0.32 CFU ml⁻¹ h⁻¹. However, oxygen concentrations could not be adjusted to desired levels (appendix; fig. A5). The sedimentation pond at Grou from which the samples were taken contained 2.16 mg O₂ L⁻¹, but we were not able to maintain these low oxygen conditions. As a result, oxygen concentrations in all oxygen treatment were relatively similar. The oxygenation did however increase the mean pH. pH of oxygenated samples were around 9.5, other samples had a pH around 8.6. In previous studies, pH has been shown to affect *E. coli* survival, with a survival optimum for pH 5 - 7 and decreasing rapidly for higher pH (McFeters and Stuart, 1972). Thus, the increased mortality observed in the oxygen treatment could partially be an effect of increased pH.

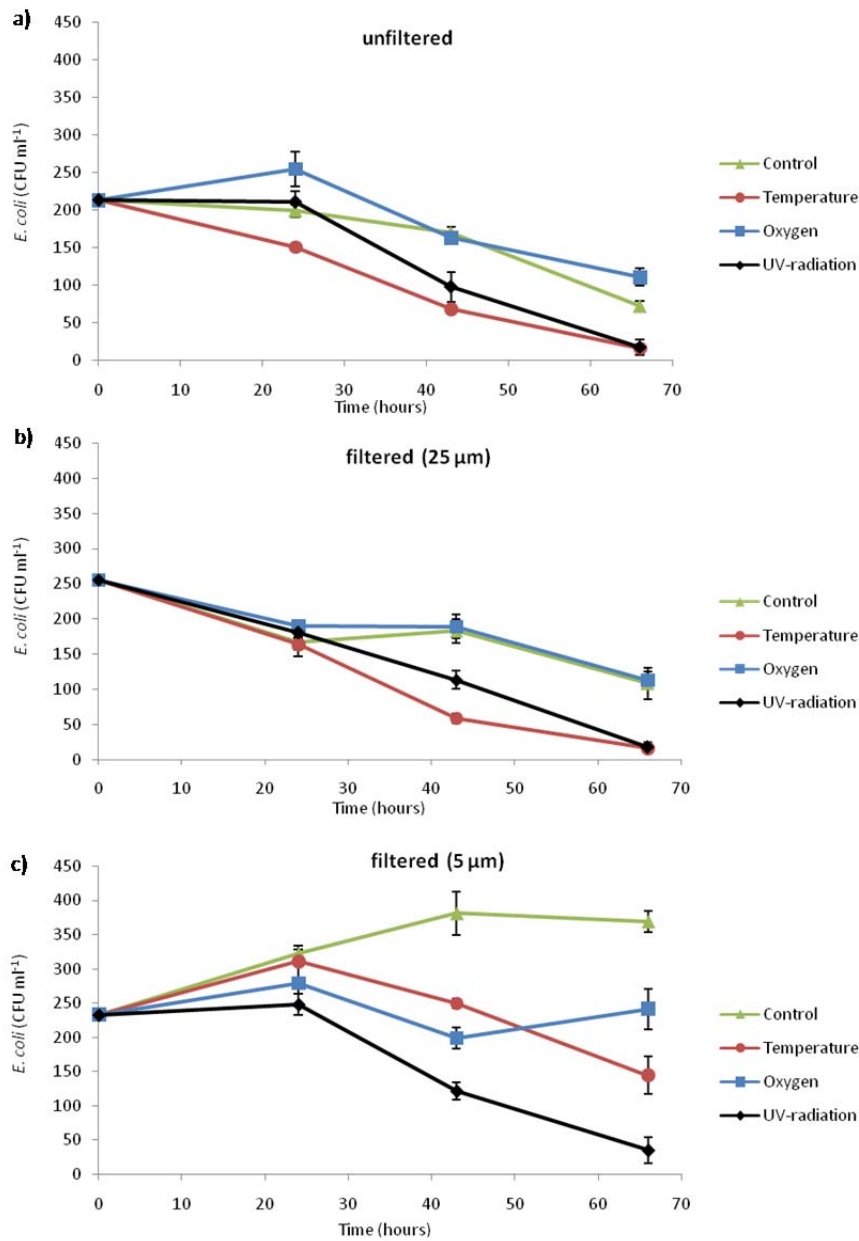


Figure 7-16 Mean *E. coli* concentrations over time in an incubation experiment using water from a constructed wetland ($n=3$ for each data point). Three pre-treated samples were used: a) unfiltered; b) filtered ($25\ \mu\text{m}$); c) filtered ($5\ \mu\text{m}$). Error bars represent s.e..

7.5 Discussion & conclusions

All indicator pathogen concentrations, *E.coli*, *Enterococci* and *C.perfringens*, decreased during retention in the constructed wetland with a log removal around 0.6 to 1.1 which is rather low compared with other studies on the removal of indicator pathogens in CW's (Molleda *et al.* 2008; Reinoso *et al.* 2008). The average concentrations of both *E.coli* (1525 CFU 100mL⁻¹) and *Enterococci* (568 CFU 100mL⁻¹) at the end of the constructed wetland were close to the hygienic water quality standards for swimming water of 900 and 330 CFU 100mL⁻¹, respectively (EU 2006). No significant seasonal effects were observed, probably caused by the relative stable temperature of CW influent, which remained above 10°C year round (data not shown). The pathogen removal in the helophyte fields exceeded the removal in the sedimentation ponds for all three indicator pathogens. This data was not corrected for the difference in retention time, which however can only explain part of the difference. In a tracer experiment (data not shown) it was observed that the helophyte fields in Grou have a retention time which is 36% longer than the sedimentation ponds, respectively 23.6 and 17.3 hours.

Although substantial sedimentation of suspended particles was observed in the sedimentation ponds, this sedimentation turned out to have a minor effect on the removal of *E.coli*, which is reflected with weak correlations between suspended particles and pathogen removal (table 6.1). This finding has also been reported by (Boutilier *et al.* 2009), who concluded that sedimentation contributed to less than 3% of the pathogen removal (Boutilier *et al.* 2009). During the laboratory experiments filtration of WWTP effluent over a 5µm filter did not influence the *E.coli* concentration, indicating that *E.coli* is primarily present in single cell form without attachment to organic matter. In the helophyte fields the flow rate of water is different compared to the sedimentation ponds. Due to the dimensions of the helophyte fields no sedimentation traps could be used. Therefore, it was impossible to assess the effect of sedimentation of pathogens here. By evaluating the correlation between the removal of suspended particles and pathogens, *E.coli* showed a strong correlation (Table 7-5). This indicates that *E.coli* and suspended particles are probably removed by the same mechanism. Since the main mechanism for removing suspended particles in sedimentation ponds is sedimentation, this might also be valid for *E.coli* removal in the helophyte fields. The correlation between the removal of *Enterococci* and *C.perfringens* and suspended particles was negligible, indication that the removal of these two pathogens is caused by different processes than the removal of suspended particles.

Table 7-5 Correlation coefficients between the removal of *E.coli*, *Enterococci*, *C.perfringens* and the removal of suspended particles in the sedimentation ponds and the helophyte fields. Samples were taken monthly during 2010 (n ≥ 11 per compartment and pathogen).

	Suspended particles	
	Sedimentation ponds	Helophyte fields
<i>E. coli</i>	0.46	0.88
<i>Enterococci</i>	0.39	0.18
<i>C. perfringens</i>	0.39	-0.08

Predation rate of particles by zooplankton appears to be mainly influenced by food abundance (Gonzalez *et al.* 1990; Stott *et al.* 2003), but also by temperature, prey particle size, other available food sources and flow rate (Sherr *et al.* 1988; Starink *et al.* 1994; Eisenmann *et al.* 1998; Stott *et al.* 2001; Fu *et al.* 2003). These factors are however not tested in situ for combined effects. Biofiltration by zooplankton in Grou could be mostly ascribed to *Ciliophora* (and to lesser extent Amoebozoa) in both the sedimentation ponds and the helophyte fields. The importance of *Ciliophora* to the total grazing rate on particles, bacteria and pathogens is been shown by several studies (Albright *et al.* 1987; Sanders *et al.* 1989; Vaque *et al.* 1994). *Ciliophora* are a large and diverse group of organisms and differ in size, behaviour and occurrence (Brusca & Brusca 2003). *Ciliophora* ingest more free floating bacteria than bacteria attached to a solid matrix (Albright *et al.* 1987), They can be either non-

selective or selective grazers, some preferring rod-shaped coliforms (incl. *E.coli*) over coccus-shaped *Enterococci* 74-155 fold (Epstein & Shiaris 1992). It appears that this kind of selective grazing on size and shape is observed in the sedimentation ponds in Grou. For each specific pathogen tested the removal rate was correlated to different grazers. *Ciliophora* are probably more involved in the removal of *E.coli* than in the removal of *Enterococci*. *Daphnia* seems to be grazing on larger particles, as demonstrated by the stronger correlation to the removal of *Enterococci*. (*Enterococci* often occur in pairs or short chains). Several studies indicated that the consumption of bacteria is dependant on the size of both bacteria and grazers (Porter *et al.* 1983; Knoechel & Holtby 1986; Hart & Jarvis 1993). *Daphnia* were actually negatively correlated to the removal of *E.coli* which might suggest predation of *Daphnia* on *Ciliophora* and other small organisms which could graze on *E.coli*. This possible food-web effect may interfere with a proper assessment of the results. Nonetheless, high correlations between the removal of pathogens and the grazing rate of individual groups of organisms suggest that, although both pathogen and grazer specific, grazing by zooplankton probably has a high contribution in the removal of pathogens in the sedimentation ponds. The results from the laboratory experiments support these findings, showing strong effects of zooplankton in the size range between 5 and 25 μm on the mortality rate of *E.coli*. Because the total grazing rate in the helophyte fields (zooplankton + epifauna) was equal or higher compared with the sedimentation ponds, a similar effect could be expected in the helophyte fields, although correlation coefficients between grazing rates and pathogen removal were much weaker than in the sedimentation ponds. This does not necessarily exclude grazing as an important factor in pathogen removal in the reed ditches, but it might suggest that there are other processes besides grazing largely contributing to the removal of pathogens in the helophyte fields. The trapping of particles including bacteria and pathogens in biofilms is another type of biofiltration that could contribute to the pathogen removal in helophyte fields. The submerged parts of the reed stems create a large surface area for biofilm growth and a large surface-to-water ratio in the helophyte fields. Several studies investigated the possibility of biofilm to retain small sized particles like bacteria and concluded that biofilm is capable of capture and retaining large quantities of particles (Balzer *et al.*; Drury *et al.* 1993; Eisenmann *et al.* 2001; Stott & Tanner 2005). Stott & Tanner (2005) showed that the capture of particles by biofilm is possible for particles in the size range of viruses (0.1 μm), bacteria (1 μm) and parasitic protozoa (4.5 μm). The same study also observed that the capacity of particles trapping is higher for autotrophic than for heterotrophic biofilm (Stott & Tanner 2005). Most of these studies however used latex beads as model particles which could have different properties than actual pathogens. Studies on the mutual contribution of biofilm entrapment and grazing of particles are lacking. A study by (Chabaud *et al.* 2006) showed that grazing protozoa in biofilm accounted for 60% of the total removal of bacteria from septic effluent and showed no effect of biofilm entrapment.

The influence of UltraViolet Radiation (UVR) on the removal of pathogens in treated wastewater during retention in constructed wetlands was shown by the laboratory experiments to be potentially strong and has been proven to effectively decrease the concentration of bacterial and viral organisms in surface waters, wastewater and other media (Garvey *et al.* 1998; Sommer *et al.* 2000; Craik *et al.* 2001; Brookes *et al.* 2004; Tchobanoglous *et al.* 2004; Whitman *et al.* 2004; Oteiza *et al.* 2005). Sinton *et al.* (2002) found that the inactivation of bacteria was as much as 10 times higher in sunlight than in darkness and concluded that this effect is mainly caused by UV-B radiation.

Approximately 3 to 4 percent of the total irradiance of solar radiation below 2800nm is UVR (Ziegler & Benner 2000). From the global irradiance at the weather station in Leeuwarden, approximately 20 kilometres from Grou, the average UVR during sunshine was calculated for all four seasons, which varies between 6000 in winter and 15000 mJ cm^{-2} during summer periods (Figure 7-17). When this natural UVR dose is compared with the typical UVR dose used during water treatment 20-120 mJ cm^{-2} (Tchobanoglous *et al.* 2004), it is evident that UVR could theoretically have a large contribution to the disinfection of pathogens during retention in constructed wetlands.

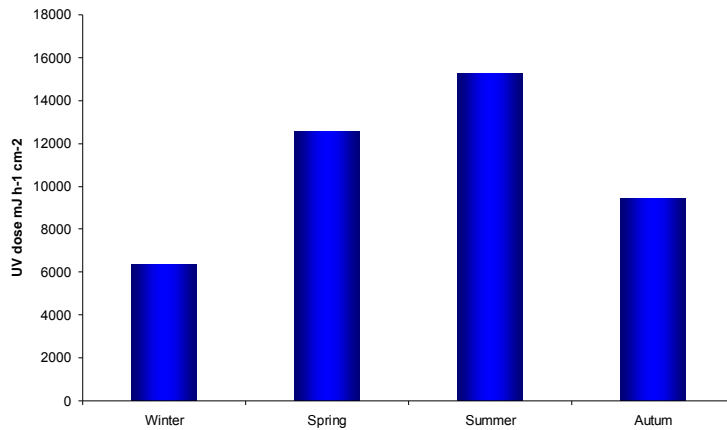


Figure 7-17 The average UV radiation (1988-2010) in winter, spring, summer and autumn in Leeuwarden, the Netherlands (data KNMI).

The impact of UVR on the disinfection of pathogens is, however, not only dependent on the irradiance, but also on the UVR attenuation in the watercolumn. The UVR attenuation coefficient determines the absorbance of UVR by the water column and therefore influences the penetration depth of UVR in the water column (Baker & Smith 1982). The relation between the attenuation of UVR and the penetration depth is formulated by Beer's law:

$$I_{uv}(z) = I_{uv(surface)} e^{-\mu z} \quad (2)$$

Where I_{uv} is the UV intensity, μ the UV attenuation coefficient and Z is the depth. The UV attenuation coefficient (K_d) of surface water is dependent on several water characteristics described by

$$K_d = K_{water} + K_{DOC} + K_{pigment} + K_{PM} + K_{residual} \quad (3)$$

Where K is the attenuation coefficient from water itself (water), dissolved organic matter (DOC), water colorations e.g. chlorophyll (pigments), particulate matter (PM) and other factors (residual) (Baker & Smith 1982). A field study by (Morris *et al.* 1995) showed that DOC concentration is one of the most important factors in the attenuation of UVR. In this study DOC concentration was founded to be a good indicator ($R^2=0.89$ $p \leq 0.001$) for the attenuation coefficient in lake waters (Morris *et al.* 1995):

$$K_{d\lambda} = \exp(-0.01347\lambda + 5.36[DOC]^{0.157}) \quad (4)$$

Where K_d is the attenuation coefficient m^{-1} , λ is the wavelength in nm and $[DOC]$ in $g C m^{-3}$. With DOC concentrations ranging between 10 and 20 $mg L^{-1}$ (data not shown) in Grou the penetration of UVR ranges from 15 till 35 cm for UVR of 380 nm and from 3 till 6 cm for UVR of 250 nm (Figure 7-18). Because of this low penetration of especially UVR of low wavelength (UV-C), which is most harmful for organisms, only a minor contribution to the disinfection of pathogens is expected for UVR in the sedimentation ponds (average depth 2m). The helophyte fields are covered by a thick layer of vegetation most of the year which will lower UV irradiance strongly (Boutilier *et al.* 2009) and reduce the disinfection capacity of UVR in the helophyte fields, even with an average water depth of 30cm.

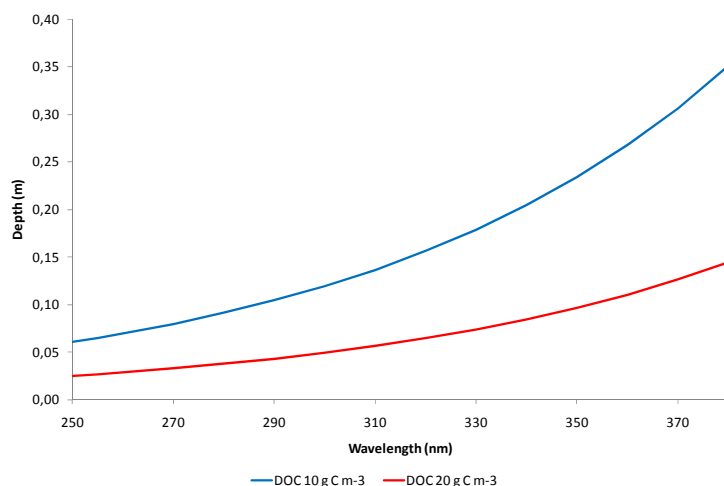


Figure 7-18 The wavelength-specific depth at which 1% of surface irradiance remains with a DOC concentration of 10 (blue) and 20 (red) g C m⁻³.

The natural mortality of pathogens, `self-inflicted` death or inactivation of cells, is another process that can contribute to the reduction in pathogen concentrations in constructed wetlands. The natural mortality of *E.coli* consists of a maintenance phase and a decay phase (Darakas 2002). The duration of the maintenance phase is temperature dependent and ranges from less than a day at 37°C till up to 13 days at 10°C, at temperatures lower than 10°C the maintenance phase shortens again. Before *E.coli* is discharged into the constructed wetlands it flows through sewage systems and a WWTP, so it could be assumed that *E.coli* in constructed wetlands is in the decay phase. The second assumption is that pathogens are not able to replicate during waste water treatment and during retention in CW's. The decay rate of *E.coli* is can be described be the first order mortality rate constant (k):

$$k = -\frac{\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right)}{t} \quad (5)$$

Where C_0 is the initial *E.coli* concentration and C_t the *E.coli* concentration at time, t (Kadlec and Knight, 1996). Several studies calculated the decay rate of *E.coli* under various incubation conditions and starving conditions (Table 7-6). These studies show that the decay rate of *E.coli* depends upon temperature (Boutilier *et al.* 2009) and oxygen concentration (Roslev *et al.* 2004). Increased temperature increased the decay rate of *E.coli*. The laboratory experiments supported the effects of temperature on the decay rate. Oxygen in the CW Grou has shown to be at low levels in CW influent ($1.2 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$) and effluent ($1.1 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$) (data not shown). The laboratory experiments also indicated a possible direct positive effect of higher oxygen levels on the decay rate of *E.coli*. Besides the direct effect of increased oxygen levels on pathogen decay rates, there is also an indirect positive effect like the increased grazing pressure by stimulating the activity of zooplankton and epifauna. Because nitrogen removal is an primarily anaerobic process, increasing the oxygen levels can negatively affect nitrogen removal. Increasing the oxygen levels in CW's for improving the disinfection capacity should therefore be performed after nitrogen removal. The presence of other organisms in field samples also seems to have a high impact (Menon *et al.* 2003; Schijven *et al.* 2007). However, none of these studies demonstrate the natural mortality of *E.coli* representative for WTP effluent in constructed wetlands. Most studies either using cultured *E.coli* and or untreated fieldwater. Cultered *E.coli* probably has a lower fitness at the start of the experiment than *E.coli* present in WTP effluent. Using untreated field water subjects *E.coli* to more factors inducing mortality (e.g. grazing). Our laboratory experiments showed however that with reduced predation pressure for zooplankton and

good conditions (temperature, pH, and oxygen levels) *E.coli* can actually grow instead of decrease. More research is needed to quantify the natural mortality of *E.coli* and other pathogens in natural environments.

Table 7-6 The decay rate of *E.coli* at different temperatures, incubation conditions and *E.coli* source.

k ($\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$)			Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Notes	Ref
Min	Max	Average (s.d.)			
7.9	33.9		20.0	Labelled <i>E.coli</i> incubated in field samples	Menon et al., 2003
		3.8	7.6	Lab incubations in dark of field samples	Boutilier et al., 2009
		7.5	22.8	Lab incubations in dark of field samples	Boutilier et al., 2009
0.83	1.25		17.0	Field incubations of field samples	Boutilier et al., 2009
4.58	14.58	12.9	9.0	Aerobic incubation of lab culture and raw wastewater	Roslev et al., 2004
		0.8	9.0	Anaerobic incubation of lab culture and raw wastewater	Roslev et al., 2004
		2.7	20.0	Lab incubations of lab culture	Schijven et al., 2007
		41.9 (41.5)		Field data (sedimentation ponds, Grou)	this study
		95.1 (115.3)		Field data (reed beds, Grou)	this study

Although a small sample size, the concentrations of bacteriophages indicated that there was no significant external input by organisms like birds. Observations showed that the abundance of water birds on the sedimentation ponds can be very high (estimation: 100-200 individuals), especially during freezing winter periods, because of the relative high water temperature of WWTP effluent, prevents ice cover. It would be expected that the influence of external input on the concentration of pathogens would be high during this period. This is however not observed in the pathogen concentration.

The constructed wetlands in Grou, Cuijk and Hapert contained similar concentrations of *E.coli*, *Enterococci* and *C.perfringens* in their CW influent. The removal of these pathogens did however differ between the three locations. The CW in Grou was effective in decreasing all three indicator pathogens. Indication of external input were not observed in Grou. Cuijk showed decreases in both *E.coli* and *C.perfringens* concentrations, but an increase in *Enterococci* concentration. It is possible that this increase is caused by external input, because the concentration of bacteriophages not specific to human bacteriodes also increased. During the retention in the CW in Hapert all three indicator pathogens decreased, but this reduction in pathogen concentrations is low in comparison with the CW's in Grou and Cuijk. The increase in bacteriophages not specific for human bacteriodes showed that a possible cause of the low removal in Hapert is external input during the retention in the CW.

The grazing rate was similar between Grou and Cuijk, although the importance of zooplankton compared with epifauna was much higher in Cuijk than in Grou. Both zooplankton and epifauna abundance were lower in Hapert compared with Grou and Cuijk. The helophyte fields are generally more important in grazing rate than the sedimentation ponds. Amoebazoa and Ciliophora were the most important contributors to the grazing rate in all three constructed wetlands. The detailed study in Grou showed that the contribution of zooplankton smaller than $30\mu\text{m}$ was around 90% of the total grazing rate. This fraction of the zooplankton was not analysed at Cuijk and Hapert. It can be expected that the contribution of organisms smaller than $30\mu\text{m}$ will be comparable at the other CW's. The small sample size for comparing the different CW's limited further data analyses. Interpreting the results and comparing the different constructed wetlands is subjected to high uncertainty and strong conclusions are not possible.

7.6 Conclusions

The conclusions that can be derived from this report are mainly based on the detailed study in the constructed wetland in Grou. The comparison with the CW's in Cuijk and Hapert was not reliable enough for detailed and strong conclusions. High seasonal variability within a single CW and differences between CW's, recommends a detailed study of each location for reliably comparing different systems.

Looking at the general effects of constructed wetlands on the concentration of indicator pathogens it can be concluded that:

- Indicator pathogens *E.coli*, *Enterococci* and *C.perfringens* account for less than 2% of the total particle concentration of WWTP effluent.
- Constructed wetlands can be effective in reducing concentrations of indicator pathogens, *E.coli*, *Enterococci* and *C.perfringens*. The disinfection capacity averaged over a year was between 0.6 to 1.1 log₁₀.
- The removal of pathogens improved the hygienic water quality of WWTP effluent to near the quality standards regarding swimming water.
- Reed beds are more important for the disinfection of pathogens than sedimentation ponds.

The importance of different processes influencing the concentration of pathogens in constructed wetlands are summarized in Figure 7-19. To the question which processes are important for this disinfection capacity we can conclude:

- Sedimentation of suspended particles is strong in the sedimentation ponds, but has a minor influence on pathogens concentrations. Filtration of WWTP effluent over a 5 µm filter also did not influence the *E.coli* concentration. This indicates pathogens to be present in WWTP effluent as small, probably single celled particles not associated with larger particles or flocs.
- In the sedimentation ponds the grazing rates of individual groups of zooplankton correlate well with the disinfection of indicator pathogens. Differences between pathogens and correlating groups of zooplankton indicate possible selective grazing of zooplankton groups on specific pathogens.
- Ciliophora and Amoebazoa smaller than 30µm account for more than 90% of the total grazing rate of zooplankton in both sedimentation ponds and helophyte fields.
- Zooplankton between 5 and 25µm in size strongly affect the removal of pathogens.
- Epifauna and zooplankton are equally contributing to the total grazing rate in the helophyte fields.
- In the helophyte fields zooplankton grazing correlates less with the disinfection of pathogens than in the sedimentation ponds, indicating a larger contribution of other disinfection processes.
- Trapping of pathogens by biofilm, natural mortality and sedimentation could be important disinfection processes in the helophyte fields.
- Although the irradiance of sunlight is sufficient most of the year in Grou, the water depth of the sedimentation ponds and DOC concentration of the WWTP effluent minimizes the effect of UVR on the disinfection of pathogens. In the helophyte fields, shading of the water column by reed will limit influence of UVR.
- Addition of pathogens during retention in CW (Grou) seems to be insignificant. Indications of external input were more evident in other CW's, indicating strong possible differences between CW's.

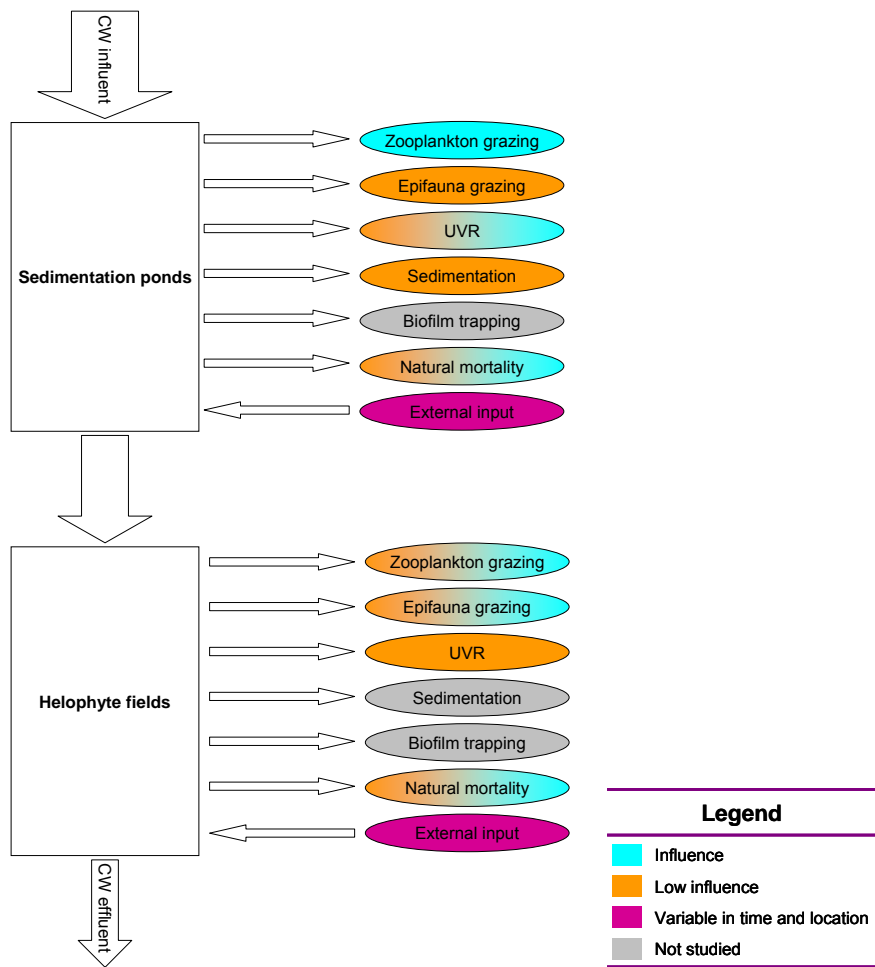


Figure 7-19 schematic representation of the flow of WWTP effluent through a constructed wetland, consisting of sedimentation ponds and helophyte fields, and an indication of the influence of individual processes on the disinfection of pathogens.

7.7 Recommendations

From this study several suggestions can be made to improve the removal of pathogens by constructed wetlands:

- Increasing the retention time of the constructed wetland, especially of the helophyte fields. This will allow all processes influencing the removal of pathogens to be more effective, resulting in lower pathogen concentrations in CW effluent. Increasing the retention time of constructed wetlands can be achieved by building larger wetlands or by reducing the flow rate (quantity) of the water.
- Increase the dissolved oxygen concentrations. Low dissolved oxygen concentration between 1 and 4 mg L⁻¹ observed (data not shown). Increasing the dissolved oxygen concentrations could increase toxic effects to anaerobic pathogens and enhance the activity and grazing of zooplankton and epifauna in the system. Increasing the dissolved oxygen concentration can be achieved by aeration, reckon with avoiding the formation of aerosols,, the construction of cascades or by including CW compartments with open water and submerged macrophytes.
- Utilizing the effects of UV-radiation. The effects of UVR can be increased by including an open water wetland compartment with low water depth. The water depths needed for effective utilisation of UVR is depending on the DOC concentrations in the water (Figure 7-20)
- Increase the surface to volume ratio of constructed wetlands. By increasing the ratio between surface area and water volume, interactions between water and biofilm and epifauna are increased. Increasing the surface area to volume ratio can be achieved by increasing the helophyte fields or building artificial honeycomb formed constructions with brushes which can be removed during cleaning actions. All previously mentioned suggestions are mostly based on adding different types of constructed wetland to the system. Different types of wetland subject the passing water to a different combination of physical, chemical and biological conditions and processes.

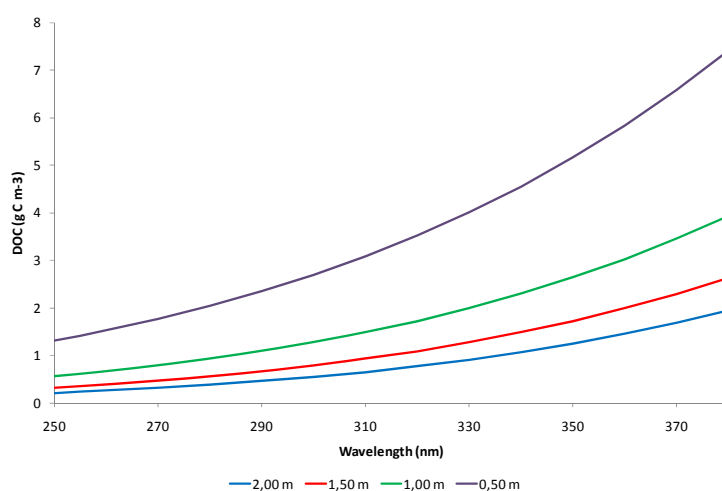


Figure 7-20 The DOC concentration needed for a UV penetration with 1% of the surface irradiance remains at a depth of 2.00m (blue), 1.50m (red), 1.00m (green) and 0.50m (purple) at specific wavelengths.

7.8 References

- Agasild, H. and Noges, T. (2005). "Cladoceran and rotifer grazing on bacteria and phytoplankton in two shallow eutrophic lakes: in situ measurement with fluorescent microspheres." *Journal of Plankton Research* 27(11): 1155-1174.
- Albright, L. J., Sherr, E. B., Sherr, B. F. and Fallon, R. D. (1987). "GRAZING OF CILIATED PROTOZOA ON FREE AND PARTICLE-ATTACHED BACTERIA." *Marine Ecology-Progress Series* 38(2): 125-129.
- Arias, C. A., Cabello, A., Brix, H. and Johansen, N. H. (2003). "Removal of indicator bacteria from municipal wastewater in an experimental two-stage vertical flow constructed wetland system." *Water Science and Technology* 48(5): 35-41.
- Ayo, B., Santamaria, E., Latatu, A., Artolozaga, I., Azua, I. and Iriberry, J. (2001). "Grazing rates of diverse morphotypes of bacterivorous ciliates feeding on four allochthonous bacteria." *Letters in Applied Microbiology* 33(6): 455-460.
- Baker, K. S. and Smith, R. C. (1982). "BIO-OPTICAL CLASSIFICATION AND MODEL OF NATURAL-WATERS .2." *Limnology and Oceanography* 27(3): 500-509.
- Balzer, M., Witt, N., Flemming, H. C. and Wingender, J. "Faecal indicator bacteria in river biofilms." *Water Science and Technology* 61(5): 1105-1111.
- Boutillier, L., Jamieson, R., Gordon, R., Lake, C. and Hart, W. (2009). "Adsorption, sedimentation, and inactivation of *E. coli* within wastewater treatment wetlands." *Water Research* 43(17): 4370-4380.
- Brookes, J. D., Antenucci, J., Hipsey, M., Burch, M. D., Ashbolt, N. J. and Ferguson, C. (2004). "Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs." *Environment International* 30(5): 741-759.
- Brusca, R. C. and Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Chabaud, S., Andres, Y., Lakel, A. and Le Cloirec, P. (2006). "Bacteria removal in septic effluent: Influence of biofilm and protozoa." *Water Research* 40(16): 3109-3114.
- Craik, S. A., Weldon, D., Finch, G. R., Bolton, J. R. and Belosevic, M. (2001). "Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation." *Water Research* 35(6): 1387-1398.
- Darakas, E. (2002). "E-coli kinetics - Effect of temperature on the maintenance and respectively the decay phase." *Environmental Monitoring and Assessment* 78(2): 101-110.
- Decamp, O., Nishitani, G., Novarino, G. and Rajendran, N. (2000). "Bacterivory of the microflagellate *Dinematomonas (Dinema) sp* (Euglenophyta = Euglenozoa p.p.) isolated from eutrophic sites of the Seto Inland Sea of Japan." *Cryptogamie Algologie* 21(3): 273-282.
- Decamp, O. and Warren, A. (1998). "Bacterivory in ciliates isolated from constructed wetlands (reed beds) used for wastewater treatment." *Water Research* 32(7): 1989-1996.
- Diaz, F. J., O'Geen, A. T. and Dahlgren, R. A. "Efficacy of constructed wetlands for removal of bacterial contamination from agricultural return flows." *Agricultural Water Management* 97(11): 1813-1821.
- Drury, W. J., Characklis, W. G. and Stewart, P. S. (1993). "INTERACTIONS OF 1 MU-M LATEX-PARTICLES WITH PSEUDOMONAS-AERUGINOSA BIOFILMS." *Water Research* 27(7): 1119-1126.
- Eisenmann, H., Harms, H., Meckenstock, R., Meyer, E. I. and Zehnder, A. J. B. (1998). "Grazing of a *Tetrahymena sp.* on adhered bacteria in percolated columns monitored by in situ hybridization with fluorescent oligonucleotide probes." *Applied and Environmental Microbiology* 64(4): 1264-1269.
- Eisenmann, H., Letsiou, I., Feuchtinger, A., Beisker, W., Mannweiler, E., Hutzler, P. and Arnz, P. (2001). "Interception of small particles by flocculent structures, sessile ciliates, and the basic layer of a wastewater biofilm." *Applied and Environmental Microbiology* 67(9): 4286-4292.
- Epstein, S. S. and Shiaris, M. P. (1992). "RATES OF MICROBENTHIC AND MEIOBENTHIC BACTERIVORY IN A TEMPERATE MUDDY TIDAL FLAT COMMUNITY." *Applied and Environmental Microbiology* 58(8): 2426-2431.

- EU (2006). "Richtlijn 2006/7/EG van het Europees Parlement en de raad van 15 februari 2006 betreffende het beheer van de zwemwaterkwaliteit en tot intrekking van richtlijn 76/160/EEG."
- Fu, Y. T., O'Kelly, C., Sieracki, M. and Distel, D. L. (2003). "Protistan grazing analysis by flow cytometry using prey labeled by in vivo expression of fluorescent proteins." *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6848-6855.
- Garvey, E., Tobiasson, J. E., Hayes, M., Wolfram, E., Reckhow, D. A. and Male, J. W. (1998). "Coliform transport in a pristine reservoir: Modeling and field studies." *Water Science and Technology* 37(2): 137-144.
- Gonzalez, J. M., Sherr, E. B. and Sherr, B. F. (1990). "SIZE-SELECTIVE GRAZING ON BACTERIA BY NATURAL ASSEMBLAGES OF ESTUARINE FLAGELLATES AND CILIATES." *Applied and Environmental Microbiology* 56(3): 583-589.
- Hart, R. C. and Jarvis, A. C. (1993). "INSITU DETERMINATIONS OF BACTERIAL SELECTIVITY AND FILTRATION-RATES BY 5 CLADOCERAN ZOOPLANKTERS IN A HYPERTROPHIC SUBTROPICAL RESERVOIR." *Journal of Plankton Research* 15(3): 295-315.
- ISO-6461-2 (1986). "Water quality -- Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) -- Part 2: Method by membrane filtration."
- ISO-10705-4 (2001). "Water quality -- Detection and enumeration of bacteriophages -- Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*."
- ISO/TC-147/SC4/WG5 "Microbiological methods: Sulfite reducing clostridium."
- Kampf, R. (2003). De Waterharmonica tussen afvalwaterketen en oppervlaktewater: van effluent tot bruikbaar oppervlaktewater. , In: Graaf JHGJM vd (editor). PAO cursus Effluent van de toekomst, 22,23 en 24 januari 2003, Delft, Stichting Postacademisch Onderwijs, 2003.
- Karim, M. R., Manshadi, F. D., Karpiscak, M. M. and Gerba, C. P. (2004). "The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands." *Water Research* 38(7): 1831-1837.
- King, C. H., Sanders, R. W., Shotts, E. B. and Porter, K. G. (1991). "DIFFERENTIAL SURVIVAL OF BACTERIA INGESTED BY ZOOPLANKTON FROM A STRATIFIED EUTROPHIC LAKE." *Limnology and Oceanography* 36(5): 829-845.
- Knoechel, R. and Holtby, L. B. (1986). "CLADOCERAN FILTERING RATE - BODY LENGTH RELATIONSHIPS FOR BACTERIAL AND LARGE ALGAL PARTICLES." *Limnology and Oceanography* 31(1): 195-200.
- Knox, A. K., Dahgren, R. A., Tate, K. W. and Atwill, E. R. (2008). "Efficacy of natural wetlands to retain nutrient, sediment and microbial pollutants." *Journal of Environmental Quality* 37(5): 1837-1846.
- Kuppardt, S., Chatzinotas, A. and Kastner, M. (2010). "Development of a Fatty Acid and RNA Stable Isotope Probing-Based Method for Tracking Protist Grazing on Bacteria in Wastewater." *Applied and Environmental Microbiology* 76(24): 8222-8230.
- Menon, P., Billen, G. and Servais, P. (2003). "Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems." *Water Research* 37(17): 4151-4158.
- Molleda, P., Blanco, I., Ansoola, G. and de Luis, E. (2008). "Removal of wastewater pathogen indicators in a constructed wetland in Leon, Spain." *Ecological Engineering* 33(3-4): 252-257.
- Morris, D. P., Zagarese, H., Williamson, C. E., Balseiro, E. G., Hargreaves, B. R., Modenutti, B., Moeller, R. and Queimalinos, C. (1995). "The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon." *Limnology and Oceanography* 40(8): 1381-1391.
- NEN-EN-872 (2005). "Water quality - Determination of suspended solids - Method by filtration through glass fibre filters."
- NEN-EN-ISO-7899-2 (2000). "Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method."
- NEN-EN-ISO-8199 (2007). "Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture."
- NEN-EN-ISO-9308-1 (2000). "Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method."
- OomsWilms, A. L. (1997). "Are bacteria an important food source for rotifers in eutrophic lakes?" *Journal of Plankton Research* 19(8): 1125-1141.

- Oomswilms, A. L., Postema, G. and Gulati, R. D. (1993). "CLEARANCE RATES OF BACTERIA BY THE ROTIFER FILINIA-LONGISETA (EHRB) MEASURED USING 3 TRACERS." *Hydrobiologia* 255: 255-260.
- Oomswilms, A. L., Postema, G. and Gulati, R. D. (1995). "EVALUATION OF BACTERIVORY OF ROTIFERA BASED ON MEASUREMENTS OF IN-SITU INGESTION OF FLUORESCENT PARTICLES, INCLUDING SOME COMPARISONS WITH CLADOCERA." *Journal of Plankton Research* 17(5): 1057-1077.
- Oteiza, J. M., Peltzer, M., Gannuzzi, L. and Zaritzky, N. (2005). "Antimicrobial efficacy of UV radiation on *Escherichia coli* O157 : H7 (EDL 933) in fruit juices of different absorptivities." *Journal of Food Protection* 68(1): 49-58.
- Pickup, Z. L., Pickup, R. and Parry, J. D. (2007). "Growth of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey." *Fems Microbiology Ecology* 61(2): 264-272.
- Porter, K. G., Feig, Y. S. and Vetter, E. F. (1983). "MORPHOLOGY, FLOW REGIMES, AND FILTERING RATES OF DAPHNIA, CERIODAPHNIA, AND BOSMINA FED NATURAL BACTERIA." *Oecologia* 58(2): 156-163.
- Quinonez-Diaz, M. D., Karpiscak, M. M., Ellman, E. D. and Gerba, C. P. (2001). "Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a constructed wetland receiving untreated domestic wastewater." *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 36(7): 1311-1320.
- Reinoso, R., Torres, L. A. and Becares, E. (2008). "Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater." *Science of the Total Environment* 395(2-3): 80-86.
- Rogerson, A., Hannah, F. and Gothe, G. (1996). "The grazing potential of some unusual marine benthic amoebae feeding on bacteria." *European Journal of Protistology* 32(2): 271-279.
- Ronneberger, D. (1998). "Uptake of latex beads as size-model for food of planktonic rotifers." *Hydrobiologia* 387: 445-449.
- Roslev, P., Bjergbaek, L. A. and Hesselsoe, M. (2004). "Effect of oxygen on survival of faecal pollution indicators in drinking water." *Journal of Applied Microbiology* 96(5): 938-945.
- Sanders, R. W., Porter, K. G., Bennett, S. J. and Debiase, A. E. (1989). "SEASONAL PATTERNS OF BACTERIVORY BY FLAGELLATES, CILIATES, ROTIFERS, AND CLADOCERANS IN A FRESH-WATER PLANKTONIC COMMUNITY." *Limnology and Oceanography* 34(4): 673-687.
- Schijven, J. F., Colin, M., Dullemont, Y., Hijnen, W. A. M., Magic-Knezev, A., Oorthuizen, W., Rutjes, S. A. and de Roda Husman, A. M. (2007). Verwijdering van Micro-organismen door langzame zandfiltratie, RIVM rapport 330204/2007.
- Schreijer, M., Kampf, R., Toet, S. and Verhoeven, J. (1997). "The use of constructed wetlands to upgrade treated sewage effluents before discharge to natural surface water in Texel Island, The Netherlands - Pilot study." *Water Science and Technology* 35(5): 231-237.
- Sherr, B. F., Sherr, E. B. and Fallon, R. D. (1987). "USE OF MONODISPERSED, FLUORESCENTLY LABELED BACTERIA TO ESTIMATE INSITU PROTOZOAN BACTERIVORY." *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 958-965.
- Sherr, B. F., Sherr, E. B. and Rassoulzadegan, F. (1988). "RATES OF DIGESTION OF BACTERIA BY MARINE PHAGOTROPHIC PROTOZOA - TEMPERATURE-DEPENDENCE." *Applied and Environmental Microbiology* 54(5): 1091-1095.
- Sinton, L. W., Hall, C. H., Lynch, P. A. and Davies-Colley, R. J. (2002). "Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters." *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 1122-1131.
- Sommer, R., Lhotsky, M., Haider, T. and Cabaj, A. (2000). "UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water." *Journal of Food Protection* 63(8): 1015-1020.
- Starink, M., Krylova, I. N., Bargilissen, M. J., Bak, R. P. M. and Cappenberg, T. E. (1994). "RATES OF BENTHIC PROTOZOAN GRAZING ON FREE AND ATTACHED SEDIMENT BACTERIA MEASURED WITH FLUORESCENTLY STAINED SEDIMENT." *Applied and Environmental Microbiology* 60(7): 2259-2264.

- Stott, R., May, E. and Mara, D. D. (2003). "Parasite removal by natural wastewater treatment systems: performance of waste stabilisation ponds and constructed wetlands." *Water Science and Technology* 48(2): 97-104.
- Stott, R., May, E., Matsushita, E. and Warren, A. (2001). "Protozoan predation as a mechanism for the removal of cryptosporidium oocysts from wastewaters in constructed wetlands." *Water Science and Technology* 44(11-12): 191-198.
- Stott, R. and Tanner, C. C. (2005). Influence of biofilm on removal of surrogate faecal microbes in a constructed wetland and maturation pond.
- Streble, H. and Krauter, D. (2006). *Das Leben im Wassertropfen*. Stuttgart, Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L. and Stensel, H. D. (2004). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* New York, McGraw-Hill.
- Toet, S., Van Logtestijn, R. S. P., Schreijer, M., Kampf, R. and Verhoeven, J. T. A. (2005). "The functioning of a wetland system used for polishing effluent from a sewage treatment plant." *Ecological Engineering* 25(1): 101-124.
- Vaque, D., Gasol, J. M. and Marrase, C. (1994). "GRAZING RATES ON BACTERIA - THE SIGNIFICANCE OF METHODOLOGY AND ECOLOGICAL FACTORS." *Marine Ecology-Progress Series* 109(2-3): 263-274.
- Whitman, R. L., Nevers, M. B., Korinek, G. C. and Byappanahalli, M. N. (2004). "Solar and temporal effects on *Escherichia coli* concentration at a lake Michigan swimming beach." *Applied and Environmental Microbiology* 70(7): 4276-4285.
- Ziegler, S. and Benner, R. (2000). "Effects of solar radiation on dissolved organic matter cycling in a subtropical seagrass meadow." *Limnology and Oceanography* 45(2): 257-266.

Annex

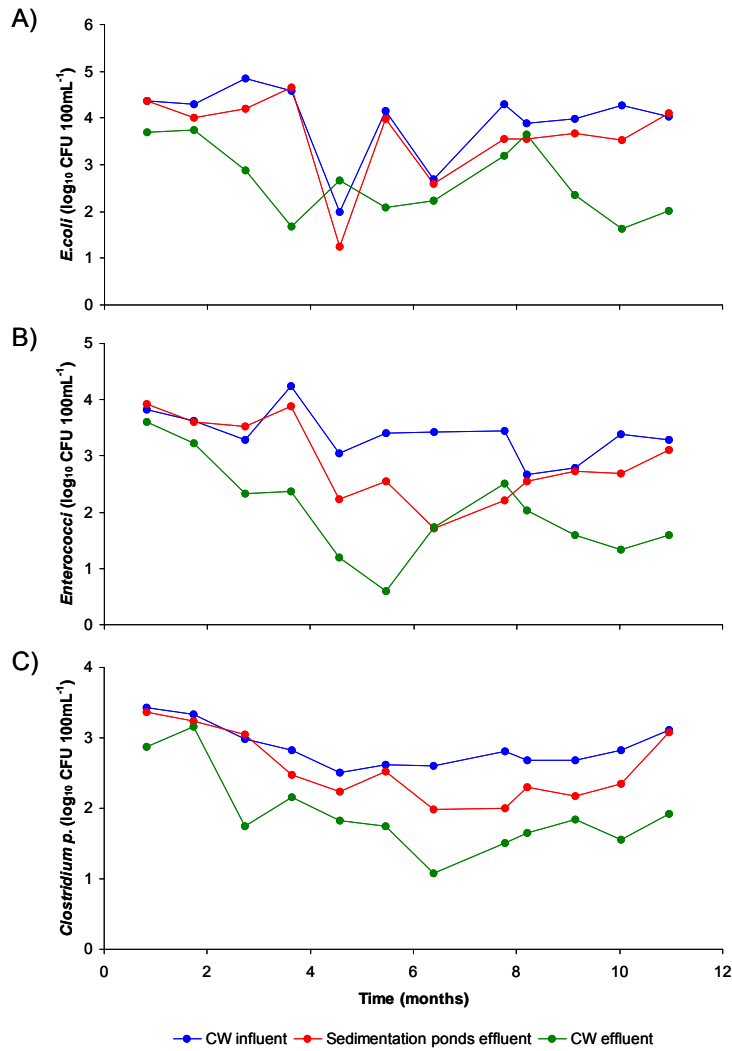


Figure A1. The concentration of *E.coli* (A), *Enterococci* (B) and *C.perfringens* (C) in CW influent (blue), sedimentation ponds effluent (red) and CW effluent (green) from January till December 2010.

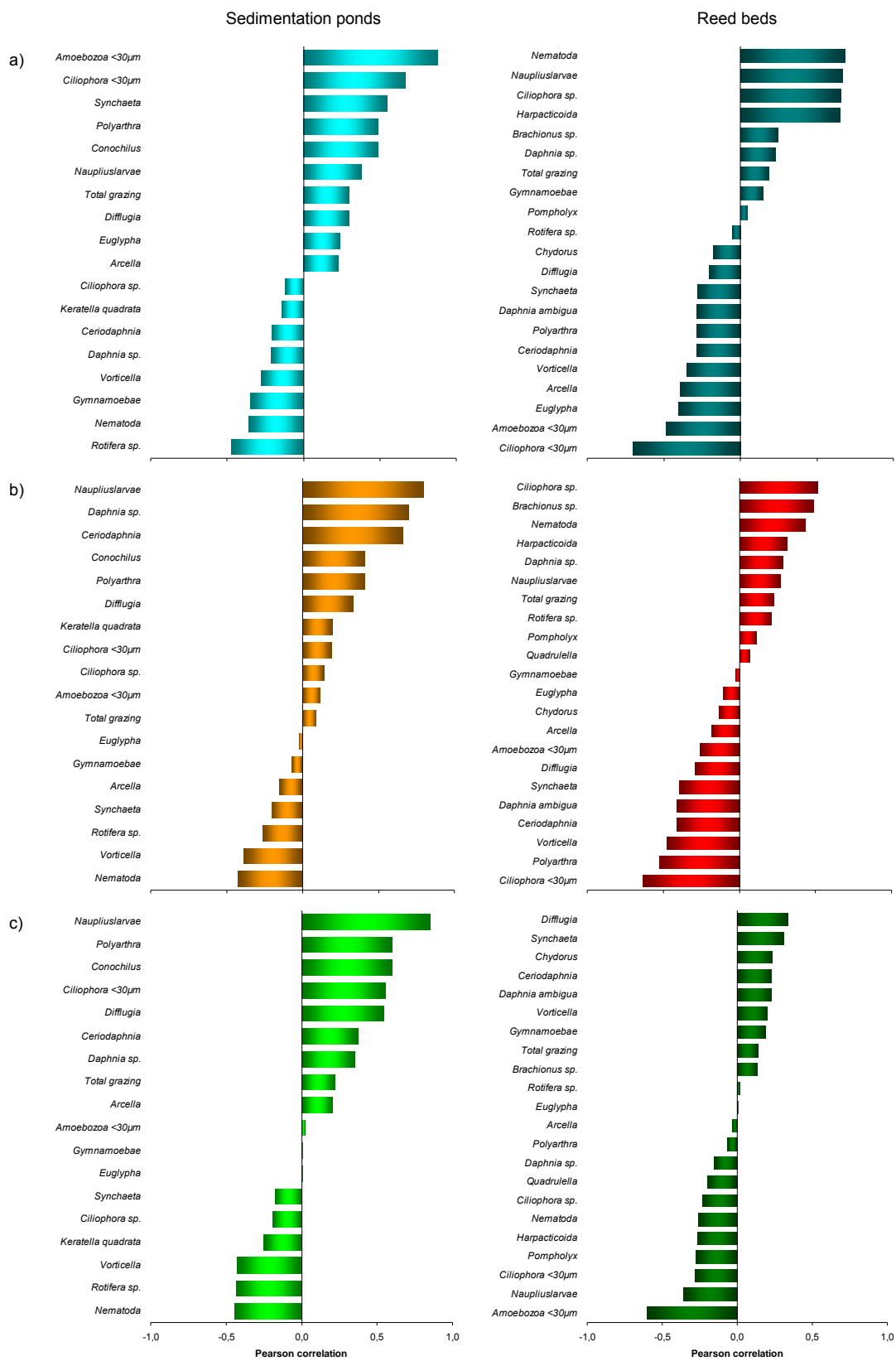


Figure A2. The Pearson's correlation coefficients between the removal of *E. coli* (a), *Enterococci* (b) and *C. perfringens* (c) and the grazing rates of the total zooplankton community and individual genera/species in the sedimentation ponds (left) and helophyte fields (right).

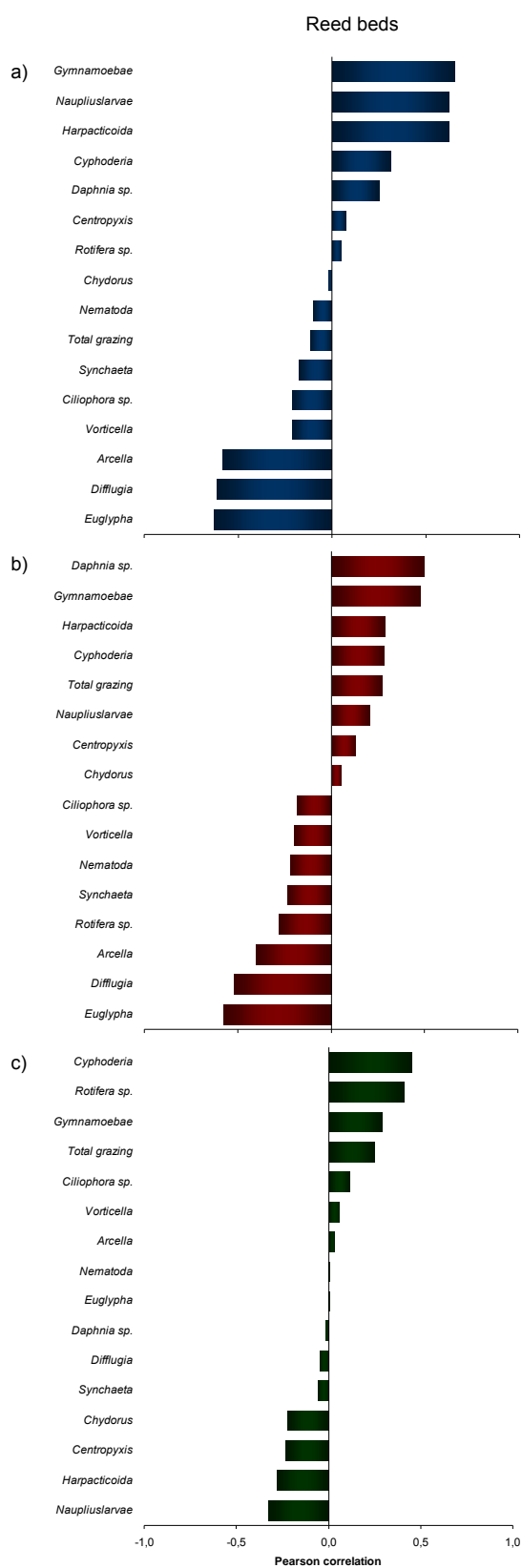


Figure A3. The Pearson's correlation coefficients between the removal of *E.coli* (a), Enterococci (b) and *C.perfringens* (c) and the grazing rates of the total epifauna community and individual genera/species in the helophyte fields.

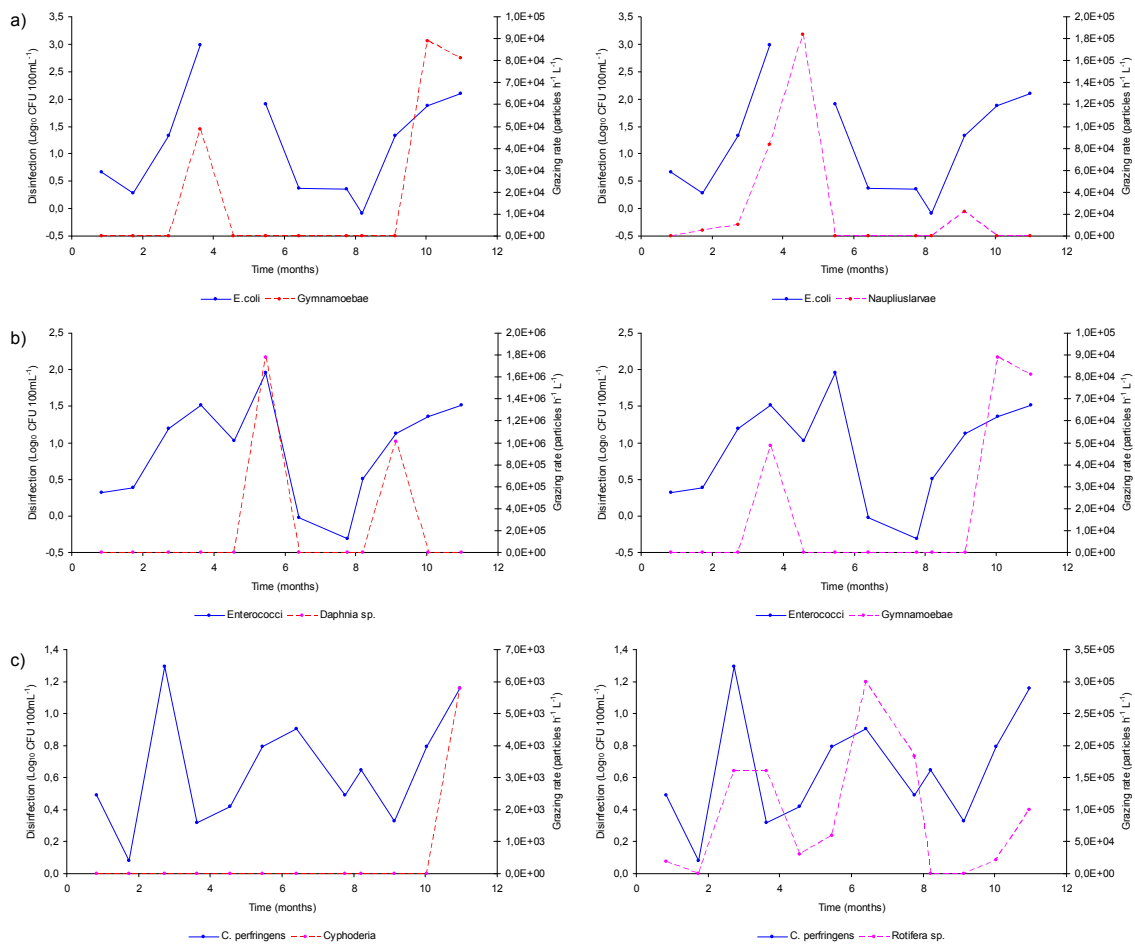


Figure A4. The disinfection (blue) of *E.coli* (A), Enterococci (B) and *C.perfringens* (C) in the helophyte fields and the grazing rate of the strongest correlating epifauna organisms (left, right) from January to December 2010.

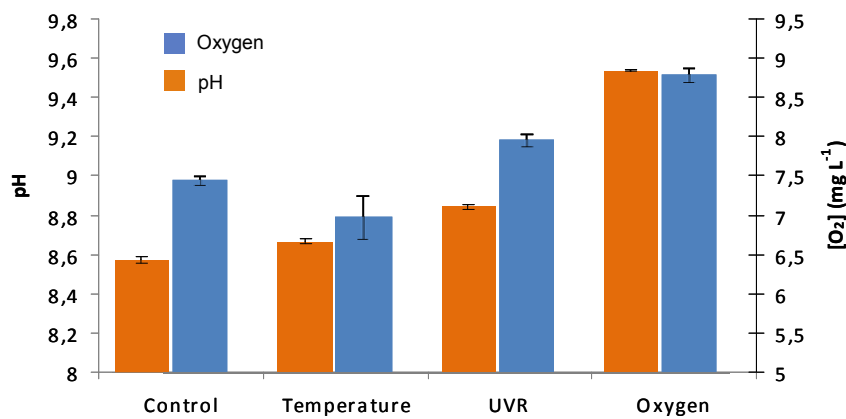


Figure A5 Mean oxygen concentrations (blue) and pH (orange) of the incubated samples from Grou (n=9 for each bar). Error bars represent s.e.

Table A.1. Hydrobiological data from the sedimentation ponds. Values represent the average abundance (\pm s.e.). Bold values are derived from lower taxonomic groups except Amoebzoa and ciliophora <30 μ m. Samples were taken monthly during 2010 (n \geq 9).

Sedimentation ponds							Literatuur
	Abundance no. L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > μ L L ⁻¹	Biovolume μ L L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > Particles individual ⁻¹ h ⁻¹	Grazing rate Particles individual ⁻¹ h ⁻¹		
Phytoplankton	1185962 (1905895)		6813 (14075)				
<i>Bacillariophyceae</i>	142782 (104452)	0.00438	625 (458)			Streble & Krauter 2006	
<i>Chlorophyceae</i>	726693 (1664989)	0.00828	6017 (13786)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989	
<i>Chrysophyceae</i>	13908 (38231)	0.00003	0 (1)			Streble & Krauter 2006	
<i>Cryptophyceae</i>	245583 (559708)	0.00003	8 (17)			Streble & Krauter 2006	
<i>Cyanophyceae</i>	23961 (37261)	0.00425	102 (158)			Streble & Krauter 2006	
<i>Dinophyceae</i>	0 (0)	0.00070	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Decamp et al. 2000	
<i>Euglenophyceae</i>	33035 (38672)	0.00184	61 (71)			Streble & Krauter 2006	
<i>Xanthophyceae</i>	0 (0)	0.00003	0 (0)			Streble & Krauter 2006	
Zooplankton	147755 (213420)		101 (233)		9031630 (12566419)		
Amoebzoa	<30 μm	187942 (223018)	0.00001	3 (3)	2	375885 (446036)	Rogerson et al. 1996;
	>30 μm	114 (181)	0 (0)	0 (0)		23976 (36234)	
Arcellinida		107 (178)	0 (0)	0 (0)		21364 (35104)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Arcella</i>	96 (163)	0.00075	0 (0)	200 †		19156 (32637)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Centropyxis</i>	0 (0)	0.00332	0 (0)	329 †		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Diffugia</i>	3 (5)	0.00214	0 (0)	284 †		713 (1550)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Quadrullella</i>	0 (0)	0.00868	0 (0)	453 †		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Cyphoderia</i>	0 (0)	0.00014	0 (0)	115 †		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Euglypha</i>	9 (20)	0.00041	0 (0)	164 †		1494 (3328)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Gymnamoebae</i>	7 (14)	0.00006	0 (0)	405		2612 (5607)	Streble & Krauter 2006; Pickup et al. 2007
<i>Chironomidae</i>	0 (1)	1.02447	0 (1)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006
Ciliophora	<30 μm	32039 (35391)	0.13816	0 (1)	388	12430938 (13731590)	Kuppardt et al. 2010; Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Decamp et al. 2000; Decamp & Warren 1998; Epstein & Shiaris 1992; King et al. 1991; Sanders et al. 1989; Albright et al. 1987; Sherr et al. 1987
	>30 μm	877 (1512)	0 (0)	0 (1)		443250 (598313)	
<i>Ciliophora sp.</i>	200 (251)	0.00001	0 (0)	950		190412 (238875)	Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Sherr et al. 1987
<i>Suctorina</i>	21 (43)	0.00002	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Tintinnopsis</i>	0 (0)	0.00257	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
<i>Vorticella</i>	655 (1548)	0.00041	0 (1)	386		252838 (597386)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
Cladocera		8 (22)	0 (1)			16809 (48272)	
<i>Acroperus harpae</i>	0 (0)	0.06545	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Alona</i>	0 (0)	0.09954	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Bosmina</i>	0 (0)	0.19953	0 (0)	1254		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Ceriodaphnia</i>	0 (1)	0.52360	0 (1)	1500 †		439 (1519)	Streble & Krauter 2006
<i>Chydorus</i>	0 (0)	0.03351	0 (0)	1561		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Cladocera sp.</i>	0 (0)	0.40330	0 (0)				Streble & Krauter 2006
Daphnia		4 (11)	83 (236)			16370 (46765)	
		4 (11)	22.44930	83 (236)	4440	16370 (46765)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>ambigua</i>	0 (0)	0.16319	0 (0)	4550		0 (0)	Streble & Krauter 2006; King et al. 1991
<i>Eurycerus</i>	0 (0)	32.28933	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Graptoleberis</i>	0 (0)	0.17959	0 (0)				Streble & Krauter 2006
Pleuroxus		0 (0)	0 (0)				
<i>sp.</i>	0 (0)	0.12783	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>truncatus</i>	0 (0)	0.14379	0 (0)				Streble & Krauter 2006
Copepoda		0 (0)	0 (0)				
<i>Cyclopoida</i>	0 (0)	0.50302	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005; Oomswilms et al. 1995
<i>Harpacticoida</i>	0 (0)	0.23731	0 (0)	42		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Dreissena-larvae</i>	0 (0)	0.00257	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Gastrotricha</i>	0 (0)	0.06764	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Hydrachnellae</i>	0 (1)	0.08711	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Hydrachnellae-larvae</i>	0 (0)	0.00457	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Naupliuslarvaen</i>	1 (2)	0.40259	0 (1)	33		33 (49)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Nematoda</i>	10 (11)	0.58620	5 (7)	21		197 (235)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Oligochaeta</i>	2 (4)	0.16723	0 (1)				Streble & Krauter 2006
<i>Ostracoda</i>	0 (1)	0.00171	0 (0)				Streble & Krauter 2006
Rotifera		54 (44)	7 (9)			57 (196)	
<i>Asplanchna</i>	1 (2)	1.62951	1 (3)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
Brachionus		0 (0)	0 (0)				
<i>sp.</i>	0 (0)	0.01839	0 (0)	880		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>calyciflorus</i>	0 (0)	0.01797	0 (0)	880		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Cephalodella</i>	7 (14)	0.00974	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Colurella</i>	4 (5)	0.00027	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Conochilus</i>	0 (1)	0.02873	0 (0)	11600		4035 (13977)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Euchlanis</i>	1 (2)	0.06545	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Filinia</i>	0 (0)	0.00235	0 (0)	1970		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995; Oomswilms et al. 1993
Keratella		0 (1)	0 (0)			57 (196)	
<i>sp.</i>	0 (0)	0.00419	0 (0)	232 †		0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>cochlearis</i>	0 (0)	0.00596	0 (0)	185		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>quadrata</i>	0 (1)	0.00419	0 (0)	280		57 (196)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Lecane</i>	4 (8)	0.00186	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Lepadella</i>	6 (12)	0.00052	0 (0)				Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
Notholca		0 (0)	0 (0)				
<i>labis</i>	0 (0)	0.09954	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>squamula</i>	0 (0)	0.00144	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Notommata</i>	23 (29)	0.00177	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Platylas</i>	0 (0)	0.00947	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Polyarthra</i>	0 (0)	0.00115	0 (0)	125		11 (38)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Pompholyx</i>	0 (0)	0.00049	0 (0)	525		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005
<i>Rotaria</i>	4 (14)	0.15398	1 (2)				Streble & Krauter 2006
<i>Rotifera sp.</i>	25 (37)	0.22658	6 (8)	200 †		4967 (7349)	Streble & Krauter 2006
<i>Squatinella</i>	0 (0)	0.00144	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Synchaeta</i>	2 (4)	0.02599	0 (0)	260		414 (1037)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Testudinella</i>	0 (0)	0.00177	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Trichocerca</i>	0 (1)	0.02761	0 (0)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Trichotria</i>	0 (0)	0.00080	0 (0)				Streble & Krauter 2006
<i>Tardigrada</i>	1 (2)	0.46636	0 (1)	0		0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Turbellaria</i>	19 (61)	0.06545	1 (4)				Streble & Krauter 2006

Table A.2. Hydrobiological data from the helophyte fields. Values represent the average abundance (\pm s.e.). Bold values are derived from lower taxonomic groups except Amoebozoa and ciliophora <30 μ m. Samples were taken monthly during 2010 (n \geq 9).

							Reed beds			
		Abundance no. L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > μ L L ⁻¹	Biovolume μ L L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > Particles individual ⁻¹ h ⁻¹	Grazing rate Particles individual ⁻¹ h ⁻¹	Literatuur			
Phytoplankton		1758223 (3459649)		8317 (16527)						
Bacillariophyceae		1294965 (2994569)	0.00438	5672 (13117)			Streble & Krauter 2006			
Chlorophyceae		297665 (433936)	0.00828	2465 (3593)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989			
Chrysophyceae		1305 (2847)	0.00003	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Cryptophyceae		114440 (251846)	0.00003	4 (8)			Streble & Krauter 2006			
Cyanophyceae		35438 (49944)	0.00425	151 (212)			Streble & Krauter 2006			
Dinophyceae		0 (0)	0.00070	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Decamp et al. 2000			
Euglenophyceae		14411 (17542)	0.00184	26 (32)			Streble & Krauter 2006			
Xanthophyceae		0 (0)	0.00003	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Zooplankton		142119 (172172)		479 (811)		14212729 (20642117)				
Amoebozoa		160450 (155396)	0.00001	2 (2)	2	320900 (310792)	Rogerson et al. 1996;			
<30 μ m										
>30 μ m		98 (138)		0 (0)		22357 (28216)				
Arcellinida		94 (137)		0 (0)		20545 (27834)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996			
Arcella		73 (127)	0.00075	0 (0)	200 †	14596 (25482)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996			
Centropxyxis		0 (0)	0.00332	0 (0)	329 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996			
Diffugia		17 (23)	0.00214	0 (0)	284 †	4736 (6635)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996			
Quadrullella		2 (7)	0.00868	0 (0)	453 †	863 (2991)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996			
Cyphoderia		0 (0)	0.00014	0 (0)	115 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996			
Euglypha		2 (5)	0.00041	0 (0)	164 †	349 (837)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996			
Gymnamoebae		4 (9)	0.00006	0 (0)	405	1812 (3580)	Streble & Krauter 2006; Pickup et al. 2007			
Chironomidae		3 (7)	1.02447	3 (7)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006			
Ciliophora		49507 (60315)	0.13816	1 (1)	388	19208619 (23402281)	Kuppardt et al. 2010; Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Decamp et al. 2000; Decamp & Warren 1998; Epstein & Shiaris 1992; King et al. 1991; Sanders et al. 1989; Albright et al. 1987; Sherr et al. 1987			
<30 μ m										
>30 μ m		1379 (1535)		0 (1)		1007778 (1038155)				
Ciliophora sp.		844 (1111)	0.00001	0 (0)	950	801757 (1055544)	Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Sherr et al. 1987			
Suctorina		1 (2)	0.00002	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006			
Tintinnopsis		0 (1)	0.00257	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989			
Vorticella		534 (1436)	0.00041	0 (1)	386	206020 (554212)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989			
Cladocera		76 (148)		15 (50)		140879 (268408)				
Acroperus harpae		0 (0)	0.06545	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Alona		0 (0)	0.09954	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Bosmina		0 (0)	0.19953	0 (0)	1254	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Ceriodaphnia		28 (95)	0.52360	15 (50)	1500 ‡	41670 (142765)	Streble & Krauter 2006			
Chydorus		7 (9)	0.03351	0 (0)	1561	10634 (14379)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Cladocera sp.		0 (2)	0.40330	0 (1)			Streble & Krauter 2006			
Daphnia		20 (34)		296 (639)		88575 (152251)				
Daphnia sp.		13 (28)	22.44930	294 (639)	4440	58242 (126466)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Daphnia sp. ambigua		7 (23)	0.16319	1 (4)	4550	30333 (105078)	Streble & Krauter 2006; King et al. 1991			
Eurycercus		0 (0)	32.26933	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Graptoleberis		1 (2)	0.17959	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Pleuroxus		0 (1)		0 (0)						
Pleuroxus sp.		0 (1)	0.12783	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Pleuroxus sp. truncatus		0 (0)	0.14379	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Copepoda		46 (90)		22 (44)		77 (241)				
Cyclopoida		44 (86)	0.50302	22 (43)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005; Oomswilms et al. 1995			
Harpacticoida		2 (6)	0.23731	0 (1)	42	77 (241)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992			
Dreissena-larvae		0 (0)	0.00257	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Gastrotricha		10 (16)	0.06764	1 (1)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992			
Hydrachnellae		2 (5)	0.08711	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006			
Hydrachnellae-larvae		0 (0)	0.00457	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006			
Naupliuslarvae		219 (424)	0.40259	88 (171)	33	7241 (13986)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992			
Nematoda		44 (87)	0.58620	26 (51)	21	932 (1817)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992			
Oligochaeta		54 (172)	0.18723	9 (29)			Streble & Krauter 2006			
Ostracoda		8 (9)	0.00171	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Rotifera		90 (122)		14 (17)		3667 (12702)				
Asplanchna		0 (0)	1.62951	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Brachionus		4 (14)		0 (0)		3667 (12702)				
Brachionus sp.		4 (14)	0.01839	0 (0)	880	3667 (12702)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Brachionus sp. calyciflorus		0 (0)	0.01797	0 (0)	880	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Cephalodella		10 (18)	0.00974	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006			
Colurella		44 (76)	0.00027	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Conochilus		0 (0)	0.02873	0 (0)	11600	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Euchlanis		19 (29)	0.06545	1 (2)			Streble & Krauter 2006			
Filinia		0 (0)	0.00235	0 (0)	1970	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995; Oomswilms et al. 1993			
Keratella		0 (0)		0 (0)						
Keratella sp.		0 (0)	0.00419	0 (0)	232 ‡	0 (0)	Streble & Krauter 2006			
Keratella sp. cochlearis		0 (0)	0.00596	0 (0)	185	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Keratella sp. quadrata		0 (0)	0.00419	0 (0)	280	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998			
Lecane		58 (115)	0.00186	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Lepadella		5 (12)	0.00052	0 (0)			Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Notholca		0 (0)		0 (0)						
Notholca sp. labis		0 (0)	0.09954	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Notholca sp. squamula		0 (0)	0.00144	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Notommata		17 (36)	0.00177	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Platyias		1 (3)	0.00947	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Polyarthra		1 (3)	0.00115	0 (0)	125	133 (411)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998			
Pompholyx		0 (1)	0.00049	0 (0)	525	141 (488)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005			
Rotaria		10 (25)	0.15398	2 (4)			Streble & Krauter 2006			
Rotifera sp.		48 (67)	0.22658	11 (15)	200 ‡	9599 (13491)	Streble & Krauter 2006			
Squatinella		0 (1)	0.00144	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Synchaeta		1 (3)	0.02599	0 (0)	260	246 (748)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998			
Testudinella		2 (6)	0.00177	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Trichocerca		2 (6)	0.02761	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995			
Trichotria		0 (0)	0.00080	0 (0)			Streble & Krauter 2006			
Tardigrada		3 (6)	0.46636	1 (3)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006			
Turbellaria		5 (12)	0.06545	0 (1)			Streble & Krauter 2006			

Table A.3. Hydrobiological data from the reed bed II. Values represent the average abundance (\pm s.e.). Bold values are derived from lower taxonomic groups except Amoebzoa and ciliophora <30 μ m. Samples were taken monthly during 2010 (n \geq 9).

Reed bed II						
	Abundance no. L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > μ L L ⁻¹	Biovolume μ L L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > Particles individual ⁻¹ h ⁻¹	Grazing rate Particles individual ⁻¹ h ⁻¹	Literatuur
Phytoplankton						
<i>Bacillariophyceae</i>		0.00438				Streble & Krauter 2006
<i>Chlorophyceae</i>		0.00828		0		Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
<i>Chrysophyceae</i>		0.00003				Streble & Krauter 2006
<i>Cryptophyceae</i>		0.00003				Streble & Krauter 2006
<i>Cyanophyceae</i>		0.00425				Streble & Krauter 2006
<i>Dinophyceae</i>		0.00070		0		Streble & Krauter 2006; Decamp et al. 2000
<i>Euglenophyceae</i>		0.00184				Streble & Krauter 2006
<i>Xanthophyceae</i>		0.00003				Streble & Krauter 2006
Zooplankton						
Amoebzoa	19071 (3296)		1764 (3296)		8936218 (9569903)	
	<30 μ m			2		Rogerson et al. 1996;
	>30 μ m	0.00001	12 (14)		1891260 (1865389)	
Arcellinida	7144 (14)		12 (14)		1833102 (1846381)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Arcella</i>	1542 (2)	0.00075	1 (2)	200 †	308375 (567734)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Centropyxis</i>	291 (2)	0.00332	1 (2)	329 †	95771 (220464)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Diffugia</i>	4630 (12)	0.00214	10 (12)	284 †	1317025 (1557910)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Quadrulella</i>	0 (0)	0.00868	0 (0)	453 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Cyphoderia</i>	0 (0)	0.00014	0 (0)	115 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Euglypha</i>	681 (0)	0.00041	0 (0)	164 †	111930 (137517)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Gymnamoebae</i>	144 (0)	0.00006	0 (0)	405	58158 (116945)	Streble & Krauter 2006; Pickup et al. 2007
<i>Chironomidae</i>	28 (99)	1.02447	28 (99)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
Ciliophora	<30 μ m	0.13816		388		Kuppardt et al. 2010; Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Decamp et al. 2000; Decamp & Warren 1998; Epstein & Shiaris 1992; King et al. 1991; Sanders et al. 1989; Albright et al. 1987; Sherr et al. 1987
	>30 μ m		0 (1)		6778906 (9531280)	
<i>Ciliophora sp.</i>	6835 (0)	0.00001	0 (0)	950	6493695 (9372019)	Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Sherr et al. 1987
<i>Suctorina</i>	0 (0)	0.00002	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Tintinnopsis</i>	0 (0)	0.00257	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
<i>Vorticella</i>	739 (1)	0.00041	0 (1)	386	285211 (658497)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
Cladocera						
	136 (3)		1 (3)		123333 (427239)	
<i>Acroperus harpae</i>	0 (0)	0.06545	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Alona</i>	9 (3)	0.09954	1 (3)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>Bosmina</i>	0 (0)	0.19953	0 (0)	1254	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>Ceriodaphnia</i>	0 (0)	0.52360	0 (0)	1500 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Chydorus</i>	0 (0)	0.03351	0 (0)	1561	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>Cladocera sp.</i>	0 (0)	0.40330	0 (0)			Streble & Krauter 2006
Daphnia	28 (2160)		624 (2160)		123333 (427239)	
	28 (2160)	22.44930	624 (2160)	4440	123333 (427239)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>Eurycercus</i>	0 (0)	0.16319	0 (0)	4550	0 (0)	Streble & Krauter 2006; King et al. 1991
<i>Graptoleberis</i>	0 (0)	32.26933	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Pleuroxus</i>	0 (0)	0.17959	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Pleuroxus sp.</i>	36 (16)		5 (16)			
	36 (16)	0.12783	5 (16)			Streble & Krauter 2006
<i>truncatus</i>	0 (0)	0.14379	0 (0)			Streble & Krauter 2006
Copepoda						
	108 (87)		54 (87)		0 (0)	
<i>Cyclopoida</i>	108 (87)	0.50302	54 (87)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005; Oomsuilms et al. 1995
<i>Harpacticoida</i>	0 (0)	0.23731	0 (0)	42	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Dreissena-larvae</i>	36 (0)	0.00257	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Gastrotricha</i>	196 (19)	0.06784	13 (19)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Hydrachnellae</i>	38 (11)	0.08711	3 (11)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Hydrachnellae-larvae</i>	0 (0)	0.00457	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Naupliuslarvaen</i>	736 (594)	0.40259	296 (594)	33	24284 (48656)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Nematoda</i>	922 (1581)	0.58620	540 (1581)	21	19354 (56636)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Oligochaeta</i>	180 (81)	0.16723	30 (91)		0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Ostracoda</i>	0 (0)	0.00171	0 (0)		0 (0)	Streble & Krauter 2006
Rotifera						
	824 (112)		108 (112)		5867 (20323)	
<i>Asplanchna</i>	0 (0)	1.62951	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
Brachionus	7 (0)		0 (0)		5867 (20323)	
<i>sp.</i>	7 (0)	0.01839	0 (0)	880	5867 (20323)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>calyciflorus</i>	0 (0)	0.01797	0 (0)	880	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>Cephalodella</i>	13 (0)	0.00974	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Colurella</i>	494 (0)	0.00027	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Conochilus</i>	0 (0)	0.02873	0 (0)	11600	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>Euchlanis</i>	0 (0)	0.06545	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Filinia</i>	0 (0)	0.00235	0 (0)	1970	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995; Oomsuilms et al. 1993
Keratella	0 (0)		0 (0)		0 (0)	
<i>sp.</i>	0 (0)	0.00419	0 (0)	232 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>cochlearis</i>	0 (0)	0.00596	0 (0)	185	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>quadrata</i>	0 (0)	0.00419	0 (0)	280	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Lecane</i>	152 (1)	0.00186	0 (1)			Streble & Krauter 2006
<i>Lepadella</i>	74 (0)	0.00052	0 (0)			Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
Notholca	0 (0)		0 (0)			
<i>labis</i>	0 (0)	0.09954	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>squamula</i>	0 (0)	0.00144	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Notommata</i>	270 (1)	0.00177	0 (1)			Streble & Krauter 2006
<i>Platylas</i>	15 (0)	0.00947	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Polyarthra</i>	0 (0)	0.00115	0 (0)	125	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Pompholyx</i>	0 (0)	0.00049	0 (0)	525	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005
<i>Rotaria</i>	43 (23)	0.15398	7 (23)			Streble & Krauter 2006
<i>Rotifera sp.</i>	439 (116)	0.22658	99 (116)	200 †	87798 (102792)	Streble & Krauter 2006
<i>Squatina</i>	0 (0)	0.00144	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Synchaeta</i>	21 (2)	0.02599	1 (2)	260	5417 (15139)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Testudinella</i>	22 (0)	0.00177	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Trichocerca</i>	0 (0)	0.02761	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomsuilms et al. 1995
<i>Trichotria</i>	0 (0)	0.00080	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Tardigrada</i>	64 (55)	0.46636	30 (55)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Turbellaria</i>	278 (63)	0.06545	18 (63)			Streble & Krauter 2006

Table A.4. Hydrobiological data from the reed bed II. Values represent the average abundance (\pm s.e.). Bold values are derived from lower taxonomic groups except Amoebozoa and ciliophora <30 μ m. Samples were taken monthly during 2010 (n \geq 9).

		Reed beds					Literatuur
		Abundance no. L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > μ L L ⁻¹	Biovolume μ L L ⁻¹	Conversion factor no. L ⁻¹ > Particles individual ⁻¹ h ⁻¹	Grazing rate Particles individual ⁻¹ h ⁻¹	
Phytoplankton							
<i>Bacillariophyceae</i>			0.00438				Streble & Krauter 2006
<i>Chlorophyceae</i>			0.00828		0		Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
<i>Chrysophyceae</i>			0.00003				Streble & Krauter 2006
<i>Cryptophyceae</i>			0.00003				Streble & Krauter 2006
<i>Cyanophyceae</i>			0.00425				Streble & Krauter 2006
<i>Dinophyceae</i>			0.00070		0		Streble & Krauter 2006; Decamp et al. 2000
<i>Euglenophyceae</i>			0.00184				Streble & Krauter 2006
<i>Xanthophyceae</i>			0.00003				Streble & Krauter 2006
Zooplankton		30596 (32006)		2149 (2801)		14758549 (17793312)	
Amoebozoa							
<30 μ m			0.00001		2		Rogerson et al. 1996;
>30 μ m		13897 (16467)		26 (30)		3716403 (4335628)	
<i>Arcellinida</i>		13852 (16490)		26 (30)		3698188 (4344608)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Arcella</i>		1426 (2592)	0.00075	1 (2)	200 †	285102 (518385)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Centropyxis</i>		44 (130)	0.00332	0 (0)	329 †	14418 (42826)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Diffugia</i>		11355 (13048)	0.00214	24 (28)	284 †	3229739 (3711446)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Quadrulella</i>		0 (0)	0.00868	0 (0)	453 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Cyphoderia</i>		4 (14)	0.00014	0 (0)	115 †	481 (1668)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Euglypha</i>		1024 (1637)	0.00041	0 (1)	164 †	168447 (269219)	Streble & Krauter 2006; Rogerson et al. 1996
<i>Gymnamoebae</i>		45 (84)	0.00006	0 (0)	405	18215 (34190)	Streble & Krauter 2006; Pickup et al. 2007
<i>Chironomidae</i>		0 (0)	1.02447	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
Ciliophora							
<30 μ m			0.13816		388		Kuppardt et al. 2010; Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Decamp et al. 2000; Decamp & Warren 1998; Epstein & Shiaris 1992; King et al. 1991; Sanders et al. 1989; Albright et al. 1987; Sherr et al. 1987
>30 μ m		11155 (17947)		1 (1)		9884400 (15705251)	
<i>Ciliophora sp.</i>		9891 (15569)	0.00001	0 (0)	950	9396843 (14790137)	Streble & Krauter 2006; Ayo et al. 2001; Sherr et al. 1987
<i>Suctorina</i>		0 (0)	0.00002	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Tintinnopsis</i>		0 (0)	0.00257	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
<i>Vorticella</i>		1263 (2462)	0.00041	1 (1)	386	487556 (950317)	Streble & Krauter 2006; Sanders et al. 1989
Cladocera							
<i>Acroporus harpae</i>		0 (0)	0.06545	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Alona</i>		0 (0)	0.09954	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Bosmina</i>		0 (0)	0.19953	0 (0)	1254	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Ceriodaphnia</i>		0 (0)	0.52360	0 (0)	1500 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Chydorus</i>		455 (1184)	0.03351	15 (40)	1561	710682 (1847450)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Cladocera sp.</i>		26 (68)	0.40330	10 (27)			Streble & Krauter 2006
<i>Daphnia</i>		52 (128)		1173 (2863)		232091 (566171)	
<i>Daphnia ambigua</i>		52 (128)	22.44930	1173 (2863)	4440	232091 (566171)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Eurycerus</i>		0 (0)	0.16319	0 (0)	4550	0 (0)	Streble & Krauter 2006; King et al. 1991
<i>Graptoleberis</i>		0 (0)	32.26933	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Pleuroxus</i>		0 (0)	0.17959	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Pleuroxus sp.</i>		0 (0)	0.12783	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Pleuroxus truncatus</i>		0 (0)	0.14379	0 (0)			Streble & Krauter 2006
Copepoda							
<i>Cyclopoida</i>		185 (299)		91 (147)		280 (970)	
<i>Cyclopoida</i>		178 (288)	0.50302	90 (145)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005; Oomswilms et al. 1995
<i>Harpacticoida</i>		7 (23)	0.23731	2 (5)	42	280 (970)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Dreissena-larvae</i>		6 (22)	0.00257	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Gastrotricha</i>		143 (294)	0.06764	10 (20)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Hydrachnellae</i>		0 (0)	0.08711	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Hydrachnellae-larvae</i>		8 (29)	0.00457	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Naupliuslarvaen</i>		770 (1672)	0.40259	310 (673)	33	25420 (55181)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Nematoda</i>		578 (1053)	0.58620	339 (618)	21	12137 (22122)	Streble & Krauter 2006; Epstein & Shiaris 1992
<i>Oligochaeta</i>		62 (158)	0.16723	10 (26)			Streble & Krauter 2006
<i>Ostracoda</i>		23 (60)	0.00171	0 (0)			Streble & Krauter 2006
Rotifera							
<i>Asplanchna</i>		2222 (3786)		157 (117)		0 (0)	
<i>Asplanchna</i>		20 (69)	1.62951	33 (113)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Brachionus</i>		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
<i>Brachionus sp.</i>		0 (0)	0.01839	0 (0)	880	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Brachionus calyciflorus</i>		0 (0)	0.01797	0 (0)	880	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Cephalodella</i>		7 (23)	0.00974	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Colurella</i>		562 (780)	0.00027	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Conochilus</i>		0 (0)	0.02873	0 (0)	11600	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Euchlanis</i>		33 (115)	0.06545	2 (8)			Streble & Krauter 2006
<i>Filinia</i>		0 (0)	0.00235	0 (0)	1970	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995; Oomswilms et al. 1993
<i>Keratella</i>		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
<i>Keratella sp.</i>		0 (0)	0.00419	0 (0)	232 †	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Keratella cochlearis</i>		0 (0)	0.00596	0 (0)	185	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Keratella quadrata</i>		0 (0)	0.00419	0 (0)	280	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Lecane</i>		184 (485)	0.00186	0 (1)			Streble & Krauter 2006
<i>Lepadella</i>		214 (528)	0.00052	0 (0)			Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Notholca</i>		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
<i>Notholca labis</i>		0 (0)	0.09954	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Notholca squamula</i>		0 (0)	0.00144	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Notommata</i>		1128 (2907)	0.00177	2 (5)			Streble & Krauter 2006
<i>Platyias</i>		139 (481)	0.00947	1 (5)			Streble & Krauter 2006
<i>Polyarthra</i>		0 (0)	0.00115	0 (0)	125	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Pompholyx</i>		0 (0)	0.00049	0 (0)	525	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Agasild & Noges 2005
<i>Rotaria</i>		76 (262)	0.15398	12 (40)			Streble & Krauter 2006
<i>Rotifera sp.</i>		431 (479)	0.22658	98 (108)	200 †	86223 (95732)	Streble & Krauter 2006
<i>Squatinella</i>		0 (0)	0.00144	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Synchaeta</i>		350 (1069)	0.02599	9 (28)	260	90913 (277956)	Streble & Krauter 2006; Ronneberger 1998
<i>Testudinella</i>		78 (259)	0.00177	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Trichocerca</i>		0 (0)	0.02761	0 (0)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006; Oomswilms et al. 1995
<i>Trichotria</i>		0 (0)	0.00080	0 (0)			Streble & Krauter 2006
<i>Tardigrada</i>		13 (43)	0.46636	6 (20)	0	0 (0)	Streble & Krauter 2006
<i>Turbellaria</i>		0 (0)	0.06545	0 (0)			Streble & Krauter 2006