



Bedrijfstakonderzoek  
BTO 2020.040 | Augustus 2020

**Groei en overleving  
van waterpissebedden  
op organische stof en  
water uit het  
distributienet van  
Kralingen en  
Braakman**

# Rapport

## Groei en overleving van waterpissebedden op water en organische stof uit het drinkwaterdistributienet van Kralingen en Braakman

**BTO 2020.040 | Augustus 2020**

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

### Opdrachtnummer

402045-134 en 402045-046

### Projectmanager

Dr. ir. Michiel Hootsmans

### Opdrachtgever

BTO – Bedrijfsonderzoek Evides

### Auteurs

Dr. ir. Nikki van Bel, dr. Anthony Verschoor

### Kwaliteitsborger

Prof. dr. Paul van der Wielen (gedelegeerde borger: dr.ir. Michiel Hootsmans)

### Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

### Keywords

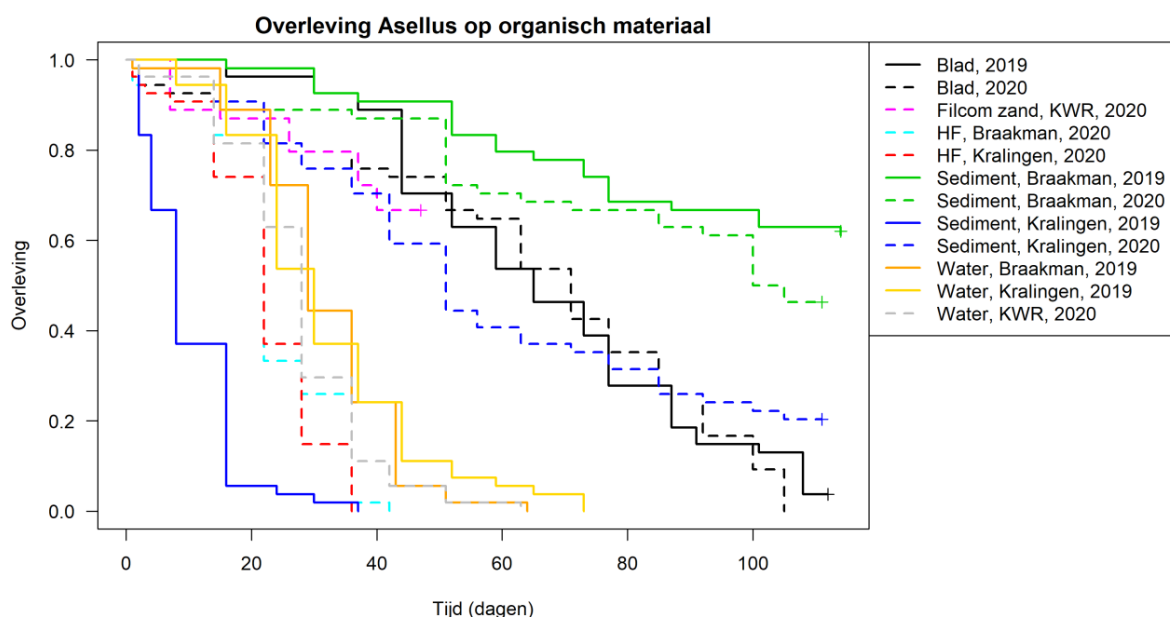
*Asellus*, *Aeromonas*, sediment, BTO, biologische stabiliteit

# Managementsamenvatting

## Niet alleen beschikbaarheid van sediment speelt een rol in de verspreiding van waterpissebedden in het distributienet

**Auteurs** dr.ir. Nikki van Bel, dr. Anthony Verschoor.

Bij de verspreiding van waterpissebedden (*Asellus*) in distributienetten speelt niet alleen de beschikbaarheid van sediment een rol. Daarnaast is mogelijk ook de biofilm op de buiswand een voedselbron en spelen mogelijk ook andere factoren in het leidingnet, b.v. de leidingconfiguratie, een rol. Dit blijkt uit onderzoek waarin met een laboratoriumopstelling de overleving van *Asellus* op sediment uit het distributiegebied van Braakman en van Kralingen met elkaar is vergeleken. Terwijl bij Kralingen veel waterpissebedden voorkomen in het distributienet en in Braakman niet of nauwelijks, was bij het experiment de overleving op het sediment van beide locaties juist omgekeerd. Het aantreffen van waterpissebedden in het distributienet lijkt gerelateerd te zijn aan aantallen van de bedrijfstechnische parameter *Aeromonas* in het drinkwater. Hiervan worden in sommige distributienetten regelmatig overschrijdingen gemeten. Met kennis over de voedselbron en verspreiding van waterpissebedden kan hun verspreiding wellicht worden beïnvloed en worden zo de *Aeromonas*-aantallen mogelijk verlaagd.



Fractie van levende waterpissebedden (*Asellus*) gedurende 16 weken op verschillende voedselbronnen (bladmateriaal, sediment, water en hemoflowconcentraat [HF])

### Belang: ophelderen verband tussen waterpissebedden en *Aeromonas*

*Aeromonas*-bacteriën zijn als bedrijfstechnische parameter opgenomen in het drinkwaterbesluit. Zij vormen een indicatie voor de biologische stabiliteit

van het drinkwater. Bij Evides is in dit verband in delen van het distributiesysteem sprake van normoverschrijdingen. Onderzoek van het waterbedrijf geeft een sterke indicatie dat *Aeromonas* in het distributienet is gerelateerd aan de

aanwezigheid van ongewervelde dieren, waaronder de waterpissebed *Asellus*. Het verband tussen de aanwezigheid van waterpissebedden en *Aeromonas* in distributienetten is nog onduidelijk. Mogelijk komen de verschillen voort uit verschillen in kwaliteit en kwantiteit van sediment en biofilm, beide van belang voor voedsel (groei, overleving) en voortplanting van de actief migrerende *Asellus*.

In dit onderzoek is bepaald of sediment, gesuspendeerd organisch materiaal en/of drinkwater van verschillende locaties invloed hebben op de groei en overleving van waterpissebedden. Hiermee ontstaat beter zicht op een mogelijk verband tussen *Asellus*, de biologische stabiliteit van het drinkwater en de aanwezigheid van sediment, zodat de aanwezigheid van *Asellus* en *Aeromonas* wellicht beperkt kan worden.

#### **Aanpak: groei en overleving waterpissebedden op verschillende voedselbronnen**

Waterpissebedden zijn in kleine bakjes geplaatst met alleen drinkwater of met daarbij een aan drinkwater gerelateerde voedselbron. Deze voedselbron betrof sediment of geconcentreerd deeltjesgebonden, gesuspendeerd organisch materiaal, afkomstig uit het distributienet van Braakman en van Kralingen (Evides). Gedurende 16 weken zijn de groei en overleving van waterpissebedden gemeten, waarna deze zijn gerelateerd aan de samenstelling van de voedselbron.

#### **Resultaten: sediment uit Braakman is een betere voedselbron voor *Asellus* dan uit Kralingen**

Waterpissebedden overleven het langst op sediment uit het distributiegebied van Braakman. Sediment uit Kralingen leidde voor de ongewervelden in één geval tot een hoge sterfte. In een tweede geval was de overleving vergelijkbaar met zand zonder voedingsstoffen. Deze resultaten zijn tegengesteld aan de praktijksituatie: in het distributienet van Kralingen komen veel waterpissebedden voor, in Braakman juist niet of nauwelijks. Geconcludeerd wordt dat behalve de beschikbaarheid van een goede voedselbron kennelijk nog andere factoren in het distributienet een rol spelen.

De herkomst van het drinkwater (KWR, Kralingen, Braakman) had geen invloed op de overleving van *Asellus*, terwijl de dieren bij het concentraat met organisch materiaal eerder dood gingen. Vermoedelijk kunnen waterpissebedden de stoffen uit het concentraat niet opnemen en is de concentratie van meerdere metalen bij elkaar te hoog.

Na een aanvankelijke toename vakt de groei van de waterpissebedden na vier weken af. Exemplaren met esdoornblad en vooral Braakman sediment als voedsel hielden nog wat langer een hogere groeisnelheid.

Met de huidige gegevens valt de overleving van *Asellus* niet duidelijk te relateren aan de chemische samenstelling van de geconcentreerde organische stof of van het sediment.

#### **Toepassing: voedselbron niet de belangrijkste factor voor verspreiding waterpissebedden**

Langdurige overleving van waterpissebedden in het distributienet kan worden veroorzaakt doordat het sediment een geschikte voedselbron vormt. Naast sediment samenstelling zijn kennelijk ook andere factoren van belang. Mogelijk zijn andere voedselbronnen aanwezig en/of spelen verschillen in leidingconfiguratie een rol waardoor meer of minder 'schuilplaatsen' worden gecreëerd met mogelijk een gunstig microklimaat. Of waterpissebedden ook de biofilm op de buiswand van het distributienet als voedselbron kunnen gebruiken, moet in vervolggelaxperimenten worden getest. Ook kunnen aanvullende testen worden gedaan om met systematische variaties in de samenstelling van het sediment het effect hiervan te onderzoeken op overleving van *Asellus*. Zo wordt inzichtelijk of met aanpassingen in de sedimentkwaliteit de overleving van waterpissebedden in het distributienet kan worden beperkt.

#### **Het Rapport**

Dit onderzoek is beschreven in het rapport Groei en overleving van waterpissebedden op water en organische stof uit het drinkwaterdistributienet van Kralingen en Braakman (BTO-2020.040).

# Voorwoord

In dit rapport worden de resultaten beschreven van twee opeenvolgende bedrijfsonderzoeken die zijn uitgevoerd in samenwerking met Evides. In beide onderzoeken zijn groei- en overlevingsexperimenten met waterpissebedden uitgevoerd, het eerste experiment is gestart in februari 2019 (bedrijfsonderzoek 2018-2019), het andere experiment in februari 2020 (bedrijfsonderzoek 2019-2020). Op verzoek van Evides worden de resultaten van beide experimenten gezamenlijk besproken in dit rapport.

# Inhoud

|                        |                                                                   |    |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|----|
| Rapport                | 1                                                                 |    |
| Managementsamenvatting | 2                                                                 |    |
| Voorwoord              | 4                                                                 |    |
| Inhoud                 | 5                                                                 |    |
| 1                      | Introductie                                                       | 7  |
| 1.1                    | Aanleiding                                                        | 7  |
| 1.2                    | Doel                                                              | 8  |
| 1.3                    | Opzet van het onderzoek                                           | 8  |
| 2                      | Materiaal en methoden                                             | 9  |
| 2.1                    | Groei- en overlevingsexperiment                                   | 9  |
| 2.1.1                  | Asellus                                                           | 9  |
| 2.1.2                  | Sediment                                                          | 9  |
| 2.1.3                  | Water                                                             | 10 |
| 2.1.4                  | Bladmateriaal                                                     | 10 |
| 2.1.5                  | Hemoflowconcentraat                                               | 10 |
| 2.1.6                  | Conditie groei- en overlevingsexperiment                          | 10 |
| 2.1.7                  | Experimentele opzet groei- en overlevingsexperiment               | 11 |
| 2.2                    | Microbiologische en chemische analyses op water en sediment       | 13 |
| 2.2.1                  | Sediment opwerken voor microbiologische analyses                  | 14 |
| 2.2.2                  | AOC-A3                                                            | 14 |
| 2.2.3                  | ATP                                                               | 15 |
| 2.2.4                  | Aeromonas                                                         | 15 |
| 2.2.5                  | LC-OCD                                                            | 15 |
| 2.2.6                  | XRF                                                               | 15 |
| 2.2.7                  | Anorganische parameters                                           | 15 |
| 2.2.8                  | ICP-MS                                                            | 15 |
| 2.3                    | Statistische analyses groei en overleving                         | 16 |
| 2.3.1                  | Opzet groei- en overlevingsexperiment                             | 16 |
| 2.3.2                  | Overleving                                                        | 16 |
| 2.3.3                  | Grootte                                                           | 17 |
| 2.3.4                  | Boxplots                                                          | 17 |
| 3                      | Resultaten groei en overleving van Asellus op organisch materiaal | 18 |
| 3.1                    | Verandering uiterlijk sediment tijdens experiment                 | 18 |
| 3.2                    | Groei en overleving                                               | 18 |
| 3.2.1                  | Overleving                                                        | 18 |
| 3.2.2                  | Groei                                                             | 21 |

|          |                                                                                                    |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3      | Chemische en microbiologische samenstelling water, sediment, hemoflowconcentraat en <i>Asellus</i> | 27        |
| 3.3.1    | Chemische samenstelling                                                                            | 27        |
| 3.3.2    | Microbiologische samenstelling                                                                     | 31        |
| <b>4</b> | <b>Discussie</b>                                                                                   | <b>34</b> |
| 4.1      | Experimentele condities: beschikbaarheid <i>Asellus</i> en sediment                                | 34        |
| 4.2      | Geschiktheid gebruikte protocol                                                                    | 34        |
| 4.2.1    | Overleving op voedselbronnen                                                                       | 34        |
| 4.2.2    | Lengtemetingen                                                                                     | 34        |
| 4.2.3    | Geschikte negatieve controle                                                                       | 35        |
| 4.3      | Rol van voedselkwaliteit voor groei en overleving                                                  | 35        |
| 4.4      | Waterkwaliteit en associatie met <i>Aeromonas</i>                                                  | 36        |
| <b>5</b> | <b>Conclusie en aanbevelingen</b>                                                                  | <b>38</b> |
| 5.1      | Conclusies                                                                                         | 38        |
| 5.2      | Aanbevelingen                                                                                      | 38        |
| <b>6</b> | <b>Referenties</b>                                                                                 | <b>40</b> |
| I        | Spuiplannen van 13-14 februari 2019, Braakman (Oostburg)                                           | 41        |
| II       | Bepaling benodigde steekproefgrootte                                                               | 43        |
| III      | Resultaten chemische analyses van drinkwater, hemoflowconcentraat en sediment                      | 49        |
| IV       | Groei van <i>Asellus</i> per conditie                                                              | 58        |

# 1 Introductie

## 1.1 Aanleiding

*Aeromonas* is een bacteriegenus dat voorkomt in allerlei watersystemen, en het kan zich ook vermeerderen in het drinkwaterdistributiesysteem (nagroeï). *Aeromonas* wordt als indicator voor de biologische stabiliteit van drinkwater gebruikt en is daarvoor opgenomen in het Drinkwaterbesluit. Hogere waarden dan 1000 kolonievormende eenheden (kve) per 100 mL zijn niet toegestaan. Evides heeft in bepaalde delen van het distributiesysteem te maken met overschrijdingen van deze waarden, waardoor er interesse is in mogelijke oorzaken van deze overschrijdingen.

De belangrijkste factoren die de groei van *Aeromonas* kunnen beïnvloeden zijn de watertemperatuur (1) en het gehalte aan voedingsstoffen in het water (2, 3). Uit gegevens van drinkwaterbedrijven blijkt dat de toename van *Aeromonas* in drinkwater start wanneer de watertemperatuur in het distributiegebied boven ongeveer 7 – 8°C uitkomt, maar dat in het najaar de daling van *Aeromonas* inzet voordat de temperatuur daalt. Dit suggereert dat naast temperatuur ook de beschikbaarheid van voedingsstoffen of andere factoren een rol spelen in het seizoenpatroon van de toename van *Aeromonas* in het drinkwater.

De belangrijkste voedingstof voor micro-organismen is het zogenaamde biologisch afbreekbaar opgelost organisch koolstof (BDOC). BDOC in drinkwater bestaat uit een grote diversiteit aan gemakkelijk en moeilijk afbreekbare organische verbindingen. BDOC en nutriënten kunnen vrijkomen uit bepaalde leidingmaterialen (b.v. PE), door afbraak van dode biomassa of worden aangevoerd vanuit de zuivering, waarbij het seizoen, de kwaliteit van de bron en de stappen in de zuivering een belangrijke rol spelen. Micro-organismen kunnen specifieke organische verbindingen benutten voor groei, en biomassa van micro-organismen kan weer als voedselbron dienen voor andere micro-organismen en voor hogere organismen zoals ongewervelde dieren.

In onderzoek van Evides is de aanwezigheid van *Aeromonas* in het distributienet gerelateerd aan de aanwezigheid van ongewervelde dieren (zoals waterpissebedden, *Asellus* spp.): in systemen met hoge aantallen *Aeromonas* worden vaak veel ongewervelde dieren aangetroffen, en vice versa. Mogelijk scheiden ongewervelde dieren stoffen uit (BDOC) die door *Aeromonas* kunnen worden benut voor groei in dit drinkwater, of kan *Aeromonas* groeien in of op de waterpissebed zelf. Vermeerdering van *Aeromonas* is waargenomen in aanwezigheid van dode, en nauwelijks in aanwezigheid van levende, waterpissebedden bij groeiproeven in verschillende systemen (zie (4, 5) en eigen onderzoek van Evides).

Aangezien er duidelijke verschillen zijn tussen distributienetten in het vóórkomen van waterpissebedden (en daarmee ook van de daaraan gecorreleerde *Aeromonas*), is de vraag waardoor dit wordt veroorzaakt. Omdat alle leidingnetten sediment en biofilm als voedselbron bevatten, en *Asellus* actief migreert in de leidingen voor voedsel en reproductie, is het vermoeden dat verschillen in *Asellus* abundantie worden veroorzaakt door de kwaliteit en kwantiteit van het aanwezige sediment en de biofilm en dat die bepalend zijn voor overleving en groei van de nieuw ontwikkelende waterpissebedden. Een goede hoeveelheid en samenstelling van organische stof in het voedsel is bepalend voor het vóórkomen van *Asellus* in hoge aantallen, en daarmee wordt mogelijk ook *Aeromonas* direct of indirect gefaciliteerd. De voor *Asellus* beschikbare organische stof in het leidingnet is aanwezig in het water, sediment en op de buiswand (biofilm). De samenstelling van de beschikbare organische stof in deze niches is vermoedelijk afhankelijk van de geleverde waterkwaliteit.

In het Evides-distributiegebied van Braakman komen nauwelijks tot geen waterpissebedden voor en zijn ook de *Aeromonas*-aantallen laag. In distributiegebieden met hoge *Aeromonas*-aantallen, zoals Kralingen en Berenplaat, komen juist veel waterpissebedden voor. Dit doet vermoeden dat water en sediment uit verschillende distributiesystemen verschillende effecten kunnen hebben op groei en/of overleving van waterpissebedden, en mogelijk dus ook op *Aeromonas*. Of dit ook daadwerkelijk zo is, en in welke mate, is onbekend en wordt in dit project onderzocht.

In dit onderzoek dient duidelijk te worden of sediment en/of drinkwater van verschillende locaties groei en overleving van waterpissebedden kan beïnvloeden. Door meer inzicht te krijgen in de invloed van de hoeveelheid en samenstelling van organische stof in het leidingnet op het vóórkomen van *Asellus* ontstaat beter zicht op een mogelijk verband met de biologische stabiliteit van het drinkwater en mogelijkheden om deze te sturen, en daarmee het vóórkomen van *Asellus* en *Aeromonas* te beperken.

## 1.2 Doel

Doel van dit onderzoek is om te achterhalen wat de invloed is van organische stof en de sediment kwaliteit uit verschillende distributiesystemen op de overleving en groei van waterpissebedden. Hierbij wordt water, organische stof en sediment van het distributienet van ps. Kralingen vergeleken met ps. Braakman. Door de grote verschillen in het voorkomen van *Asellus* in deze distributienetten is de hypothese dat de hoeveelheid, kwaliteit en/of samenstelling van het organisch materiaal verschilt en zo het vóórkomen en de overleving van *Asellus* beïnvloedt.

## 1.3 Opzet van het onderzoek

Bij KWR is in een eerder onderzoek een kweekmethode voor waterpissebedden opgezet.

Omdat onvoldoende bekend is waarmee *Asellus* zich kan voeden in het leidingnet wordt bepaald in hoeverre *Asellus* in staat is te overleven en te groeien op verschillende typen sediment en deeltjesgebonden en hoogmoleculaire organische stoffen die zich in het water bevinden. Aan de hand van de groei en overleving enerzijds, en chemische analyses anderzijds, kan inzicht worden verkregen in de samenstelling van de verschillende organische fracties.

In het najaar van 2018 is een proef-overlevingsexperiment uitgevoerd om de experimentele opzet te testen en te optimaliseren (6). De daarna uitgevoerde overlevingsexperimenten worden in dit rapport beschreven.

## 2 Materiaal en methoden

In de eerste fase van het bedrijfsonderzoek 2018-2019 (Waterpissebedden en *Aeromonas*: voeding en temperatuur) is een kweekstelsel voor waterpissebedden opgezet (6). Deze kweek is gedurende beide bedrijfsonderzoeken in stand gehouden en verder uitgebreid om voldoende waterpissebedden beschikbaar te hebben voor de beide hier beschreven overlevingsexperimenten.

### 2.1 Groei- en overlevingsexperiment

#### 2.1.1 *Asellus*

In het eerste experiment (start februari 2019) zijn dieren gebruikt afkomstig uit een particuliere kweek uit Duitsland. Bij de start waren deze *Asellus* 3 – 6 mm in lengte. In het tweede experiment (start februari 2020) zijn *Asellussen* gebruikt afkomstig uit het kweekstelsel van KWR. Bij de start waren de *Asellus* 2,5 – 4,5 mm in lengte. Er is gekozen om te starten met kleine *Asellus* zodat er nog voldoende ruimte is om door te groeien naar een verwachte maximale lengte van ongeveer 10 mm. Per conditie worden 54 *Asellussen* gebruikt (Bijlage III). De redenatie voor dit aantal staat beschreven in Bijlage II en paragraaf 2.3.

#### 2.1.2 Sediment

Sediment voor de overlevingsexperimenten is afkomstig van verschillende locaties in het distributiegebied van Kralingen en Braakman.

Het volume van het sediment, zonder bovenstaand water, is bepaald en 1:1 verdund met drinkwater (reinwater van hetzelfde distributiegebied of drinkwater van de spuilocatie zelf). Dit is homogeen gemengd en opgeslagen in een vriezer bij -80°C tot gebruik in het experiment.

#### Braakman, februari 2019

Het sediment voor de groei- en overlevingsexperimenten is verzameld door het uitvoeren van meerdere spuiacties in Oostburg (voorzieningsgebied Braakman; Bijlage 0, Figuur 13 - Figuur 15).

#### Braakman, januari 2020

Spuiacties zijn uitgevoerd op 29 januari 2020.

#### Kralingen, februari 2019

In Rotterdam is op twee locaties gespuid: Berliooslaan, HYDR-19809 en Cordell Hullplaats, HYDR-6369. Op de Berliooslaan ligt een stuk gietijzeren leiding, op de andere locatie is dit niet het geval.

#### Kralingen, december 2019 en januari 2020

Spuiacties zijn uitgevoerd op:

- 17 december 2019 (Rotterdam en Capelle aan de IJssel),
- 18 december 2019 (Delft)
- 21 januari 2020

#### Filcom zand, 2020

Tijdens het overlevingsexperiment zijn de *Asellussen* in de ‘water’-condities veel in beweging, in tegenstelling tot de ‘blad’- en ‘sediment’- condities waarin ze voornamelijk stil zitten op het blad of sediment. Deze hogere bewegelijkheid heeft mogelijk effect op de overleving vanwege de hogere energievraag van deze bewegingen. Om

deze hypothese te testen is gedurende de laatste 6 weken van het overlevingsexperiment in 2020 een extra conditie toegevoegd met uitgegloeid Sibelco/Filcom zand (korrelgrootte: 0,2 – 0,5 mm, 4 uur verhit tot 550°C, uitgevoerd bij KWR). Dit zand wordt normaal gesproken gebruikt als filtermateriaal in snelfilters en is afkomstig van rivierzand uit Papendrecht. Door de verhitting is al het organisch materiaal verwijderd van het zand. Controles van het verhittingsproces laten zien dat 95-100% van de aanwezige TOC is verwijderd. De *Asellus* kan zich vasthouden aan dit sediment maar bevat geen nutriënten die als voedingsbron kunnen dienen.

### 2.1.3 Water

Het water in de groei- en overlevingsexperimenten van februari 2019 is afkomstig van Braakman (PBRA80UITG) en Kralingen (PKRL80HD01) (af pompstation) dat elke week vers is aangeleverd door Aqualab Zuid. Het water is bemonsterd in jerry cans en binnen 48 uur gebruikt. De verwachting is dat indien er eventueel nog aanwezige restjes chloordioxide aanwezig zijn in het uitgaande water, die tijdens de 24-48 uur opslag weg gereageerd zijn.

De groei- en overlevingsexperimenten die zijn gestart in februari 2020 zijn uitgevoerd met drinkwater van KWR (Tull en 't Waal, Vitens).

Het water in het groei- en overlevingsexperiment is elke week ververs met water dat dezelfde dag of één dag eerder is bemonsterd.

### 2.1.4 Bladmateriaal

Op één moment zijn een groot aantal elzen- en esdoornbladeren geoogst en gedroogd bij kamertemperatuur. Na drogen zijn de bladeren droog en in het donker opgeslagen. Twee weken voor toediening aan de kweekbakken of overlevingsexperimenten zijn de bladeren geweekt in drinkwater van KWR met 10% oppervlaktewater van het Lekkanaal om het rottingsproces op te starten. De geweekte bladeren zijn afgespoeld om de slijmlaag te verwijderen voordat ze aan de kweekbakken of overlevingsexperimenten zijn toegevoegd.

### 2.1.5 Hemoflowconcentraat

Het hemoflowconcentraat is door KWR bemonsterd volgens voorschrift LMB-053. Hiervoor is water na de actiefkoolfilters verzameld: 1360 liter bij ps. Kralingen (monsterpunt pKRL56KF164) en 1760 liter bij ps. Braakman (monsterpunt PBRA501-6X). Dit water is op locatie met ultrafiltratie (hemoflow methode) geconcentreerd tot 1400 ml (concentratiefactor Kralingen: 971x; Braakman: 1257x). Het water wordt met een snelheid van 900 ml per minuut over het filter (poriediameter: 30 kDa) geleid waardoor het water wordt verwijderd en het concentraat bewaard blijft. Het concentraat bevat alle deeltjesgebonden en hoogmoleculaire organische stoffen die zich vrij in het water bevinden en groter zijn dan 30 kDa (PHMOC).

Op de productielocaties Kralingen en Braakman vindt nadesinfectie met chloordioxide plaats. De chloordioxide wordt aan het water gedoseerd voordat het in de reinwaterkelders wordt opgeslagen en is in principe na reactie niet meer aanwezig als het drinkwater de reinwaterkelder verlaat. Om uit te sluiten dat de chloordioxide het overlevingsexperiment negatief kan beïnvloeden, is echter voor een monsterpunt na actiefkoolfiltratie, maar voor dosering van chloordioxide, gekozen.

Toevoeging van het hemoflowconcentraat aan de 6-wellsplaat, zoals beschreven in paragraaf 2.1.7, geeft geen zichtbaar effect op het water: het water wordt niet troebeler en bevat ook niet meer deeltjes.

### 2.1.6 Conditie groei- en overlevingsexperiment

Voor de overlevingsexperimenten zijn de volgende condities getest:

Start in februari 2019:

- Water Braakman (één dag later gestart)

- Water Braakman + sediment Braakman
- Water Kralingen
- Water Kralingen + sediment Kralingen
- Water Kralingen + esdoornblad

Start 4 februari 2020:

- Water KWR
- Water KWR + sediment Kralingen
- Water KWR + sediment Braakman
- Water KWR + hemoflowconcentraat Braakman
- Water KWR + hemoflowconcentraat Kralingen
- Water KWR + esdoornblad
- Water KWR + Filcom zand (start 29 april 2020)

De condities met alleen water of met water en esdoornblad dienen als respectievelijk negatieve en positieve controle. Esdoornblad is een goede voedingsbron voor *Asellus* en *Asellus* zou hier relatief lang op moeten kunnen leven. Indien *Asellus* snel afsterft, is dit een indicatie van een probleem met de experimentele opzet. Daarnaast wordt door deze twee condities in beide experimenten mee te nemen, ook voor eventuele verschillen tussen de experimenten getest. Deze verschillen kunnen bijvoorbeeld veroorzaakt worden eventuele variatie in de waterkwaliteit of variatie in het bladmateriaal en voorweken van het blad.

In het eerste overlevingsexperiment (februari 2019) is gekozen voor drinkwater afkomstig uit het distributienet waaruit ook het sediment afkomstig is, om mogelijke effecten van variatie in waterkwaliteit op het sediment uit te sluiten. Omdat in het eerste experiment geen verschil in overleving is aangetroffen tussen water van Braakman en Kralingen is aangenomen dat de herkomst van drinkwater niet belangrijk is. Daarom is in het tweede experiment (februari 2020) uit praktische overwegingen gekozen voor water van KWR.

De opzet voor het eerste overlevingsexperiment was gebaseerd op het nabootsen van de condities in het distributienet. Kralingen is hierbij gekozen als referentielocatie en dus uitgebreider getest met de condities water en water + sediment. De simulatie van het Kralingen distributienet (water + sediment) is vergeleken met de simulatie van het distributienet van Braakman (water + sediment). In eerste instantie was daarom geen 'Braakman water' conditie meegenomen. Echter bleek op dag 1 na de start dat een groot deel van de *Asellussen* in de behandeling 'Kralingen, water + sediment' dood was. Daarom is als extra controle de conditie 'Braakman water' toegevoegd, deze behandeling is dus 1 dag later gestart dan de andere behandelingen.

In het tweede overlevingsexperiment is het eerste experiment herhaald, met sediment van andere locaties in het distributienet van Kralingen en Braakman. Om te testen of *Asellus* deeltjesgebonden nutriënten kan gebruiken voor groei en/of overleving, is drinkwater geconcentreerd met de hemoflowmethode en is dit concentraat gebruikt als voedingsbron.

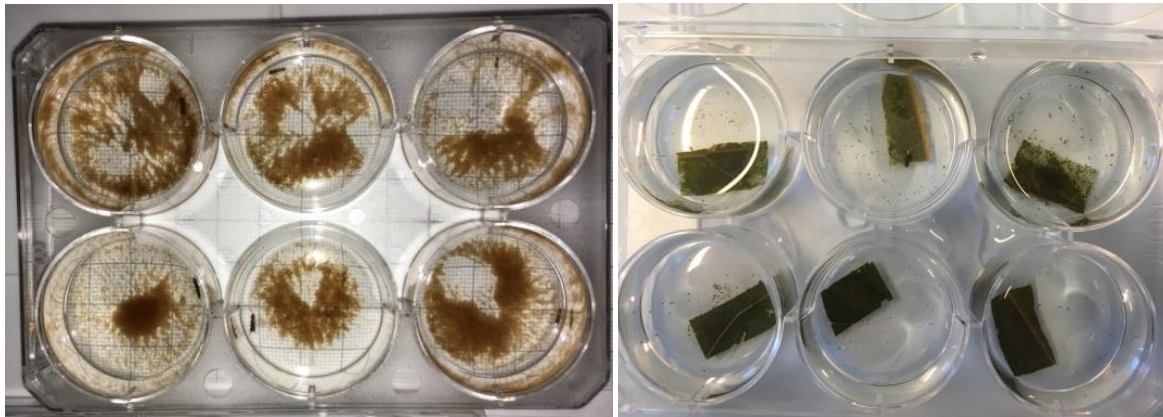
### 2.1.7 Experimentele opzet groei- en overlevingsexperiment

De overlevingsexperimenten zijn uitgevoerd in een 6-wells plaat (diameter per well: 3,5 cm, hoogte: 1,74 cm, volume: 16,8 ml) waarbij aan één well de volgende onderdelen zijn toegevoegd,:

- 1 *Asellus*
- 10 ml water
- Voeding:
  - 400 µl sediment van Kralingen of Braakman (1:1 verdund), of

- voorbehandeld esdoornblad (1 x 2 cm), of
- 115 µl HF concentraat van Kralingen of Braakman, of
- geen voeding (alleen water)

Een voorbeeld van een 6-wells plaat met *Asellus*, water en sediment is gegeven in Figuur 1.

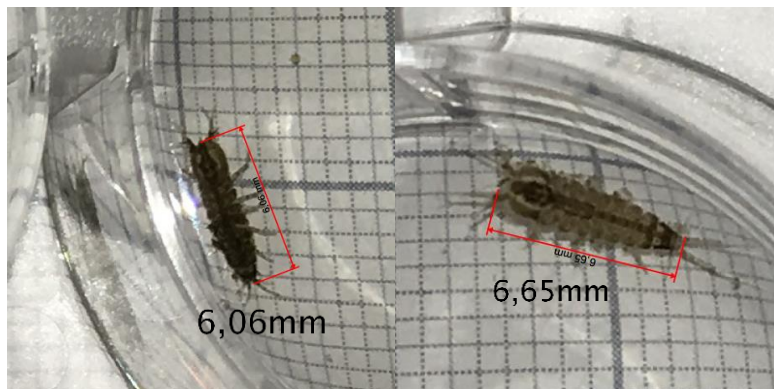


Figuur 1. Experimentele opzet van *Asellus* in een 6-wells plaat met water en sediment (links) of water en bladmateriaal (rechts).

De 6-wells platen met *Asellus* zijn gedurende 16 weken (112 dagen) geïncubeerd op kamertemperatuur in het donker. Elke week zijn de *Asellussen* overgezet naar nieuwe 6-wells platen met vers water en sediment en/of bladmateriaal.

Tijdens het overzetten is gecontroleerd of de *Asellus* levend of dood was. Dood is in dit geval gedefinieerd als een *Asellus* die niet beweegt als er fel licht op wordt geschoten of als deze zachtjes met een stomp voorwerp wordt aangetikt. Naast de wekelijkse meting is in de eerste week ook op dag 1, 2 en 4 bepaald of de *Asellus* nog in leven was.

In weken 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 (februari 2019) of weken 0, 4, 8, 16 (februari 2020) is de lengte van de *Asellus* bepaald. Hiervoor is na het overzetten van de *Asellus* naar een nieuwe 6-wells plaat met water, maar zonder sediment of blad, op gestandaardiseerde manier een foto gemaakt van de plaat. Met behulp van het programma Nuance Power PDF Advanced is de lengte bepaald van de *Asellus*. In Figuur 2 zijn twee voorbeelden van lengtemetingen gegeven, hierbij is alleen het lichaam gemeten zonder bijvoorbeeld de pootjes of antennes. Als de *Asellus* niet plat op de bodem staat maar schuin in het water ligt of zich in de rand van de 6-wellsplaat bevindt, is de gemeten lengte lager dan de voorgaande meting waardoor het lijkt alsof de *Asellus* krimpt. Doordat een *Asellus* een exoskelet heeft, is krimpen echter niet mogelijk en wordt de gesuggereerde krimp van *Asellus* dus vermoedelijk veroorzaakt door technische oorzaken tijdens de lengtebepaling.



Figuur 2. Lengtemeting van *Asellus* met het programma Nuance Power PDF Advanced.

## 2.2 Microbiologische en chemische analyses op water en sediment

In aanvulling op de dood/levend- en lengtemetingen zijn laboratoriumanalyses op water, sediment en *Asellus* uit uitgevoerd (Tabel 1).

Met de analyses uit Tabel 1 is de water- en sedimentsamenstelling, en dus de samenstelling van de voedingsbron van *Asellus*, zo goed mogelijk in kaart gebracht. De concentratie metalen is bepaald met ICP-MS (water) of XRF (sediment). Het gehalte organisch koolstof in water is bepaald en in meer detail gekarakteriseerd met AOC-A3, LC-OCD, PHMOC, PHMCHC en PHMPC. Daarnaast is het totale gehalte organisch stikstof, koolstof en nitraat bepaald als algemene parameters.

Om te achterhalen of, en zo ja in welke mate, *Aeromonas* groeit in de overlevingsexperimenten zijn deze analyses meerdere malen in alle condities uitgevoerd.

Tabel 1. Microbiologische en chemische analyses op water, sediment en *Asellus* voor, tijdens en na het overlevingsexperiment. <sup>5</sup>: uitgevoerd in week 16 of eerder bij een vroegtijdig overlijden van een *Asellus*. Sommige analyses zijn alleen uitgevoerd in het eerste (\*) of het tweede (#) groei- en overlevingsexperiment. Het sediment is vers (<sup>6</sup>) en/of na invriezen (<sup>^</sup>) getest.

|                                   | <i>Asellus</i>  |                     |            |                    | Water experiment   |                    |                    | Sediment            | HF-concentraat <sup>#</sup> |
|-----------------------------------|-----------------|---------------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|
|                                   | wk 0<br>(start) | wk 0<br>(dag 1,2,4) | wk<br>1-15 | wk 16 <sup>5</sup> | start              | wk<br>1-15         | wk 16*             | start               | Binnenkomst                 |
| Levend/dood                       | X               | X                   | X          | X                  |                    |                    |                    |                     |                             |
| Lengte                            | X               |                     | X          | X                  |                    |                    |                    |                     |                             |
| ATP                               |                 |                     |            |                    | X <sup>&amp;</sup> |                    |                    | X*                  |                             |
| <i>Aeromonas</i>                  | X               |                     | X          | X                  | X <sup>&amp;</sup> | X <sup>&amp;</sup> | X <sup>&amp;</sup> | X* <sup>^</sup>     | X                           |
| AOC-A3                            |                 |                     |            |                    | X <sup>&amp;</sup> |                    |                    | X <sup>&amp;^</sup> | X <sup>&amp;</sup>          |
| LC-OCD                            |                 |                     |            |                    | X <sup>&amp;</sup> |                    |                    |                     | X <sup>&amp;</sup>          |
| ICP-MS                            |                 |                     |            |                    | X <sup>&amp;</sup> |                    |                    |                     | X                           |
| XRF (incl. C, N, P)               |                 |                     |            |                    |                    |                    |                    | X <sup>&amp;^</sup> |                             |
| Foto maken                        |                 |                     |            |                    |                    |                    |                    | X <sup>^</sup>      |                             |
| PHMOC,<br>PHMCHC,<br>PHMPC        |                 |                     |            |                    |                    |                    |                    |                     | X <sup>&amp;</sup>          |
| Gehalte C, N, P                   |                 |                     |            |                    | X <sup>&amp;</sup> |                    |                    |                     | X <sup>&amp;</sup>          |
| NO <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> |                 |                     |            |                    | X <sup>&amp;</sup> |                    |                    |                     | X <sup>&amp;</sup>          |
| Verhouding<br>(an)organisch       |                 |                     |            |                    |                    |                    |                    | X <sup>&amp;^</sup> |                             |

Het uitgaande water van Braakman en Kralingen en het drinkwater van Tull en 't Waal (van februari 2019) is chemisch en microbiologisch gekarakteriseerd. Dezelfde analyses zijn uitgevoerd voor het hemoflowconcentraat van Braakman en Kralingen (van februari 2020). Tijdens de spuiacties in Kralingen in januari-februari 2019 was de hoeveelheid geoogst sediment zeer beperkt, van Braakman was in 2019 wel voldoende sediment aangeleverd. Hierdoor is ervoor gekozen om het sediment in eerste instantie uitsluitend te gebruiken voor het overlevingsexperiment en zijn er geen chemische analyses uitgevoerd. De microbiologische analyses zijn wel direct uitgevoerd. Door het snelle sterven van de *Asellus* in de Kralingen-sediment conditie in 2019 was aan het eind van het experiment voldoende sediment over om alsnog de chemische analyses uit te voeren. Deze analyses zijn dus in een later stadium uitgevoerd, na te zijn bewaard bij -80°C.

In 2020 is wel voldoende sediment geoogst uit beide distributiegebieden. Dit sediment is ook ingevroren voordat de chemische analyses zijn uitgevoerd.

### 2.2.1 Sediment opwerken voor microbiologische analyses

De biofilm is losgetrild van het sediment met LES (Lage Energie Sonificatie). Hiervoor is 5 ml sediment gemengd met 30 ml steriel leidingwater. Het sediment met water is 2 minuten getrild in een ultrasoon waterbad (Branson) bij een frequentie van 40 kHz. Na bezinking van het filtermateriaal is in de bovenstaande vloeistof het aantal *Aeromonas*-bacteriën bepaald.

### 2.2.2 AOC-A3

Met de AOC-A3 methode wordt de concentratie biopolymeer koolstof in water bepaald. Deze methode is gebaseerd op het maximale aantal kolonievormende eenheden van een reincultuur van bacteriestam *Flavobacterium johnsoniae* A3. De bacteriestam *Pseudomonas fluorescence* p17 wordt gelijktijdig gedoseerd en

gebruikt de makkelijk afbreekbare koolstofbronnen. Hierdoor kan de A3 bacterie alleen biopolymeren als koolstof- en energiebron gebruiken en is het maximale bacterieaantal een maat voor de concentratie aanwezige biopolymeren in het water. De analyse is uitgevoerd volgens huisvoorschrift LMB-075. In sommige gevallen groeit de p17 stam (te) hard, waardoor het AOC-A3 resultaat als indicatief wordt beschouwd.

Het water met daaraan toegevoegd sediment (400 µl 1:1 verdund) of hemoflowconcentraat (115 µl) wordt gepasteuriseerd door verhitting tot 60°C, waarna na afkoeling een oplossing met fosfaat en stikstof wordt toegevoegd om eventuele limitaties te voorkomen. Vervolgens worden twee bacteriestammen toegevoegd: *F. johnsoniae* A3 en *P. fluorescencia* P17. Gedurende 28 dagen wordt regelmatig het aantal kve van A3 en P17 bepaald. Het maximale aantal *F. johnsoniae* A3-bacteriekolonies wordt vervolgens omgerekend naar de concentratie biopolymeren die in het water aanwezig was bij de start. Het sediment en hemoflowconcentraat zijn ingevroren bij -80°C voordat deze zijn toegevoegd aan de AOC-A3 bepaling. Het sediment is in 2019 ook vers (zonder vriesstap) getest in de AOC-A3 bepaling.

### 2.2.3 ATP

ATP is een energierijke verbinding die in alle levende cellen voorkomt en wordt gebruikt als maat voor de aanwezige hoeveelheid actieve biomassa. De bepaling is gebaseerd op een enzymreactie van luciferine met luciferase die alleen plaats vindt in de aanwezigheid van ATP. Het hierbij geproduceerde licht (in Relatieve Licht Eenheden) wordt omgerekend naar de concentratie ng/l ATP in het watermonster. ATP is bepaald volgens huisvoorschrift LMB-002 en conform NEN-EN 16421:2014. Voor de ATP-analyses is het sediment voorbehandeld met HES (Hoge Energie Sonificatie).

### 2.2.4 *Aeromonas*

Het aantal *Aeromonas*-bacteriën in water of sediment (voorbehandeld met HES) is bepaald conform NEN-ISO 6263 en huisvoorschrift LMB-022. Hiervoor is het watermonster gefiltreerd of direct op Ampicilline Dextrine Agar (ADA)-medium geïncubeerd gedurende 24 uur bij 30°C. Het *Aeromonas*-aantal in en op *Asellus* is bepaald door een *Asellus* fijn te malen in 1 ml steriel drinkwater en in dit watermengsel het *Aeromonas*-aantal te bepalen.

### 2.2.5 LC-OCD

Met LC-OCD (Liquid Chromatography – Organic Carbon Detection) wordt de concentratie van de verschillende bestanddelen van het organisch koolstof (o.a. biopolymeren [ > 20.000 Da], humuszuren [ongeveer 1000 Da], building blocks [ongeveer 300 – 450 Da]) in het water bepaald. Deze analyses zijn uitbesteed aan DOC Labor.

### 2.2.6 XRF

Met XRF (X-Ray Fluorescentie Spectrometrie) wordt de concentratie van een groot aantal metalen in het sediment bepaald door gebruik te maken van röntgenfluorescentie (Bijlage III). Deze analyse is uitbesteed aan LMA, Laboratorium voor Multi-Element Analyses.

### 2.2.7 Anorganische parameters

Bepaling van de concentratie organisch gebonden stikstof (Kjeldahl), nitraat, nitriet en fosfaat in water zijn uitgevoerd door Aqualab Zuid.

### 2.2.8 ICP-MS

Met ICP-MS (inductief gekoppelde plasma massaspectrometer) is in water de concentratie van een grote set aan metalen bepaald (Bijlage III). Dit is uitgevoerd volgens huisvoorschrift LAM-058.

## 2.3 Statistische analyses groei en overleving

In het experiment worden zowel groei als overleving bepaald onder verschillende omstandigheden. Voor de groei(snelheid) is een non-parametrische variantieanalyse (Kruskal-Wallis met Dunn's Test) toegepast, aangezien niet is voldaan aan bepaalde aannames die van toepassing zijn bij ANOVA (bijvoorbeeld niet-homogene variantie tussen behandelingen).

### 2.3.1 Opzet groei- en overlevingsexperiment

Voor zowel groei als overleving is aan de hand van verwachte resultaten (uit eerdere proeven) en de te gebruiken statistische testen een schatting gemaakt van de minimaal benodigde steekproefgrootte per behandeling om een eventueel significant effect van een bepaalde omvang ook daadwerkelijk te kunnen detecteren. De aanpak en resultaten hiervan staan beschreven in Bijlage II.

Door de metingen op een logaritmische tijdschaal uit te voeren, kan het aantal metingen verminderd worden, bijvoorbeeld 0, 1, 2, 4, 8, 16 weken. In het experiment wordt echter wekelijks de overleving bepaald aangezien de *Asellussen* elke week worden overgezet naar een nieuwe 6-wells plaat (paragraaf 2.1.7). Dit is vaker dan bovenstaande logaritmische tijdschaal. Door daarnaast vaker in de eerste week te meten, kan een snel overlijden van de dieren gemonitord worden.

Omdat de minimaal benodigde aantallen voor het aantonen van een significant verschil in sterftekans veel hoger zijn, lijkt het aantonen van groeiverschillen wat minder lastig. Voor groei zou bij 50 dieren per groep een significant verschil aangetoond kunnen worden bij een effectgrootte van 0,21. Hiervoor geldt natuurlijk wel dat er nog een aanzienlijk deel van de populatie in leven dient te zijn op het moment van bemonsteren en meten. Gezien bovenstaande argumenten is gekozen om met 54 *Asellussen* per conditie te starten, met een experimentele duur van 16 weken. Zelfs als bijna de helft overlijdt, kan er waarschijnlijk nog een significant verschil worden aangetoond.

### 2.3.2 Overleving

Voor het testen van overleving is vooral de duur van de start van experiment totdat sterfte optreedt van belang, en daarnaast de kans dat op een bepaald tijdstip sterfte optreedt. Wanneer bij een survival analyse slechts één voorspellende factor onderzocht wordt die slechts een paar mogelijke waardes kan aannemen, kan een non-parametrische, univariabele Kaplan Meier analyse volstaan (7). Omdat in het hier beschreven onderzoek echter sprake is van meerdere factoren die de overleving kunnen beïnvloeden (zoals type water en type voedsel), is een uitgebreider model toegepast, het veel gebruikte parametrische, multivariabele Cox proportional hazards (CPH) model (8). Met de Kaplan Meier analyse en het CPH model wordt de gemiddelde tijd tot een gebeurtenis (overlijden *Asellus*) geschat op basis van het moment van elk van die in de steekproef optredende gebeurtenissen (overlijden). Op elk moment van één of meerdere overlijdens wordt de kans om tot dat moment te overleven geschat op basis van de dan nog overlevende individuen. Met het CPH model kan - net als met andere multivariabele regressiemodellen - het effect van meerdere voorspellers tegelijk onderzocht worden. Bijkomend voordeel van het Cox model boven een Kaplan Meier analyse is bovendien dat er naast de vraag "is er een effect" ook antwoord gegeven wordt op de vraag "hoe groot is het effect" van een bepaalde voorspeller. Het Cox model geeft de grootte van een effect weer met behulp van hazard ratio's (HR), waarbij een HR van 1 aangeeft dat er geen verschil is tussen de effecten van de twee vergeleken factoren. Een HR van 2 geeft bijvoorbeeld aan dat de kans om te overlijden bij behandeling A twee keer zo groot is als bij behandeling B. De hazard is de momentane kans om een event (sterfte) te krijgen, en de hazard ratio is te interpreteren als het relatieve sterfterisico.

De overleving per behandeling is vergeleken aan de hand van een CPH model, waarbij het type water (Braakman, Kralingen) en het type voedsel (geen voedsel [alleen water], sediment Braakman, sediment Kralingen, hemoflowconcentraat Braakman, hemoflow concentraat Kralingen of blad) als categorische variabelen worden

geanalyseerd en het jaar van het experiment (2019 of 2020) als categorische covariabele (voorspeller). De startlengte van een *Asellus* is als continue covariabele geanalyseerd. Deze is meegenomen omdat ondanks de grote zorg die gestoken is in een zo uniform mogelijke grootteverdeling bij de start, initiële verschillen in startgrootte mogelijk een effect zouden kunnen hebben op de overlevingskans van individuen.

Het CPH model maakt een belangrijke aanname, namelijk die van de evenredige kansen (proportional hazards). Deze zegt dat de hazard ratios (verhouding tussen kansen op sterfte voor bepaalde voorspellende covariabelen) constant zijn in de tijd. Dit betekent dat het relatieve verschil in hazard veroorzaakt door verschillende waarden van een voorspeller gelijk blijft in de tijd. Als bijvoorbeeld de sterftetekans door een bepaald type water twee keer zo hoog is als dat van een ander water, dan dient deze verhouding op ieder tijdstip hetzelfde te zijn. Verder zijn er bij een CPH model geen specifieke aannames over de verdeling van de hazard functie of voorspellende variabelen; ze hoeven bijvoorbeeld niet normaal verdeeld te zijn.

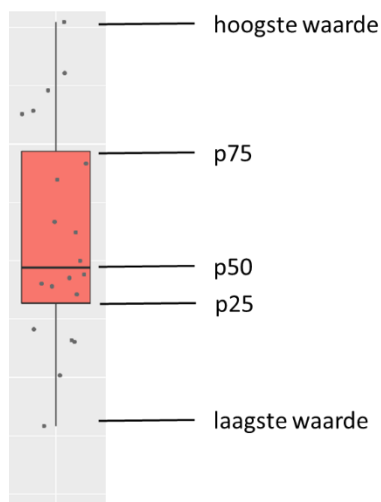
### 2.3.3 Grootte

Voor ieder individu is de exponentiële groeisnelheid [ $\mu$ ] geschat als de helling van de lineaire regressie van de  $\ln$ -getransformeerde lengtes over de tijd.

De grootte en lengtegroei van de *Asellus* vertoont geen normale verdeling (Shapiro-Wilk test). Daarom is de non-parametrische Kruskal-Wallis test uitgevoerd om te testen of lengtegroei al dan niet significant verschillend is tussen de verschillende condities. De Kruskal-Wallis test is gevolgd door de post-hoc Dunn's test om verschillen tussen combinaties van verschillende typen water of voedsel te kunnen traceren.

### 2.3.4 Boxplots

In dit rapport worden sommige resultaten weergegeven in boxplots (Figuur 3). Hierin zijn de resultaten samengevat en worden de p25, p50, p75, laagste en hoogste waarde gegeven. De p25-waarde betekent dat 25% van de resultaten gelijk of lager is dan deze waarde, hetzelfde geldt voor p50 (50%, gelijk aan mediaan) en p75 (75%). In sommige boxplots staan ook alle individuele resultaten weergegeven als punten.

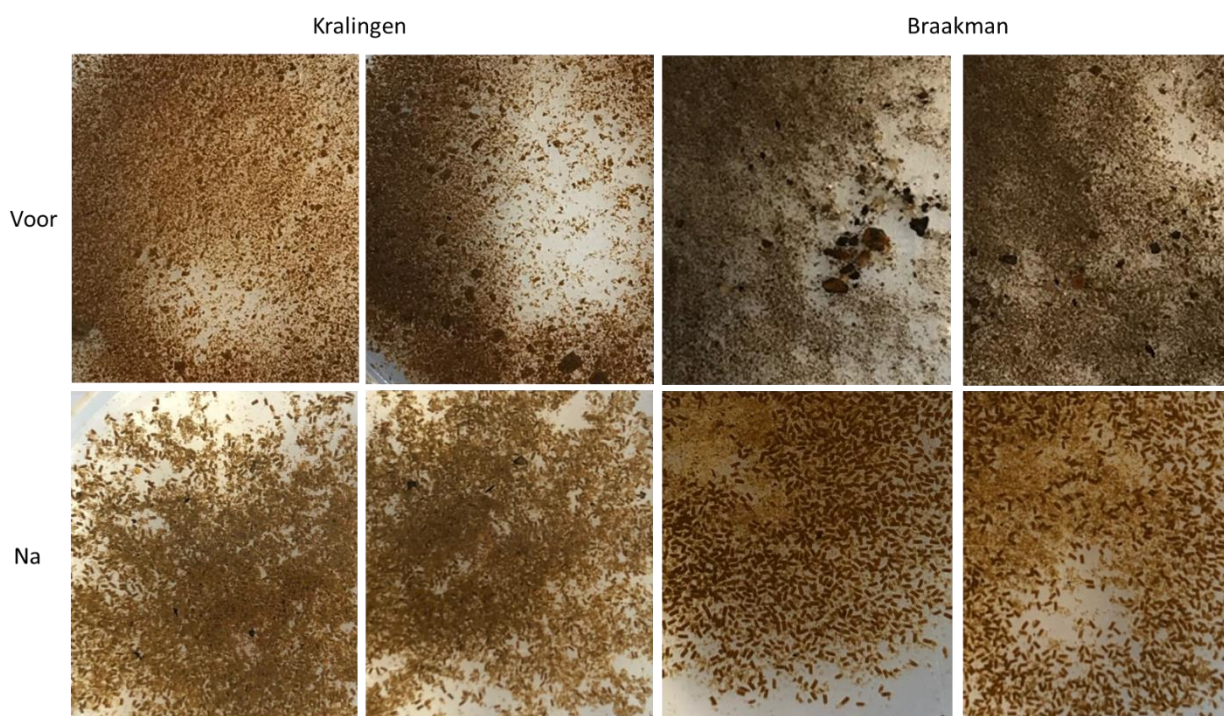


Figuur 3. Voorbeeld van een boxplot waarin de individuele resultaten zijn weergegeven.

## 3 Resultaten groei en overleving van *Asellus* op organisch materiaal

### 3.1 Verandering uiterlijk sediment tijdens experiment

Het sediment in de kweekexperimenten verandert van uiterlijk gedurende de week waarin *Asellus* zich met het sediment voedt. Het verse sediment is fijn van structuur en bestaat voornamelijk uit kleine, losse korreltjes ('Voor' in Figuur 4). Gedurende de week waarin de *Asellus* het sediment gebruikt als voedselbron verandert het sediment van structuur en bestaat het voornamelijk uit fecale pellets van de *Asellus* (donkere staafjes in 'Na' in Figuur 4). Er is dus duidelijk door de dieren gegeten.



Figuur 4. Foto's van sediment van Kralingen (links) en Braakman (rechts) in de *Asellus*week. Voor: vers sediment meteen na het verversen. Na: sediment na één week in het overlevingsexperiment waarbij de gevormde fecale pellets duidelijk zichtbaar zijn als donkere staafjes.

### 3.2 Groei en overleving

#### 3.2.1 Overleving

In het eerste groei- en overlevingsexperiment was een opvallend verschijnsel zichtbaar in de behandeling met Kralingen-sediment: de *Asellussen* lagen al na een dag op de rug, waarbij ze soms nog wel korte tijd in leven waren. Onder de stereomicroscop was te zien dat het toegediende sediment aan de dieren bleef plakken (Figuur 5). Dit is niet waargenomen bij het Braakman-sediment in 2019 of voor één van de sedimenten in 2020.

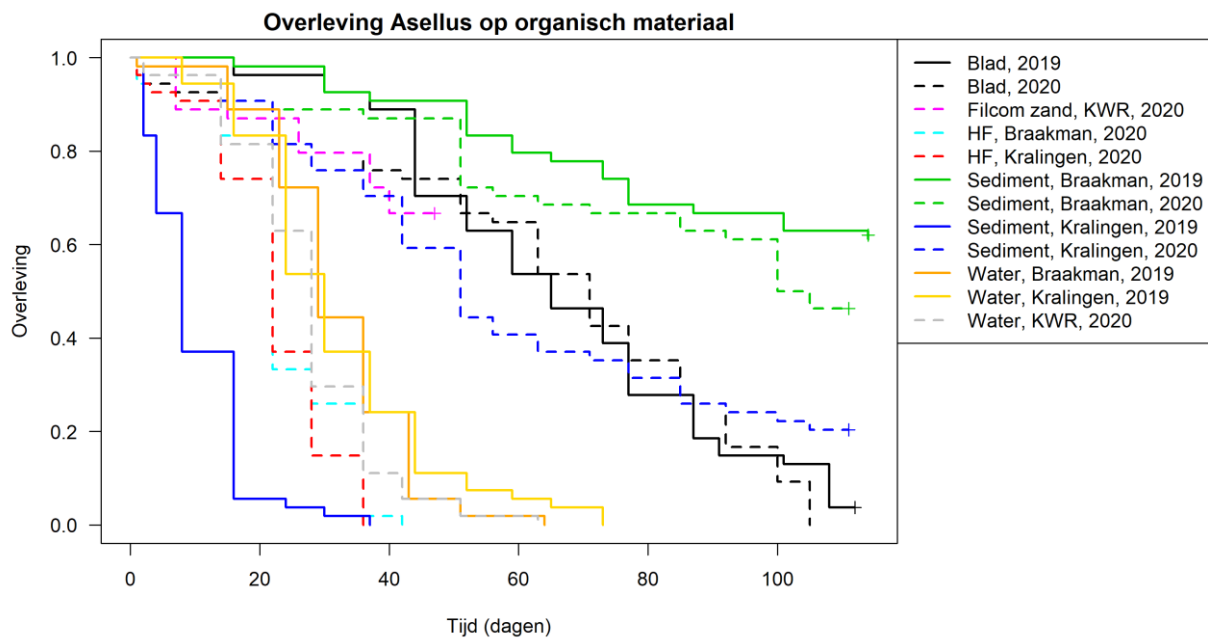
In de behandeling met Kralingen-sediment trad (mogelijk als gevolg van het bovengenoemde plakken van het sediment) snelle sterfte op. Als controle op deze resultaten is nog een extra set experimenten ingezet waarin de *Asellussen* pas enkele uren na het toevoegen van water en sediment aan de wellplaat zijn toegevoegd. Door de *Asellus* later toe te voegen, is al het sediment bezonken in tegenstelling tot een start waarbij het sediment pas wordt toegevoegd als de *Asellus* al in de wellplaat aanwezig is. Het sediment komt dan immers tijdelijk in

suspensie en kan zo mogelijk makkelijker hechten aan de *Asellus*. In deze extra test zijn verschillende sedimentvolumes getest (25, 50, 100, 250, 400 en 500 µl sediment en 3 ml water per well in een 6-wellsplaat); ook hier lagen echter de *Asellussen* bij alle sediment hoeveelheden binnen enkele uren op de rug en waren ze binnen enkele dagen overleden.



*Figuur 5. Stereomicroscopische foto's van Asellussen bedekt met Kralingen-sediment (oranje).*

De resultaten van beide overlevingsexperimenten zijn weergegeven in een overlevingsfunctie voor iedere combinatie van behandeling en jaar (Kaplan Meier analyse; Figuur 6). De curves overlappen elkaar niet of nauwelijks en lopen grotendeels min of meer parallel aan elkaar. Daarmee voldoet de dataset aan de proportionaliteitstest. Uitzondering is dat de curve van sediment uit Kralingen (2020) kruist met beide blad condities. Omdat de Hazard Ratios en 95% betrouwbaarheidsintervallen vergelijkbaar zijn worden de resultaten als betrouwbaar beschouwd (Tabel 2).



*Figuur 6. Kaplan Meier curve met op de y-as de cumulatieve proportie levende Asellus gedurende 16 weken op verschillende voedselbronnen (bladmateriaal, sediment, water en hemoflowconcentraat [HF]). Aangegeven is ook of de resultaten afkomstig zijn van het overlevingsexperiment uitgevoerd in 2019 of in 2020. Het extra experiment met Filcom zand is na 6 weken gestopt. De '+'-tekens geven aan dat er nog Asellus in leven waren op het einde van het experiment.*

In Tabel 2 staan de resultaten van het Cox Proportional Hazards model weergegeven voor de regressiecoëfficiënten van de verschillende (co)variabelen ten opzichte van water van Kralingen. De belangrijkste waarde is de 'Hazard ratio', waarbij een waarde  $> 1.0$  betekent dat in die conditie de afsterving sneller is dan in 'Kralingen drinkwater'. Bij een waarde van  $< 1.0$  is de overleving juist langer. Hierin is te zien dat startlengte (L0) en de kwaliteitsverschillen van beide watertypen geen significant effect hebben op de hazard ratio (HR is ongeveer 1). Sediment van Kralingen in 2019 resulteert in een hazard ratio van 7.55 (95% betrouwbaarheidsinterval: 5,006 – 11,396) en geeft dus een veel hogere kans op sterfte dan alleen water van Kralingen. De hemoflow concentraten hebben een hazard ratio van 2,16 (Braakman) en 2,45 (Kralingen) en geven een significant hogere kans op overlijden vergeleken met wanneer alleen water van Kralingen is gedoseerd. Bladmateriaal, sediment van Braakman uit 2019 en 2020 en sediment van Kralingen uit 2020 hebben allen een hazard ratio ruim lager dan 1 en geven dus een lagere gemiddelde sterftetekans vergeleken met alleen water van Kralingen in 2019.

Tabel 2. Uitkomsten van het Cox Proportional Hazards model, vergeleken met '1.Water\_KRL\_2019', voor effecten van de geteste covariabelen (testconditie en startlengte [ $L_0$ ]) op de sterfte van *Asellus*. In de tabel staat de waarde van de regressiecoëfficiënt, de bijbehorende standaardfout, de kans (significantie, P) bij toetsing tegen de Chi-kwadratverdeling, de hazard ratio en de 95%-betrouwbaarheidsgrenzen hiervan. L0: startlengte op dag 0, HF: hemoflowconcentraat, KRL: Kralingen, BRA: Braakman, sed: sediment.

| Variabele        | Regressie-coëfficiënt | Standaard fout | P > Chi <sup>2</sup> | Hazard ratio | Hazard ratio (95%-interval) |
|------------------|-----------------------|----------------|----------------------|--------------|-----------------------------|
| L0               | 0,05532               | 0,07529        | 0,462523             | 1,057        | 0,912 – 1,225               |
| 2.Water_BRA_2019 | 0,11723               | 0,19807        | 0,553941             | 1,124        | 0,763 – 1,658               |
| 3.Blad_2019      | -1,44132              | 0,20624        | 2,78E-12 ***         | 0,237        | 0,158 – 0,355               |
| 4.Sed_KRL_2019   | 2,02197               | 0,20984        | <2,00E-16 ***        | 7,553        | 5,006 – 11,396              |
| 5.Sed_BRA_2019   | -2,93702              | 0,27879        | <2,00E-16 ***        | 0,053        | 0,031 – 0,0916              |
| 6.Water_KWR_2020 | 0,4143                | 0,19592        | 0,034461 *           | 1,513        | 1,031 – 2,222               |
| 7.Blad_2020      | -1,29753              | 0,21704        | 2,25E-09 ***         | 0,273        | 0,179 – 0,418               |
| 8.Sed_KRL_2020   | -1,48868              | 0,22014        | 1,36E-11 ***         | 0,226        | 0,147 – 0,347               |
| 9.Sed_BRA_2020   | -2,4091               | 0,25326        | <2,00E-16 ***        | 0,090        | 0,055 – 0,148               |
| 10.HF_KRL_2020   | 0,89558               | 0,20596        | 1,37E-05 ***         | 2,449        | 1,635 – 3,667               |
| 11.HF_BRA_2020   | 0,77211               | 0,21368        | 0,000302 ***         | 2,164        | 1,424 – 3,290               |

Wat opvalt is dat vergelijkbare condities tussen de twee experimenten (2019 en 2020) goed overeenkomen: *Asellus* overleving op de drie watertypen (2019: Kralingen, Braakman; of 2020: KWR) is nagenoeg vergelijkbaar. Hetzelfde geldt voor de overleving op bladmateriaal en de overleving op sediment van Braakman waarbij er erg weinig verschillen zijn tussen beide experimenten. Het effect van hemoflowconcentraat op overleving is ook vergelijkbaar tussen de twee pompstations. Uitzondering is natuurlijk het sediment van Kralingen uit 2019 waarvoor grote verschillen in overleving zichtbaar zijn met de andere behandelingen.

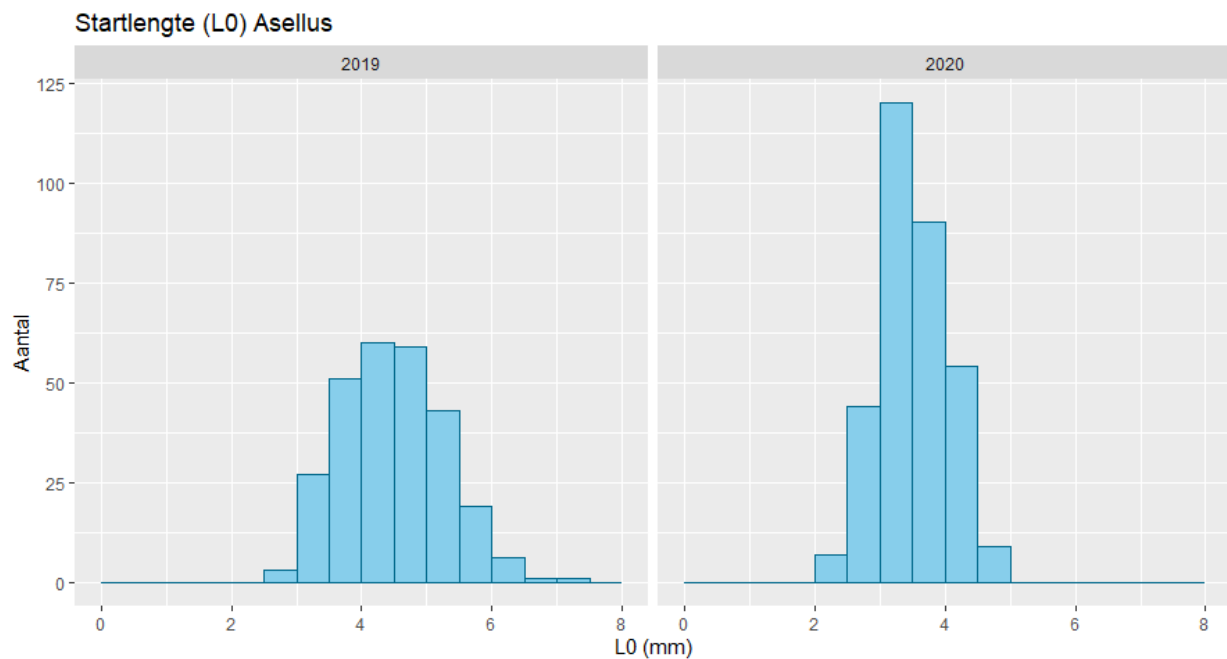
Uit Figuur 6 blijkt dat de overleving op uitgegloeid Filcom zand in de eerste 6 weken duidelijk hoger is in aanwezigheid van Filcom zand dan wanneer alleen water wordt toegevoegd. Door de korte duur van het experiment (6 i.p.v. 16 weken) is deze conditie niet meegenomen in de Cox Proportional Hazard test in Tabel 2. De overleving lijkt vergelijkbaar te zijn met sediment van Kralingen uit 2020 of bladmateriaal uit 2020. Dit is opmerkelijk aangezien het Filcom zand geen organische stof en nauwelijks nutriënten bevat, terwijl aangenomen wordt dat Kralingen sediment uit 2020 en bladmateriaal voldoende organische stof en nutriënten zou moeten bevatten om de overleving van *Asellus* te verlengen. Observatie van de *Asellus* met Filcom zand laat zien dat de *Asellus* veel minder beweegt, en voornamelijk stil zit op het zand, dan wanneer er alleen water aanwezig is. De *Asellus* kan dus lang zonder voedingsbron overleven waardoor na 6 weken nog geen verschil zichtbaar is tussen het uitgegloeide Filcom zand en de andere twee condities. Een andere optie is dat het sediment en bladmateriaal niet voldoende beschikbare nutriënten bevat om overleving van *Asellus* te verbeteren. Het lijkt echter zeer onwaarschijnlijk dat het bladmateriaal geen geschikte voedingsbron is voor *Asellus* om te overleven. Het bladmateriaal wordt gebruikt in de kweekbakken en wordt kaal gegeten door *Asellus*, daarnaast blijkt uit literatuur dat bladmateriaal van verschillende planten een goede voedselbron is voor *Asellus* (6). Aangezien de overleving op sediment van Braakman wel hoger is dan op uitgegloeid Filcom zand bevat dit sediment wel voldoende organische stof en beschikbare nutriënten.

### 3.2.2 Groei

Beschouwing van de individuele startlengte van de *Asellus* uit het eerste experiment laat zien dat de gemiddelde lengte bij de start van het experiment grotendeels was zoals gepland (3-5 mm), maar dat er ook beduidend grotere individuen (>5 mm) aanwezig waren (Figuur 7, links). Om de groei in het tweede experiment beter te kunnen

meten is het experiment gestart met kleinere individuen en met een smallere lengtefrequentieverdeling (Figuur 7, rechts). De meeste individuen zijn 3 – 4 mm groot en geen enkele is groter dan 5 mm.

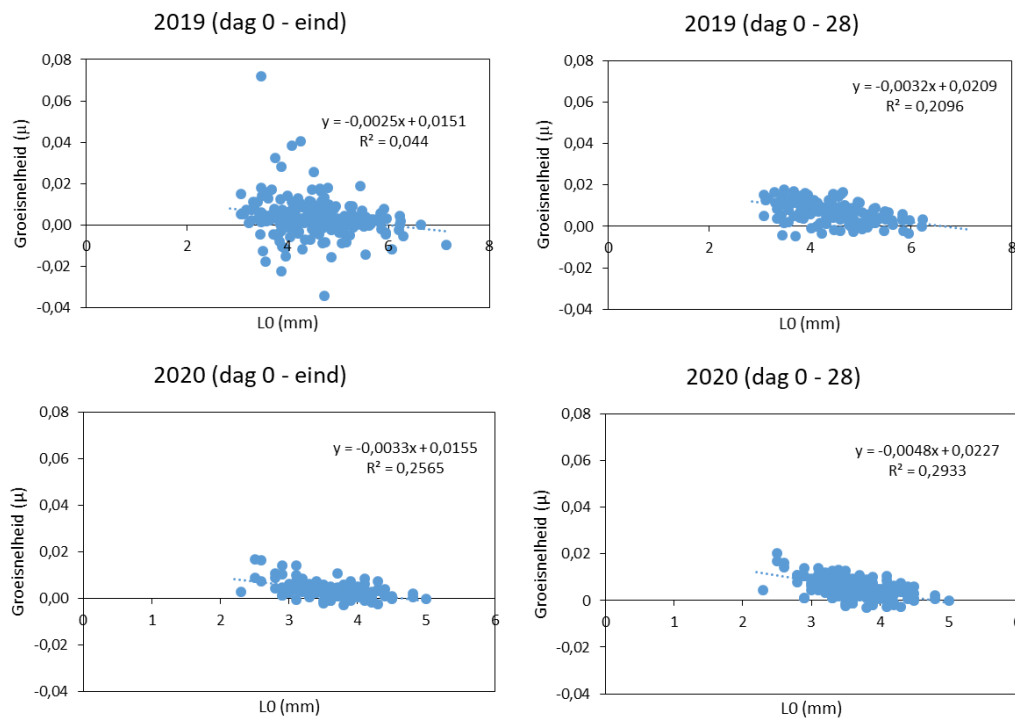
Alternatieven om groei beter te meten (bijv. door tijdelijk het water uit de welletjes te halen, door bepaling van het natgewicht of door op een andere manier foto's te maken en te analyseren) zijn na het eerste experiment onderzocht maar onhaalbaar gebleken of gaven naar verwachting eerder minder dan meer betrouwbare resultaten.



Figuur 7. Lengte-frequentieverdeling van alle behandelingen bij de start van het eerste experiment in februari 2019 (links,  $n = 270$ ) en februari 2020 (rechts,  $n = 324$ ).

Lengtegroei metingen van alle individuele *Asellussen* laten zien dat eventuele groei vooral optreedt in week 1 – 4 waarna de groei afvlakt of stabiel blijft (in Bijlage IV). Om deze reden is de groeisnelheid zowel berekend tussen dag 0 en dag 28 of 29 als ook tussen dag 0 en het laatste meetpunt na 16 weken (112 dagen). Het nadeel van de laatste aanpak is dat de groeisnelheid wordt berekend van een heterogene groep aangezien het moment van overlijden sterk varieert tussen en binnen elke geteste conditie. Dit in tegenstelling tot de eerste aanpak waarbij de groeisnelheid van een homogene groep wordt gebruikt en de groeisnelheid van *Asellussen* die voor dag 28 of 29 zijn overleden niet wordt meegenomen.

Als de groeisnelheid wordt vergeleken met de lengte op dag 0 ( $L_0$  in Figuur 8) blijkt duidelijk dat de groeisnelheid hoger is bij een lagere startlengte  $L_0$ . In theorie kunnen kleinere individuen verhoudingsgewijs meer groeien dan grotere individuen, dus wordt een negatief verband verwacht tussen startlengte en groeisnelheid.



Figuur 8. Relatie tussen groeisnelheid, berekend tussen dag 0 en laatste meetpunt (links) of tussen dag 0 - 28 (rechts) en de lengte op dag 0 (L0) voor 2019 (boven) en 2020 (onder).

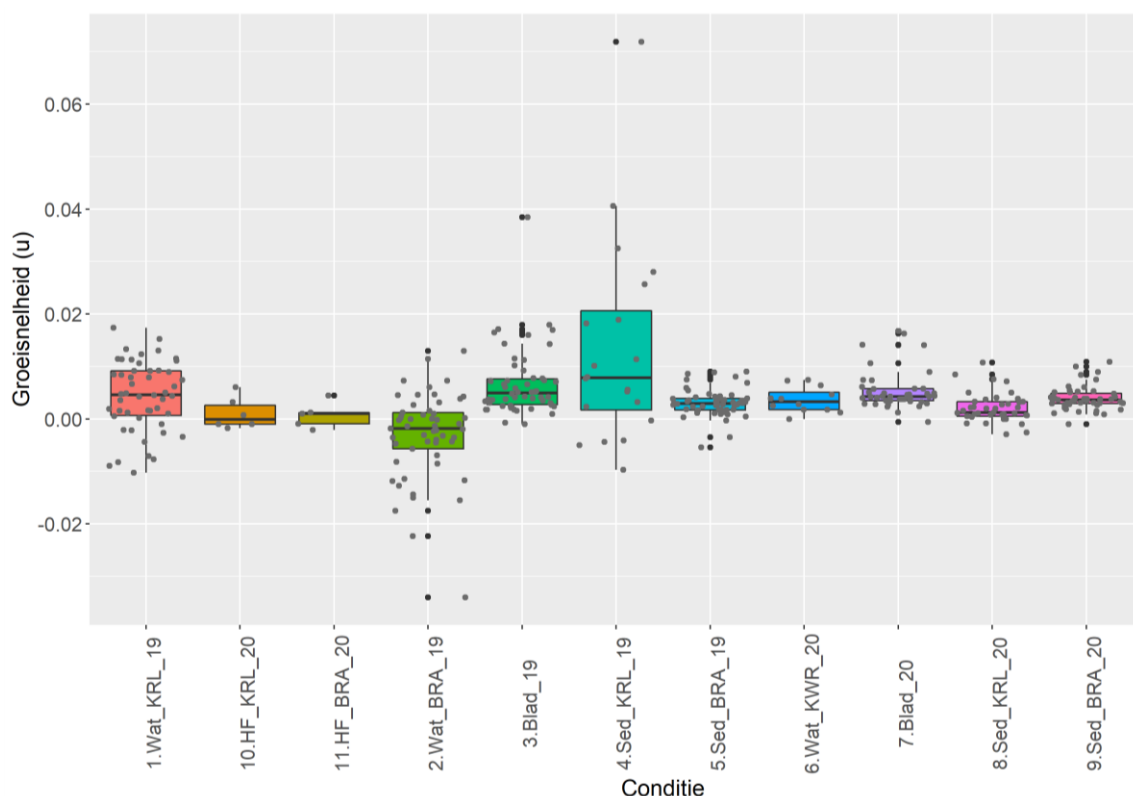
De groeisnelheid van dag 0 tot het laatste meetpunt laat erg weinig variatie zien tussen de verschillende condities (Figuur 9). Zoals hierboven beschreven kan dit tenminste deels veroorzaakt worden door de heterogeniteit in het aantal dagen waarover de groeisnelheid is berekend. Vooral in het experiment van 2019 varieert de groeisnelheid zowel binnen een conditie als tussen de condities, maar in het experiment van 2020 is er nauwelijks variatie in de groeisnelheden.

De verwachting is dat bij een voldoende en geschikte voedingsbron *Asellus* voldoende energie heeft om niet alleen te overleven maar ook te groeien. Hiervoor wordt aangenomen dat de groeisnelheid een indicatie is voor de kwaliteit en kwantiteit van de aan de *Asellus* gedoseerde voedingsstoffen. Een lage groeisnelheid duidt op slechte condities voor de *Asellus* met waarschijnlijk te weinig en/of niet geschikte voedingsstoffen. Een hoge groeisnelheid daarentegen duidt op goede experimentele condities met voldoende beschikbare voedingsstoffen. De blanco, of negatieve controle, is de conditie met alleen water zonder extra dosering van mogelijke voedingsstoffen. De positieve controle is water met bladmateriaal. Aangezien bladmateriaal ook in de kweekbakken wordt gebruikt, wordt er vanuit gegaan dat deze voldoende voedingsstoffen bevatten voor groei en overleving. De kwantiteit en kwaliteit van de voedingsbron is niet de enige parameter die de groeisnelheid beïnvloedt, ook andere experimentele condities of bijvoorbeeld de startlengte van de *Asellus* kunnen naar verwachting de groeisnelheid beïnvloeden.

Statistische analyse (Kruskal-Wallis met Dunn's test; Tabel 3) van verschillen in groeisnelheid (dag 0 – laatste meetpunt) tussen condities laat zien dat in 2019 de groeisnelheid op water van Braakman '2.Water\_BRA\_2019' significant lager is dan wanneer een voedingsbron is gedoseerd ('5.Sed\_BRA\_2019' of '3.Blad\_2019'). Er is geen significant verschil in groeisnelheid tussen de andere twee 'water'-condities ('6.Water\_KWR\_2020' of '1.Water\_KRL\_2019') en de condities waarbij een voedingsbron aan één van deze watertypen is toegevoegd. Het toevoegen van sediment of bladmateriaal leidt dus in een aantal gevallen tot verbeterde condities resulterend in (licht) hogere groeisnelheden.

De groeisnelheid op de verschillende ‘water’-condities is grotendeels vergelijkbaar tussen water van KWR (2020), Braakman (2019) en Kralingen (2019). Er is alleen een significant verschil gemeten tussen water van Kralingen en Braakman in 2019, veroorzaakt door de negatieve groeisnelheden van de laatste conditie. Deze negatieve groeisnelheid suggereert dat de *Asellus* krimpt. Aangezien *Asellus* een exoskelet heeft, is dit niet mogelijk en wordt dit vermoedelijk veroorzaakt door technische oorzaken. Dit wordt in paragraaf 4.2 verder besproken.

Er zijn nauwelijks verschillen in groeisnelheid tussen de verschillende ‘sediment’-condities onderling (b.v. Braakman 2019 vs 2020), de twee bladcondities onderling en de twee hemoflow-condities onderling. Uitzondering lijkt ‘4.Sed\_KRL\_2019’ te zijn met een hogere groeisnelheid dan Kralingen-sediment in 2020. Dit is bijzonder aangezien de overlevingsduur van *Asellussen* op Kralingen-sediment in 2019 erg kort is (Figuur 6). Daarnaast is de groeisnelheid op Kralingen-sediment in 2020 significant lager dan de twee bladcondities.



Figuur 9. Boxplot van groeisnelheid per conditie van dag 0 tot laatste meetpunt. HF = Hemoflowconcentraat, Sed = sediment, Wat = Water, KRL = Kralingen, BRA = Braakman.

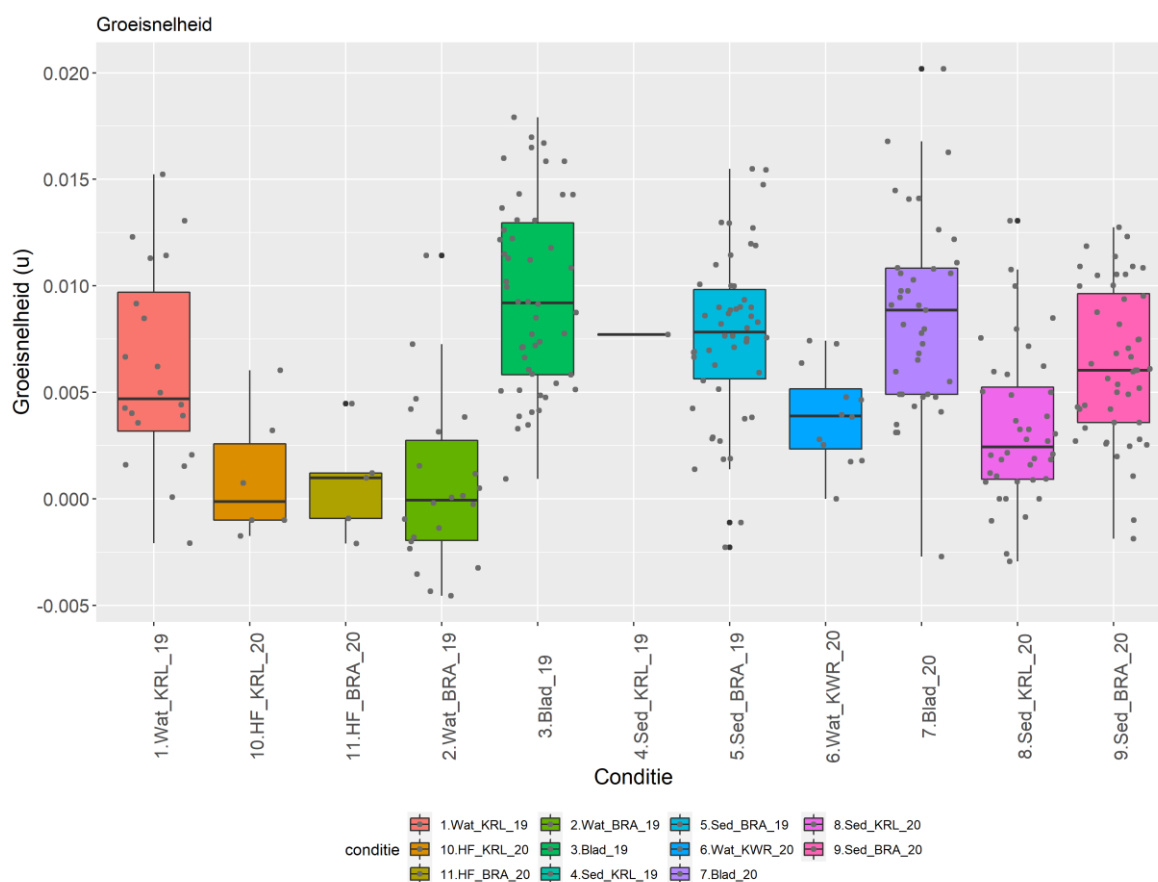
Tabel 3. Significante verschillen in groeiselheden (dag 0 tot laatste meetpunt) tussen de verschillende condities. De condities zijn gesorteerd op gemiddelde groeiselheid. Kruskal-Wallis test met Dunn's test en Bonferroni

|                  | 11.HF_<br>BRA_2020 | 10.HF_<br>KRL_2020 | 8.Sed_<br>KRL_2020 | 5.Sed_<br>BRA_2019 | 2.Water_<br>BRA_2019 | 6.Water_<br>KWR_2020 | 9.Sed_<br>BRA_2020 | 1.Water_<br>KRL_2019 | 7.Blad_<br>2020 | 3.Blad_<br>2019 |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| 11.HF_BRA_2020   |                    |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                      |                 |                 |
| 10.HF_KRL_2020   | p > 0.05           |                    |                    |                    |                      |                      |                    |                      |                 |                 |
| 8.Sed_KRL_2020   | p > 0.05           | p > 0.05           |                    |                    |                      |                      |                    |                      |                 |                 |
| 5.Sed_BRA_2019   | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           |                    |                      |                      |                    |                      |                 |                 |
| 2.Water_BRA_2019 | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05           |                      |                      |                    |                      |                 |                 |
| 6.Water_KWR_2020 | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05             |                      |                    |                      |                 |                 |
| 9.Sed_BRA_2020   | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05             | p > 0.05             |                    |                      |                 |                 |
| 1.Water_KRL_2019 | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05             | p > 0.05             | p > 0.05           |                      |                 |                 |
| 7.Blad_2020      | p > 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05             | p > 0.05             | p > 0.05           | p > 0.05             |                 |                 |
| 3.Blad_2019      | p > 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05             | p > 0.05             | p > 0.05           | p > 0.05             | p > 0.05        |                 |
| 4.Sed_KRL_2019   | p > 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05           | p > 0.05           | p < 0.05             | p > 0.05             | p > 0.05           | p > 0.05             | p > 0.05        | p > 0.05        |

Als de groeiselheid tussen dag 0 en 28 wordt berekend is er meer variatie zichtbaar (Figuur 10) dan in bovenstaande grafiek waarin de groeiselheid wordt berekend tussen dag 0 en het laatste meetpunt (Figuur 9). Vergelijkbaar met de resultaten uit Tabel 3 laat statistische analyse (Kruskal-Wallis met Dunn's test; Tabel 4) van verschillen in groeiselheid (dag 0 – dag 28) tussen condities zien dat in 2019 de groeiselheid op water van Braakman '2.Water\_BRA\_2019' significant lager is vergeleken met wanneer een voedingsbron wordt gedoseerd ('5.Sed\_BRA\_2019' of '3.Blad\_2019'). Er is weer geen significant verschil in groeiselheid tussen de andere twee 'water'-condities ('6.Water\_KWR\_2020' of '1.Water\_KRL\_2019') en de condities waarbij een voedingsbron aan één van deze watertypen is toegevoegd. Een positief effect van het toevoegen van een voedingsstof is dus vooral zichtbaar in het experiment met Braakman-water uit 2019. Het toevoegen van hemoflowconcentraat heeft geen effect op de groeiselheid, maar dit wordt vooral veroorzaakt doordat de meeste *Asellus* zijn overleden voor dag 28 en de overige *Asellus* niet of nauwelijks zijn gegroeid. Een betere overleving wordt dus niet altijd terug gezien in verschillen in groeiselheid.

Er is weinig verschil in de *Asellus*-groeiselheid van de verschillende 'water'-condities: water van KWR (2020), Braakman (2019) en Kralingen (2019). Alleen de groeiselheid van Braakman-water in 2019 is significant lager dan Kralingen-water in hetzelfde jaar.

Er zijn geen significante verschillen in groeiselheid tussen de twee sedimenten uit beide jaren (b.v. Braakman-sediment uit 2019 vs 2020), de twee bladcondities (2019 vs 2020) en de twee hemoflow-condities onderling (Kralingen vs Braakman). Het verschil in groeiselheid tussen Kralingen-sediment uit 2019 en 2020, zoals beschreven in Figuur 9, is hier niet aangetroffen. Ook nu is de groeiselheid op Kralingen-sediment in 2020 significant lager dan de twee bladcondities.



Figuur 10. Boxplot van groeiselheid per conditie van dag 0 tot 28. HF = Hemoflowconcentraat, Sed = sediment, Wat = Water, KRL = Kratingen, BRA = Braakman.

Tabel 4. Significante verschillen in groeiselheden (dag 0 – 28) tussen de verschillende condities. De condities zijn gesorteerd op gemiddelde groeiselheid. Kruskal-Wallis test met Dunn's test en Bonferroni

|                  | 2.Water_ | 10.HF_   | 11.HF_   | 8.Sed_   | 6.Water_ | 1.Water_ | 9.Sed_   | 5.Sed_   | 4.Sed_   | 7.Blad   |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                  | BRA_2019 | KRL_2020 | BRA_2020 | KRL_2020 | KWR_2020 | KRL_2019 | BRA_2020 | BRA_2019 | KRL_2019 | _2020    |
| 2.Water_BRA_2019 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 10.HF_KRL_2020   | p > 0.05 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 11.HF_BRA_2020   | p > 0.05 | p > 0.05 |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 8.Sed_KRL_2020   | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |          |          |          |          |          |          |          |
| 6.Water_KWR_2020 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |          |          |          |          |          |          |
| 1.Water_KRL_2019 | p < 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |          |          |          |          |          |
| 9.Sed_BRA_2020   | p < 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |          |          |          |          |
| 5.Sed_BRA_2019   | p < 0.05 | p < 0.05 | p > 0.05 | p < 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |          |          |          |
| 4.Sed_KRL_2019   | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |          |          |
| 7.Blad_2020      | p < 0.05 | p < 0.05 | p < 0.05 | p < 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |          |
| 3.Blad_2019      | p < 0.05 | p < 0.05 | p < 0.05 | p < 0.05 | p < 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 | p > 0.05 |

De analyse van de groeicurven en groeiselheden laat zien dat *Asellus* vooral in de eerste 28 dagen groeit en dat er (significante) verschillen in groeiselheid gemeten kunnen worden. Deze verschillen komen grotendeels overeen met de overleving, maar niet alle condities met een betere overleving laten ook een hogere groeiselheid zien.

### 3.3 Chemische en microbiologische samenstelling water, sediment, hemoflowconcentraat en *Asellus*

#### 3.3.1 Chemische samenstelling

Op het water, sediment en hemoflowconcentraat dat is gebruikt in de overlevingsexperimenten zijn een groot aantal analyses uitgevoerd. Alle meetresultaten zijn opgenomen in Tabel 11 (Bijlage III), in Tabel 12 is berekend wat de concentratie is van de verschillende stoffen in het overlevingsexperiment. Van deze tabel zijn in onderstaande Tabel 5 de belangrijkste resultaten en verschillen tussen de condities opgenomen, deze worden ook besproken in het rapport.

*Tabel 5. Samenvatting van de chemische samenstelling van de verschillende condities in het overlevingsexperiment: water, water met hemoflowconcentraat en water met sediment (hele tabel is opgenomen in Bijlage III, Tabel 12). Het bladmateriaal is niet geanalyseerd en daarom niet weergegeven in deze tabel. PHMOC: particulate high molecular organic carbon, PHMPC: particulate high molecular protein carbon, PHMCHC: particulate high molecular carbohydrate carbon. \* Gemeten concentraties, #: berekende concentraties, # berekende concentratie is gebaseerd op alleen de resultaten van de ICP-MS of de XRF-analyse en daardoor niet volledig, <sup>5</sup> indicatieve waarde door te veel bijgroei van bacteriestam p17. Alle gemeten concentraties (water, hemoflowconcentraat en sediment) staan vermeld in Tabel 11.*

|                                |                      | Analyse | Water_ BRA_19* | Water_ KRL_19* | Water_ KWR_20* | Water+HF_ BRA_20# | Water+HF_ KRL_20# | Water+Sed_ BRA_19 <sup>5</sup> | Water+Sed_ BRA_20 <sup>5</sup> | Water+Sed_ KRL_19 <sup>5</sup> | Water+Sed_ KRL_20 <sup>5</sup> |
|--------------------------------|----------------------|---------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| N-totaal                       | mg/l N               | AQZ     | 2,2            | 2,1            |                |                   |                   |                                |                                |                                |                                |
| Ammonium                       | mg/l NH <sub>4</sub> | AQZ     |                |                | <0,03          | <0,03             | <0,03             |                                |                                |                                |                                |
| Nitraat                        | mg/l NO <sub>3</sub> | AQZ     | 7,5            | 7,6            | <1,0           | <1,0              | <1,0              |                                |                                |                                |                                |
| Nitriet                        | mg/l NO <sub>2</sub> | AQZ     | <0,01          | <0,01          | <0,01          | 0,01              | 0,01              |                                |                                |                                |                                |
| P-totaal                       | mg/l P               | AQZ     | <0,1           | <0,1           |                |                   |                   |                                |                                |                                |                                |
| Stikstof                       | mg/l N               | AQZ     | 0,55           | 0,38           |                |                   |                   |                                |                                |                                |                                |
| Fosfaat-ortho                  | mg/l PO <sub>4</sub> | AQZ     | <0,3           | <0,3           | 0,05           |                   |                   |                                |                                |                                |                                |
| PHMOC                          | mg C/l               | KWR     |                |                |                | 0,00037           | 0,00036           |                                |                                |                                |                                |
| PHMPC                          | mg C/l               | KWR     |                |                |                | 0,00003           | 0,00002           |                                |                                |                                |                                |
| PHMCHC                         | mg C/l               | KWR     |                |                |                | 0,00016           | 0,00019           |                                |                                |                                |                                |
| AOC-A3                         | µg biop.-C/l         | KWR     | 4,6            | 5,7            | 0,245          | 1,1*              | 0,76*             | 180 <sup>5</sup> *             | 190 <sup>5</sup> *             | 170 <sup>5</sup> *             | 160 <sup>5</sup> *             |
| DOC                            | mg C/l               | LC-OCD  | 2189           | 2264           | 1769           | 1769              | 1769              |                                |                                |                                |                                |
| CDOC                           | mg C/l               | LC-OCD  | 2008           | 2146           | 1563           | 1563              | 1563              |                                |                                |                                |                                |
| Biopolymers                    | mg C/l               | LC-OCD  | 83             | 106            | <1             | <1,3              | <1,2              |                                |                                |                                |                                |
| Humuszuren                     | mg C/l               | LC-OCD  | 1049           | 1158           | 1122           | <1122             | <1122             |                                |                                |                                |                                |
| Building blocks                | mg C/l               | LC-OCD  | 552            | 527            | 262            | 262               | 262,1             |                                |                                |                                |                                |
| LMW Acids                      | mg C/l               | LC-OCD  | 16             | 31             | <1             | <1,0              | <1,0              |                                |                                |                                |                                |
| LMW Neutrals                   | mg C/l               | LC-OCD  | 308            | 325            | 179            | 179               | 179               |                                |                                |                                |                                |
| NO <sub>3</sub>                | mg C/l               | LC-OCD  | 1704           | 1841           | 161            | 161               | 161               |                                |                                |                                |                                |
| NH <sub>4</sub>                | mg C/l               | LC-OCD  | <1             | <1             | <1             | <1,0              | <1,0              |                                |                                |                                |                                |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 0,64                           | 0,63                           | 0,37                           | 0,58                           |
| C <sup>#</sup>                 | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 35,04                          | 30,73                          | 55,71                          | 15,15                          |
| CaO                            | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 17,75                          | 100,00                         | 11,91                          | 91,17                          |
| CuO                            | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 0,01                           | 0,02                           | 0,02                           | 0,05                           |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 4,04                           | 3,14                           | 6,75                           | 9,29                           |
| K <sub>2</sub> O               | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 16,69                          | 2,40                           | 16,90                          | 2,42                           |
| MgO                            | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 15,72                          | 12,39                          | 16,54                          | 12,71                          |
| Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 0,10                           | 0,08                           | 0,06                           | 0,05                           |
| MoO <sub>3</sub>               | µg/l                 | XRF     |                |                |                |                   |                   | 0,01                           | 0,00                           | 0,01                           | 0,00                           |

|                                            |      |        |       |       |       |       |       |       |       |        |       |
|--------------------------------------------|------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| N <sup>#</sup>                             | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 3,02  | 2,56  | 1,56   | 1,28  |
| Na <sub>2</sub> O                          | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 98,20 | 25,96 | 107,04 | 25,93 |
| p <sup>#</sup>                             | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,28  | 0,22  | 0,11   | 0,09  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>#</sup> | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,10  | 0,08  | 0,04   | 0,03  |
| SO <sub>3</sub> <sup>#</sup>               | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 1,04  | 0,91  | 0,63   | 0,65  |
| SiO <sub>2</sub> <sup>#</sup>              | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 6,73  | 9,10  | 5,58   | 15,30 |
| TiO <sub>2</sub>                           | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,04  | 0,04  | 0,03   | 0,05  |
| ZnO                                        | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,04  | 0,04  | 0,04   | 0,06  |
| Aluminium                                  | µg/l | ICP-MS | 4,6   | 1,6   | 5,6   | 5,60  | 5,60  |       |       |        |       |
| Barium                                     | µg/l | ICP-MS | 25    | 24    | 15    | 15,00 | 15,00 |       |       |        |       |
| Boor <sup>#</sup>                          | µg/l | ICP-MS | 58    | 58    | 27    | 27,00 | 27,00 |       |       |        |       |
| Calcium                                    | µg/l | ICP-MS | 4375  | 4325  | 44300 | 44301 | 44301 |       |       |        |       |
| Chroom                                     | µg/l | ICP-MS | 0,51  | <0,50 | <0,50 | <0,50 | <0,50 |       |       |        |       |
| IJzer                                      | µg/l | ICP-MS | <10   | <10   | 13    | 13,00 | 13,00 |       |       |        |       |
| Kalium                                     | µg/l | ICP-MS | 8315  | 8435  | 1170  | 1170  | 1170  |       |       |        |       |
| Koper                                      | µg/l | ICP-MS | 0,63  | 0,78  | <0,50 | <0,50 | <0,50 |       |       |        |       |
| Lithium <sup>#</sup>                       | µg/l | ICP-MS | 8,6   | 8,9   | 3,2   | 3,20  | 3,20  |       |       |        |       |
| Lood                                       | µg/l | ICP-MS | 0,01  | 0,02  | 0,2   | 0,20  | 0,20  |       |       |        |       |
| Magnesium                                  | µg/l | ICP-MS | 7680  | 8065  | 6025  | 6025  | 6025  |       |       |        |       |
| Mangaan                                    | µg/l | ICP-MS | 0,06  | 0,06  | 0,35  | 0,35  | 0,35  |       |       |        |       |
| Natrium                                    | µg/l | ICP-MS | 49030 | 53470 | 12900 | 12900 | 12901 |       |       |        |       |
| Nikkel                                     | µg/l | ICP-MS | 3,4   | 3,4   | <0,10 | <0,10 | <0,10 |       |       |        |       |
| Rubidium <sup>#</sup>                      | µg/l | ICP-MS | 7,2   | 7,2   | 0,55  | 0,55  | 0,55  |       |       |        |       |
| Strontium                                  | µg/l | ICP-MS | 180   | 170   | 155   | 155   | 155   |       |       |        |       |
| Tin                                        | µg/l | ICP-MS | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,50 | <0,50 |       |       |        |       |
| Uranium <sup>#</sup>                       | µg/l | ICP-MS | 0,04  | 0,4   | 0,06  | 0,06  | 0,06  |       |       |        |       |
| Vanadium                                   | µg/l | ICP-MS | 0,19  | <0,05 | 0,16  | 0,16  | 0,16  |       |       |        |       |
| Wolfraam                                   | µg/l | ICP-MS | 0,13  | 0,03  | 0,13  | 0,13  | 0,13  |       |       |        |       |
| Zink                                       | µg/l | ICP-MS | 1,1   | 1,6   | 1,1   | 1,10  | 1,10  |       |       |        |       |

### Drinkwater en hemoflowconcentraat

#### Fosfaat- en stikstofsamenstelling

Het drinkwater af pompstation van Braakman en Kralingen verschilt nauwelijks in de concentratie totaal stikstof, fosfaat, nitriet en nitraat (Tabel 5 en Tabel 11, Tabel 12 in Bijlage III). Alleen het stikstofgehalte bepaald met de Kjeldahl-methode (totaal van organisch stikstof, ammoniak [NH<sub>3</sub>] en ammonium [NH<sub>4</sub>]) is in Kralingen lager dan in Braakman. De fosfaat- en stikstofsamenstelling van het hemoflowconcentraat van Kralingen en Braakman lijken ook sterk op elkaar.

Het nitraatgehalte is vergelijkbaar tussen hemoflowconcentraat en drinkwater. Het ammoniumgehalte in het Braakman-hemoflowconcentraat is sterk verhoogd vergeleken met de andere watermonsters. De oorzaak hiervan is niet bekend. Mogelijk heeft het te maken met het bewaren van het watermonsters tijdens transport bij 4°C zonder toevoeging van een conserveringsmiddel, al is niet duidelijk hoe bij deze lage temperatuur ammonium gevormd kan worden. Transport zonder conserveringsmiddel is echter wel conform de voorschriften van DOC Labor. De LC-OCD ammoniumwaarde voor het hemoflowconcentraat van Braakman is echter wel vergelijkbaar met de ammonium waarde voor het Braakman hemoflowconcentraat.

### *Koolstofsamenstelling*

In het concentraat van Kralingen zijn meer koolhydraten (PHMCHC) aanwezig dan in het concentraat van Braakman, maar er zijn geen verschillen in het gehalte eiwitten (PHMPC) en het totale gehalte organisch koolstof (PHMOC, Tabel 5 en Tabel 11, Tabel 12 in Bijlage III). Het hogere koolhydraatgehalte komt overeen met de hogere TOC concentratie van het drinkwater van Kralingen. Aan de overlevingsexperimenten is 115 µl hemoflowconcentraat toegevoegd, dit komt overeen met 3,6 µg C als PHMOC.

Uit de LC-OCD analyse blijkt ook dat de organisch koolstofsamenstellingen van het drinkwater van Kralingen en Braakman af pompstation sterk op elkaar lijken. Er zijn echter wel enkele duidelijke verschillen met het drinkwater van KWR (ps. Tull en 't Waal, grondwaterproductielocatie). Het DOC-gehalte van Braakman en Kralingen is hoger dan KWR, dit wordt onder andere veroorzaakt door een hogere concentratie biopolymeren en building blocks (afbraak- en oxidatieproducten van humuszuren, ongeveer 300 – 450 Da). Het licht hogere DOC-gehalte van het drinkwater van Kralingen, vergeleken met Braakman, wordt veroorzaakt door hogere biopolymeren- en humuszurengehaltes. Het vastgestelde biopolymerengehalte in Braakman is relatief hoog vergeleken met metingen van Evides in eerdere jaren en andere watertypen (b.v. drinkwater geproduceerd uit onttrokken duininfiltraat heeft een waarde 10 – 20 µg/l). Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat bij Braakman een spaarbekken sinds 2017 weer in gebruik is genomen en defosfatering met ijzerchloride wordt toegepast waardoor meer organisch materiaal in het ruw water aanwezig is dat (nog) niet (geheel) wordt verwijderd tijdens de zuivering. Beide drinkwatermonsters van Evides bevatten meer DOC, biopolymeren, building blocks en NO<sub>3</sub> dan het drinkwater van KWR.

Het hemoflowconcentraat bevat een hoge concentratie DOC (27,2 en 28,9 mg/l) wat min of meer vergelijkbaar is met de hierboven beschreven PHMOC-concentratie (31 – 31 mg/C/l). Het DOC in het concentraat bestaat nagenoeg alleen uit biopolymeren, met een klein aandeel building blocks. Het gehalte humuszuren is onder de detectielimiet. (Aquatische) humuszuren (ongeveer 1000 Da, humuszuren en fulvozuren) zijn vluchtige organische stoffen die makkelijk reageren met andere stoffen. Tijdens het hemoflowen is er veel contacttijd en contact mogelijk met andere stoffen waardoor dit waarschijnlijk de afwezigheid, of zeer lage concentratie, van humuszuren in hemoflowconcentraat verklaart. Het laboratorium dat de LC-OCD test heeft uitgevoerd (DOC Labor) heeft aangegeven dat deze niet berekend kan worden omdat het signaal overlapt met een (onbekend) polymeer. Het is daarom mogelijk dat er toch een laag gehalte humuszuren aanwezig is.

### *AOC-A3*

Uit de AOC-A3 analyse blijkt dat de concentratie assimileerbare biopolymeren in het water weinig verschilt tussen de drinkwatermonsters van Evides (Braakman: 4,6 en Kralingen; 5,7 µg biopolymeren-C/l; Tabel 5 en Tabel 11, Tabel 12 in Bijlage III), maar dat deze wel ongeveer 100x hoger is dan drinkwater van KWR (Blanco: 0,04 – 0,45), hetgeen niet vreemd is gezien het verschil in ruwwaterbron.

Op één na zijn alle gemeten AOC-A3 waarden van water met sediment alleen indicatief door te veel groei van de p17 bacteriestam (§ in Tabel 5 en Tabel 11, Tabel 12 in Bijlage III). Dit geeft aan dat het gehalte makkelijk afbreekbare stoffen erg hoog was. De biopolymerengehaltes van alle sedimentmonsters zijn min of meer vergelijkbaar met elkaar, rekening houdend met het feit dat de resultaten niet absoluut maar indicatief zijn. Het uitgegloeide Filcom zand bevat geen biopolymeren die door de stam A3 voor groei gebruikt kunnen worden, wat aantoont dat door het uitgloeien zeer waarschijnlijk alle koolstofverbindingen zijn verwijderd.

De berekende concentratie biopolymeren in het hemoflowconcentraat die door de A3 bacteriestam kunnen worden gebruikt voor vermeerdering, lager vergeleken met de LC-OCD resultaten (Tabel 11, Tabel 12 in Bijlage III). Het is de verwachting dat AOC-A3 en LC-OCD vergelijkbare resultaten geven of dat de AOC-A3 resultaten lager zijn dan de LC-OCD aangezien mogelijk niet alle biopolymeren die met de LC-OCD gemeten worden door de A3 bacteriën gebruikt kunnen worden voor groei.

### ICP-MS

Braakmanwater bevat meer aluminium dan Kralingenwater (4,6 vs 1,6 µg/l) wat kan worden gerelateerd aan het gebruik van aluminium in de zuivering van Braakman voor coagulatie, terwijl in Kralingen ijzer wordt gebruikt (Tabel 5 en Tabel 11, Tabel 12 in Bijlage III). De ijzerconcentraties van beide watermonsters liggen onder de detectiegrens. Verder heeft Kralingen hogere concentraties kalium, natrium, koper, magnesium en uranium en heeft Braakman hogere concentraties wolfram, vanadium en strontium. Het water van KWR heeft (soms sterk) hogere concentraties van aluminium, calcium, fosfor, lood en een lagere concentraties barium, boor, kalium, lithium, natrium, nikkel, rubidium.

Ten opzichte van het drinkwater bevatten de hemoflow concentraten een sterk verhoogd gehalte aluminium, calcium, chroom, fosfor, ijzer, koper, lood, tin en zink. Deze stoffen worden geconcentreerd tijdens de ultrafiltratie de concentratie van de andere stoffen is vergelijkbaar met drinkwater en worden dus niet geconcentreerd tijdens ultrafiltraties (hemoflow).

### Sediment

De XRF-analyse laat slechts beperkte verschillen zien tussen de twee Braakman ruwe sedimentmonsters (Figuur 20 en Tabel 11 in Bijlage III). De verschillen zitten vooral in calcium (2019: 16,27 en 2020: 211,6 mg/gram), ijzer (208 vs 161,1 mg/gram), koolstof (195 vs 171 mg/gram) en silicium (87,6 vs 118,4 mg/gram). Deze verschillen zorgen echter niet voor een verschil in overleving of groei van *Asellus* (paragraaf 3.2).

Tussen de twee Kralingen sedimentmonsters zijn de verschillen groter: aluminium (2019: 9,1 mg/gram en 2020: 14,1 mg/gram), koolstof (310 vs 84,3 mg/gram), calcium (60,5 vs 47,8 mg/gram), ijzer (348,2 vs 479,3 mg/gram), koper (0,4 – 1,6 mg/gram), silicium (72,6 vs 199 mg/gram), titanium (0,7 vs 1,2 mg/gram) en zink (1,2 vs 1,6 mg/gram).

### Overlevingsexperiment

Er zijn erg weinig verschillen tussen de drinkwatercondities en de water+hemoflowconcentraat condities van het overlevingsexperiment. Per 10 ml drinkwater is 115 µl concentraat toegevoegd, dit staat gelijk aan 112 – 145 ml drinkwater in concentraat. Het effect van deze toevoeging op de concentraties metalen in het overlevingsexperiment zijn echt zeer klein en alleen zichtbaar in de concentratie biopolymeren zoals bepaald met de AOC-A3 test.

Na menging van het sediment gemengd met drinkwater van Braakman, Kralingen (2019) of KWR (2020) zijn er enkele grote verschillen zichtbaar in de condities van de overlevingsexperimenten: calcium (11,91 - 100,00 µg/l), ijzer (3,14 – 9,29 µg/l), kalium (2,40 - 16,69 µg/l), koolstof (15,15 – 55,71 µg/l), magnesium (12,39 – 16,54 µg/l), mangaan (0,05 – 0,1 µg/l), natrium (25,93 - 98,20 µg/l), stikstof (1,28 – 3,02 µg/l), fosfaat (0,09 – 0,28 µg/l) en silicium (5,58 – 15,30 µg/l). Het is echter onduidelijk welke van deze verschillen zorgen voor een verschil in overleving of groei van *Asellus* (paragraaf 3.2).

Uit de verschillen in samenstelling blijkt echter niet duidelijk wat de snelle dood van *Asellus* op Kralingensediment in 2019 en het verschil in overleving tussen Kralingen en Braakmansediment veroorzaakt kan hebben. De hypothese was dat een verhoogd ijzergehalte, mogelijk in combinatie met een andere factor, de oorzaak was van het plakken van sediment aan de *Asellus*. De verschillen in ijzerconcentratie zijn echter beperkt en het ijzergehalte is in 2020 zelfs hoger, mogelijk speelt hier een andere vorm van ijzer ( $\text{Fe}^{2+}$  vs  $\text{Fe}^{3+}$ ) een rol. Een andere hypothese is dat door de hoge concentratie koolstof in Kralingen sediment in 2019 (31%), eventueel gecombineerd met de hoge ijzerconcentratie, dit materiaal aan de *Asellus* is gaan plakken. Uit de metingen is niet duidelijk waaruit het koolstof bestaat, maar mogelijk zijn het door bacteriën uitgescheiden koolhydraten, eiwitten of andere moleculen die een biofilm rond het sediment vormen en 'plakkende' eigenschappen bevatten. Door het plakken van het sediment aan het exoskelet en vermoedelijk ook de kieuwen is de zuurstofopname bemoeilijkt en zeer waarschijnlijk onvoldoende wat tot de snelle dood van *Asellus* heeft geleid. Met de huidige resultaten kan geen eenduidige

conclusie worden getrokken over bovenstaande hypothesen. Mogelijk ligt de oorzaak in een niet gemeten parameter of is de combinatie van verschillen metalen en factoren de oorzaak.

### 3.3.2 Microbiologische samenstelling

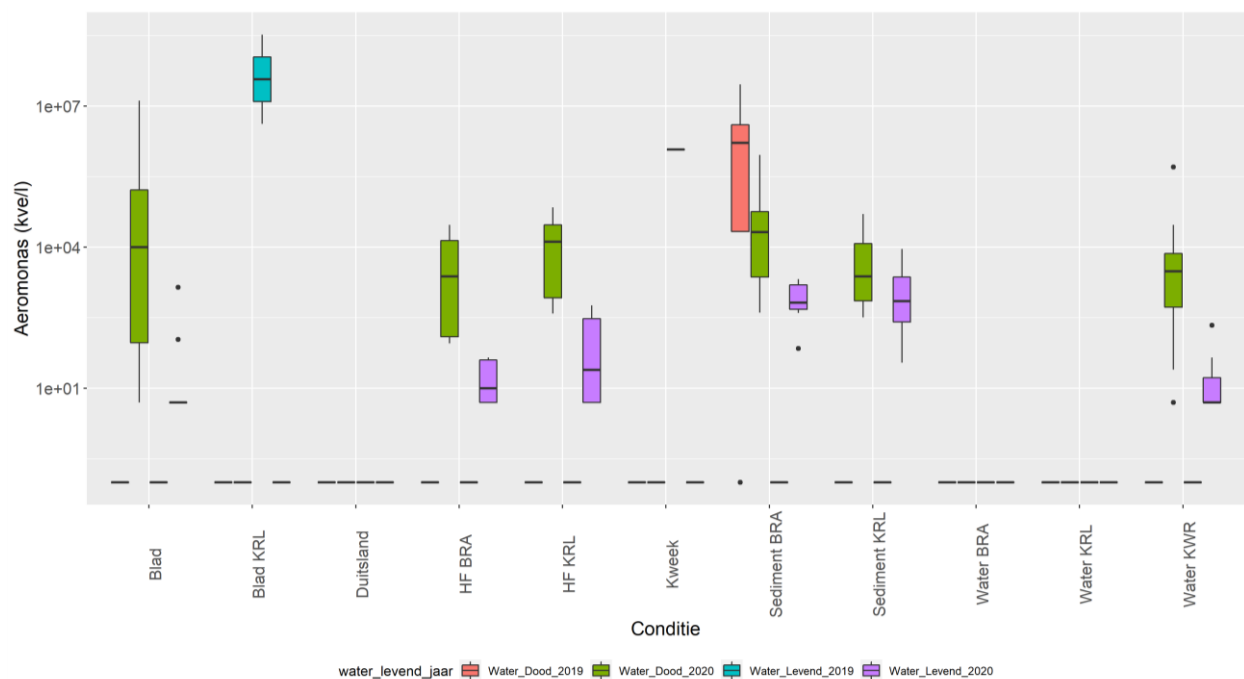
Tijdens de spuiactie in februari 2019 waarbij sediment is verzameld voor de overlevingsexperimenten, is ATP en het *Aeromonas*-aantal in het drinkwater en sediment bepaald. In het uitgaande water van Kralingen en Braakman is in februari 2019 geen *Aeromonas* vastgesteld. In het sediment zijn wel hoge aantallen gemeten waarbij in het Braakmansediment minder *Aeromonas* aanwezig is dan in het Kralingensediment. Het ATP-gehalte is hoger dan normaal in Braakmanwater (42 ng/l), terwijl in Kralingenwater de concentratie normaal is voor drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater (normaal: 4 – 10 ng/l). Wat de oorzaak is voor de hoge ATP-concentratie in Braakman-water is onbekend.

Tabel 6. ATP-concentratie en *Aeromonas*-aantallen in drinkwater en sediment (1:1 verdund met drinkwater) geoogst tijdens de spuiactie van 13-14 februari 2019.

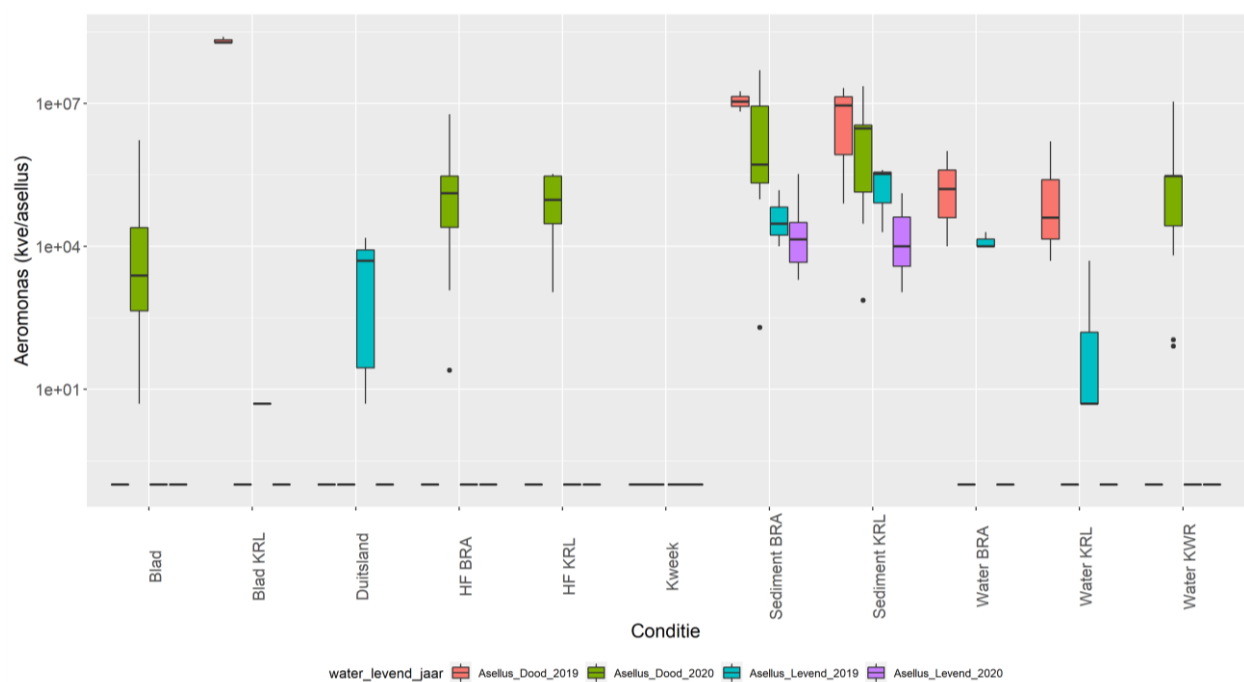
|           |            | ATP                 | <i>Aeromonas</i>    |
|-----------|------------|---------------------|---------------------|
|           |            | (ng/l)              | (cfu/l)             |
| Braakman  | Drinkwater | 42                  | <10                 |
|           | Sediment   | 5,4x10 <sup>4</sup> | 5,0x10 <sup>3</sup> |
| Kralingen | Drinkwater | 9,8                 | <10                 |
|           | Sediment   | 2,5x10 <sup>4</sup> | 4,5x10 <sup>4</sup> |

Tijdens beide overlevingsexperimenten, vooral in het experiment van 2020, zijn in het water en in de *Asellus* veel *Aeromonas*-metingen uitgevoerd (Figuur 11 en Figuur 12). In het water van de condities met een levende *Asellus* zijn ongeveer 1x10<sup>1</sup> – 1x10<sup>3</sup> kve/l *Aeromonas* aanwezig, vergeleken met ongeveer 1x10<sup>2</sup> – 1x10<sup>5</sup> kve/l in water met een dode *Asellus*. In de condities met levende *Asellus* en bladmateriaal zijn echter veel meer *Aeromonas*-bacteriën in het water aangetroffen: ongeveer 1x10<sup>7</sup> kve/l. In sommige gevallen is dit een significant verschil (Tabel 7). Over het algemeen zijn de *Aeromonas*-aantallen lager in condities met een levende *Asellus*. Dit komt overeen met eerder onderzoek en laat zien dat *Aeromonas* niet schadelijk is voor *Asellus*, maar dat er mogelijk sprake is van een symbiotische of neutrale relatie (5). De *Aeromonas*-aantallen in water met een dode *Asellus* zijn vergelijkbaar tussen de verschillende voedselcondities (hemoflowconcentraat, water, blad, sediment), maar in aanwezigheid van een levende *Asellus* zijn de aantallen hoger bij sediment als voedselbron en lager als de voedselbron uit blad of sediment bestaat.

De *Aeromonas*-aantallen in en op een *Asellus* variëren sterk: van onder de detectielimiet, tot >10<sup>8</sup> kve/*Asellus* (Figuur 12). De *Aeromonas*-aantallen zijn vooral hoog als de *Asellus* al dood was op het moment van de meting. In levende *Asellus* komen lagere aantallen voor. Ook hier zijn de *Aeromonas*-aantallen hoger als sediment aanwezig is en juist lager als er hemoflowconcentraat of alleen water aanwezig is. In slechts enkele gevallen is dit een significant verschil (Tabel 8).



Figuur 11. *Aeromonas*-aantallen in water tijdens verschillende behandelingen in het overlevingsexperiment. Alle individuele datapunten zijn gegeven. De streepjes onderin geven aan dat er geen resultaten beschikbaar zijn van deze conditie.



Figuur 12. *Aeromonas*-aantallen in en op een *Asellus* tijdens verschillende behandelingen in het overlevingsexperiment. Alle individuele datapunten zijn gegeven. De streepjes onderin geven aan dat er geen resultaten beschikbaar zijn van deze conditie.

Tabel 7. P-waarden van Kruskal-Wallis test voor significanties van verschillen in *Aeromonas*-aantallen in water (Dunn's met Bonferroni correctie). Groen: p-waarde < 0,05; rood: p-waarde ≥ 0,05. Duitsland = waterpissebedden afkomstig uit particuliere kweek in Duitsland (zie paragraaf 2.1.1).

[illegible]

Tabel 8. P-waarden van Kruskal-Wallis test voor significanties van verschillen in *Aeromonas*-aantallen in *Asellus* (Dunn's met Bonferroni correctie). Groen: p-waarde < 0,05; rood: p-waarde ≥ 0,05. Duitsland = waterpissebedden afkomstig uit particuliere kweek in Duitsland (zie paragraaf 2.1.1).

[illegible]

## 4 Discussie

### 4.1 Experimentele condities: beschikbaarheid *Asellus* en sediment

Voor het soort overlevingsexperimenten dat hier is beschreven, met de soms grote variatie binnen één conditie, is een groot aantal *Asellussen* nodig om statistisch significante verschillen daadwerkelijk te kunnen detecteren. In de voorbereidingen van de experimenten en uit ervaring van Evides bleek dat met spuien niet voldoende waterpissebedden verzameld kunnen worden om voldoende *Asellussen* van de gewenste grootte te hebben bij de start van het experiment. Uit het voorgaande project bleek echter dat de herkomst van *Asellussen* niet uit lijkt te maken voor groei- en overlevingsresultaten (6). Om deze reden is een eigen kweek opgezet zodat er altijd voldoende *Asellussen* van de juiste grootte zijn bij de start van de experimenten.

De hoeveelheid sediment die vrijkomt bij spuien blijft echter een onzekere factor. In het tweede experiment (start februari 2020) is hier rekening mee gehouden door al ruim voor de start van de experimenten sedimentmateriaal te verzamelen op verschillende locaties en dit in te vriezen. In het eerste experiment (start februari 2019) was in principe het sediment volume van Kralingen onvoldoende om het gehele overlevingsexperiment en de analyses voor sediment karakterisatie uit te kunnen voeren. Door het snelle afsterven van *Asellus* bij dat sediment bleek die analyse uiteindelijk toch mogelijk.

### 4.2 Geschiktheid gebruikte protocol

#### 4.2.1 Overleving op voedselbronnen

Het gebruikte protocol levert duidelijk te interpreteren en reproduceerbare resultaten op voor de overlevingsexperimenten. Er zijn duidelijke en soms significante verschillen zichtbaar in de overleving op de verschillende voedselbronnen (water, hemoflowconcentraat, sediment, blad). Het protocol is dus geschikt voor overlevingsexperimenten van *Asellus*.

#### 4.2.2 Lengtemetingen

Voor de groeicondities gebaseerd op lengtebepaling zijn de data echter minder eenduidig. In het eerste experiment werd regelmatig negatieve lengtegroei gemeten. Dit was vooral zichtbaar in de behandeling met Braakman-water uit 2019, maar negatieve groei is in meerdere behandelingen waargenomen. Dit is een effect dat niet verwacht wordt bij dieren met een exoskelet. De enige logische verklaring lijkt dat door de ligging van de *Asellussen* (ondanks dat hier zo veel mogelijk op is gelet) en/of de breking van het water afleesfouten ontstaan van de lengte van de waterpissebedden, waardoor er soms over- en soms onderschattingen van de lengtegroei ontstaan. De grote spreiding in de waarnemingen in het eerste experiment lijkt hierop te wijzen. In het tweede experiment is geprobeerd om *Asellussen* te selecteren die kleiner zijn en waarvan de lengteverdeling homogener is. Dit heeft geleid tot een lagere spreiding in de groeisnelheid binnen en tussen de condities.

Indien er groei optreedt, vindt deze vooral plaats tussen dag 0 en 7 - 28, waarna de groei afvlakt of geen groei meer plaats vindt. Het is onduidelijk waarom de groei zo laag was in beide experimenten en afvlakte na de eerste paar weken. Aangezien elke week vers voedsel wordt gedoseerd, en dit in de meeste condities voldoende is voor groei in de eerste weken, is het onwaarschijnlijk dat de stabilisatie van groei veroorzaakt wordt door een voedseltekort. Een andere optie is dat de experimentele opzet voor stress zorgt waardoor de *Asellussen* een lagere maximale lengte kunnen bereiken dan in de kweekbakken.

Lengtemetingen zijn dus vooral zinvol als bij de start van het overlevingsexperiment kleine waterpissebedden (3 – 4 mm) worden gebruikt en als de groeisnelheid over de eerste 28 dagen wordt berekend.

#### 4.2.3 Geschikte negatieve controle

In de experimenten waarin alleen water wordt gedoseerd (gebruikt als negatieve controle) liep de *Asellus* continu rond in de well, terwijl in de sediment- en bladcondities de *Asellus* vrijwel continu stil zat op een groter deel van het sediment of op de onderkant van het blad. In een korte test is nagegaan of de snellere afsterving van *Asellus* in alleen water, vergeleken met de sediment- en bladcondities, veroorzaakt wordt door uitputting door te veel rondlopen van de *Asellus*. Hiervoor is uitgegloeid filtermateriaal van Filcom, dat geen organische stoffen meer bevat, gebruikt. De langere overleving van *Asellus* op dit filtermateriaal zonder organische stof en heel weinig nutriënten laat zien dat bij het continue rondlopen de *Asellus* inderdaad eerder sterft. Dat zou kunnen komen doordat het bewegen extra energie kost. De opvallende overlap tussen het uitgegloeide Filcom filtermateriaal en het Kralingen-sediment uit 2020 doet vermoeden dat dit Kralingen sediment geen geschikte voedingsstoffen bevat voor groei en overleving van *Asellus*. Visuele observatie laat echter zien dat er wel fecale pellets worden gevormd (Figuur 4) en dat het sediment dus blijkbaar wel wordt gegeten. Ondanks dat uit verschillende chemische analyses en de AOC-A3 test blijkt dat er wel organisch koolstof en biopolymeren aanwezig zijn in dit type sediment doet dit vermoeden dat deze stoffen blijkbaar niet voldoende voedzaam en/of beschikbaar zijn voor *Asellus*. De aanwezigheid van het Kralingen sediment lijkt vooral te voorkomen dat *Asellus* energie verspilt door rond te blijven lopen in de well maar juist houvast te bieden, vergelijkbaar met het Filcom filtermateriaal.

Het is belangrijk om in vervolgent experimenten zo goed mogelijk rekening te houden met bovenstaande aspecten bij het kiezen van een negatieve controle. Hierdoor wordt in het experiment uitsluitend het effect van verschil in voedselkwaliteit en –hoeveelheid getest en niet indirect ook het effect van andere condities die in dit geval tot uitputting en versnelde afsterving kunnen leiden.

### 4.3 Rol van voedselkwaliteit voor groei en overleving

De effecten van de vier verschillende voedselbronnen op (voornamelijk) overleving, verschillen sterk. Zo zorgt hemoflowconcentraat voor een snellere afsterving dan op alleen water, is het sediment van Braakman in beide experimenten de beste voedselbron en lijkt sediment van Kralingen de overleving sterk te verlagen te zijn (2019) of onvoldoende beschikbare voedingsstoffen te bevatten (2020).

De oorzaak van de acute sterfte van *Asellus* op Kralingen-sediment uit 2019 is niet duidelijk. De chemische samenstelling van het sediment varieert vooral in het ijzer- en koolstofgehalte, tussen in beide jaren. Mogelijk heeft het hoge koolstofgehalte voor een ‘plakkend’ effect gezorgd, een andere hypothese is dat door een fysisch-chemisch verschijnsel het sediment plakt aan de waterpissebedden. Hierdoor kan beweging, voedselopname en ook zuurstofopname van de *Asellus* gehinderd worden. Ook bij lage doseringen is dit effect al te zien. De oorzaak zou gezocht kunnen worden in een residu van het bij de drinkwaterbehandeling gebruikte flocculatie- of coagulatiemiddel, ijzerzouten of ijzerdeeltjes (uit aanwezige gietijzeren leidingen) met een coagulerende werking.

Braakmansediment is een goede voedselbron voor *Asellus* en verlengt de overleving, maar heeft geen significant effect op groei. Dit resultaat lijkt tegengesteld te zijn aan de praktijksituatie waarbij in het distributienet van Braakman nauwelijks *Asellus* voorkomt, maar juist wel in het distributienet van Kralingen. Dit laat zien dat de beschikbaarheid van een geschikte voedselbron (Braakmansediment) waar *Asellus* in principe op kan overleven niet de belangrijkste bepalende factor voor de populatieontwikkeling in het leidingnet is, maar dat ook andere factoren een rol spelen. Een mogelijkheid is de leidingconfiguratie waarin meer of minder ‘schuilplaatsen’ voor *Asellus* aanwezig kunnen zijn waarin mogelijk een gunstig microklimaat heerst.

Uit het grote verschil tussen de hemoflow en de sedimentdoseringen blijkt dat de biopolymeren in het drinkwater zeer waarschijnlijk geen directe voedselbron vormen voor *Asellus*. De iets snellere afsterving van *Asellus* op hemoflowconcentraat in vergelijking tot de negatieve controle (alleen water), met hoogmoleculair deeltjesgebonden organisch materiaal, kan twee oorzaken hebben: i) het hemoflowconcentraat bevat te weinig beschikbare nutriënten, of er is te weinig toegevoegd per well, of ii) het hemoflowconcentraat bevat stoffen die in de toegediende concentratie toxisch zijn. *Asellus* staat bekend als een grazer die biofilm van materialen (waaronder sediment) graast en gebruikt als voedselbron, en is geen organisme dat deeltjes in oplossing kan gebruiken als voedselbron. Aangezien de afsterving van *Asellus* op hemoflowconcentraat sterker is dan op alleen drinkwater suggereert dit dat het hemoflowconcentraat stoffen bevat die, alleen of in combinatie, in beperkte mate nadelig zijn voor *Asellus* in de concentraties die in het experiment zijn toegevoegd. Op basis van de chemische karakterisatie van het hemoflowconcentraat is berekend welke concentratie metalen aan het experiment is toegevoegd (Tabel 11 in Bijlage III). De meeste metalen zijn in ng/l concentraties aanwezig in het experiment. Deze lage concentratie worden veroorzaakt doordat tijdens de hemoflow concentratie de stoffen minder sterk zijn geconcentreerd (factor 10 – 200) dan het drinkwater zelf (Kralingen: 971x, Braakman: 1257x). In sommige gevallen wordt dit veroorzaakt door het (te) lage molecuulgewicht waardoor de stoffen het hemoflow-membraan kunnen passeren. Door deze lagere concentratiefactor is de concentratie metalen en organisch koolstof dat is toegevoegd aan de *Asellus* relatief laag.

Deze concentraties zijn ruim lager dan concentratie waarvan in de literatuur wordt beschreven dat deze bij acute of chronische blootstelling toxisch zijn voor *Asellus*. Zo is de  $LC_{50}$  (de concentratie waarbij 50% van de individuen in een experiment overlijdt) van aluminium 6,57 ppm (6,57 mg/l) bij 48 uur en 4,37 ppm (4,37 mg/l) bij 96 uur (9) en heeft 100 – 500 µg/l aluminium gedurende 50 dagen geen effect op overleving (10). De  $LC_{50}$ -waarde van koper is vergelijkbaar met aluminium: 1,2 – 9,2 ppm bij 48 – 96 uur blootstelling (9, 11-13) en groei van jonge *Asellussen* wordt geremd bij langdurige blootstelling aan 5 µg/l (14). Voor chroom (9), ijzer (9, 13), lood (9, 15) en zink (9, 12, 13) liggen de  $LC_{50}$  waarden nog hoger. Het is hierdoor onduidelijk welke stof de snellere afsterving van *Asellus* veroorzaakt. Mogelijk is het een combinatie van metalen die elkaars negatieve effect op *Asellus* versterken. Hierover is echter geen informatie beschikbaar. Er zijn een aantal stoffen die in hoge µg/l concentraties aanwezig zijn: calcium, kalium, magnesium en natrium. Deze concentraties liggen echter nog steeds (ver) onder concentraties die in drinkwater aanwezig zijn en het lijkt onwaarschijnlijk dat deze stoffen bijvoorbeeld de osmotische balans van het water dusdanig sterk beïnvloeden dat dit leidt tot afsterving van *Asellus*.

Uit bovenstaande resultaten wordt geconcludeerd dat de waterkwaliteit (vooral hemoflowconcentraat) de overleving van *Asellus* direct (negatief) kan beïnvloeden. De verschillen in drinkwaterkwaliteit leiden echter niet tot verschillen in groei of overleving van *Asellus* in dit water. De verschillende overleving van *Asellus* op sediment van verschillende samenstelling laat zien dat een indirecte invloed van waterkwaliteit, namelijk op de samenstelling en hoeveelheid sediment, belangrijker is. Sedimentkwantiteit en -kwaliteit zijn echter niet de enige factoren die een rol spelen in overleving. Mogelijk zijn er nog andere voedselbronnen relevant, bijvoorbeeld de biofilm op de buiswand, en/of spelen nog andere factoren een rol.

#### 4.4 Waterkwaliteit en associatie met *Aeromonas*

De *Aeromonas*-aantallen in de overlevingsexperimenten lijken vooral beïnvloed te worden door de aanwezigheid van dode of levende *Asellus*. Variabelen als herkomst water (KWR, Kralingen, Braakman), en wel of geen dosering van hemoflowconcentraat of sediment aan het experiment lijken een minder sterke en geen consequente invloed te hebben. De hoge *Aeromonas*-aantallen in het water met (levende) *Asellus* geeft aan dat *Aeromonas* geen negatief effect lijkt te hebben op de overleving van *Asellus*, mogelijk is er hier sprake van een symbiotische of neutrale relatie.

De *Aeromonas*-aantallen in en op *Asellus* variëren sterk, dit komt overeen met eerdere onderzoeken (5). In die studie zijn echter de *Aeromonas*-aantallen het hoogst op levende *Asellussen* die in kweek worden gehouden ( $1 \times 10^7 - 10^9$  kve/*Asellus*), iets lager op levende *Asellussen* direct geoogst uit het distributiegebied met spuiacties ( $1 \times 10^5 - 10^6$  kve/*Asellus*), en nog lager of afwezig op *Asellussen* die dood zijn als ze geoogst worden met spuiacties ( $0 - 10^5$  kve/*Asellus*). Dit patroon is omgekeerd aan wat in dit onderzoek is gemeten: hogere *Aeromonas*-aantallen in dode *Asellus* ( $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$  kve/*Asellus*) en lagere aantallen in levende *Asellussen* ( $1 \times 10^1 - 1 \times 10^6$  kve/*Asellus*). Een mogelijke verklaring voor dit omgekeerde patroon is dat de *Asellussen* in de overlevingsexperimenten in een andere omgeving verblijven dan in de eerdere studie: een kweekbak (veel sediment, *Asellus* en bladmateriaal, weinig verversing water, dode invertebraten worden niet verwijderd), het distributienet (sediment en *Asellus* aanwezig, continue doorstroming, dode invertebraten blijven lang aanwezig) vergeleken met het overlevingsexperiment (kleine ruimte, wekelijks vers water en voedsel, geen interactie met andere invertebraten). Dit kan allemaal zeer waarschijnlijk de aantallen *Aeromonas* in en op de *Asellus* beïnvloeden. De verschillen komen overeen met de groeicurven van *Aeromonas* in water in aanwezigheid van levende of dode *Asellussen*, waarbij hogere *Aeromonas*-aantallen worden gevonden bij aanwezigheid van een dode *Asellus* (4). Het lijkt daarom dat *Aeromonas* op zowel levende als dode *Asellussen* kan groeien, maar in het huidige onderzoek is dat sterker in aanwezigheid van dode *Asellus*.

## 5 Conclusie en aanbevelingen

### 5.1 Conclusies

Het gebruikte protocol levert duidelijk te interpreteren en reproduceerbare resultaten op voor de overlevingsexperimenten. Voor wat betreft de groei zijn de data echter minder eenduidig.

Indien er groei optreedt, vindt deze plaats in tussen dag 0 en 7 - 28, waarna de groei afvlakt of er geen groei meer plaats vindt.

De groeisnelheid is gecorreleerd aan de startlengte van de *Asellus*, een lagere startlengte geeft een hogere groeisnelheid. Het is daarom belangrijk om de experimenten te starten met relatief kleine *Asellus* (3 – 4 mm).

Overleving op drinkwater afkomstig van KWR, Kralingen en Braakman is gelijk. *Asellus* overleeft het langst op sediment uit het distributienet van Braakman en de overleving is vergelijkbaar voor de twee sediment monsters uit Braakman. Bladmateriaal geeft ook een langere overleving vergeleken met drinkwater. Hemoflowconcentraat van Kralingen en Braakman, uitgaand reinwater en Kralingen sediment uit het eerste experiment zorgen voor snellere afsterving van *Asellus* dan blad of Braakman sediment. De overleving op Kralingen sediment uit het tweede experiment en uitgegloeid filtermateriaal (zonder organische stof en microflora) is vergelijkbaar en langer dan op drinkwater.

In het distributienet kan sediment een geschikte voedselbron zijn voor langdurige overleving van *Asellus*. Drinkwater en geconcentreerd hoogmoleculair organisch materiaal zorgen niet voor langere *Asellus* overleving. Sedimentsamenstelling is echter niet de enige factor die een rol speelt bij overleving. Mogelijk zijn er nog andere voedselbronnen relevant, bijvoorbeeld de biofilm op de buiswand, en/of spelen andere factoren een rol. Een mogelijkheid is de leidingconfiguratie waarin meer of minder 'schuilplaatsen' voor *Asellus* aanwezig kunnen zijn waarin mogelijk een gunstig microklimaat heerst.

Overleving van *Asellus* is met de huidige gegevens niet duidelijk te relateren aan de chemische samenstelling van het hemoflowconcentraat of van het sediment.

*Aeromonas*-aantallen in het water van het overlevingsexperiment zijn hoger in aanwezigheid van een dode *Asellus* vergeleken met een levende *Asellus*. Ook zijn in en op dode *Asellussen* de *Aeromonas*-aantallen hoger dan in en op levende *Asellussen*. De voedselbron in het overlevingsexperiment (hemoflowconcentraat, drinkwater, sediment, blad) heeft geen duidelijke invloed op de *Aeromonas*-aantallen.

### 5.2 Aanbevelingen

Om bij toekomstige experimenten voldoende sediment beschikbaar te hebben voor chemische analyses, moet ruim voor de start van de experimenten sediment materiaal (of andere te testen voedselbronnen) worden verzameld en indien mogelijk geconserveerd, bijvoorbeeld door invriezen.

Om de groeisnelheid zo groot mogelijk te houden kan er het beste worden gewerkt met kleinere individuen en met een nauwe lengtefrequentieverdeling, bijv. tussen 3 en 4 mm.

Aanbevolen wordt om in vervollexperimenten rekening te houden met mogelijke uitputting van *Asellus* als deze zich niet ergens aan kan vast houden (b.v. sediment of bladmateriaal). Dit beïnvloedt de resultaten van het experiment en daarom moet worden geprobeerd om dit zoveel mogelijk te voorkomen.

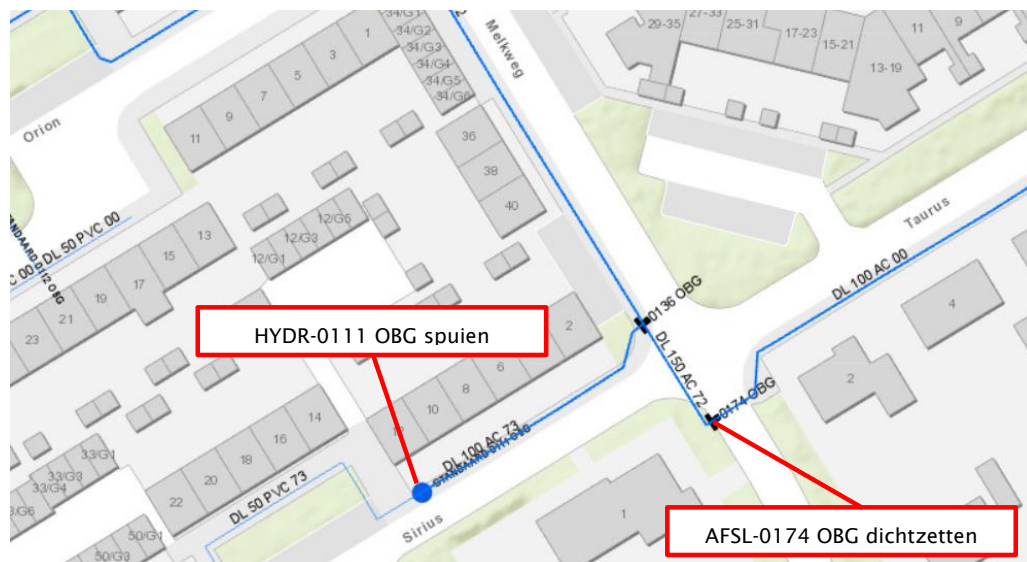
Biofilm op de buiswand is een andere mogelijke voedselbron voor *Asellus* in het distributienet. Het is onbekend of en hoe goed *Asellus* op biofilms uit verschillende distributienetten kan overleven. Dit kan in vervollexperimenten worden getest.

Aanvullende testen waarin systematisch de samenstelling van het sediment wordt gevarieerd en het effect hiervan op overleving van *Asellus* wordt getest, kunnen helpen bij de beantwoording van de vraag of en hoe de sediment kwaliteit mogelijk aangepast kan worden om de aanwezigheid van *Asellus* in het distributienet te beheersen.

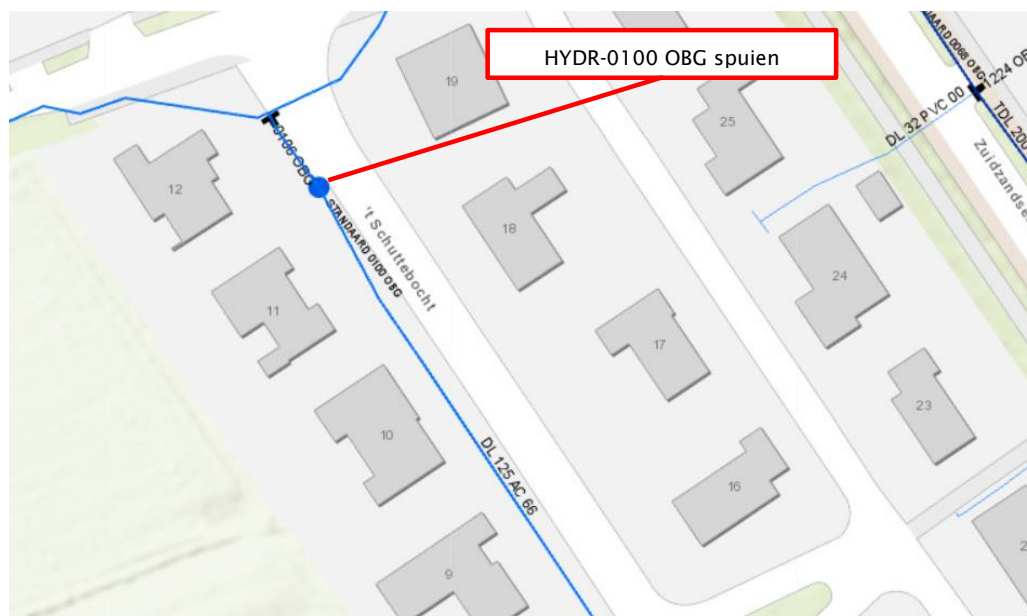
## 6 Referenties

1. Learbuch KLG, van Bel N. 2018. Temperatuurafhankelijke groei van *Aeromonas* in drinkwater. KWR, BTO 2018.097, Nieuwegein.
2. van Bel N, Wullings BA, Hijnen WAM. 2016. Isolatie en identificatie van *Aeromonas* stammen uit vijf DPWE voorzieningsgebieden en hun groeikarakteristieken. KWR, KWR 2016.073, Nieuwegein.
3. van Bel N, van der Wielen P, Wullings B, van Rijn J, van der Mark E, Ketelaars H, Hijnen W. 2020. *Aeromonas* species diversity and their potential for competitive planktonic growth in non-chlorinated drinking water distribution systems Applied Environmental Microbiology Submitted.
4. van Bel N. 2018. Groei van *Aeromonas* op sediment en ongewervelde dieren uit het distributienet van de productielocaties Kralingen, Braakman en Berenplaat van Evides. KWR, BTO 2018.037, Nieuwegein.
5. van Bel N, Hup K, Kolkman A, Brouwer AJ, Hijnen WAM. 2017. Verband tussen *Aeromonas* nagroei en de aanwezigheid van waterpissebedden. KWR, KWR 2017.021, Nieuwegein.
6. van Bel N, Verschoor AM. 2019. Literatuurstudie groei en overleving van waterpissebedden in het milieu, op water en sediment uit het distributiegebied. KWR, BTO 2018.105, Nieuwegein.
7. Kaplan EL, Meier P. 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. Journal of the American Statistical Association 53:457-481.
8. Cox DR. 1972. Regression Models and Life-Tables. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological) 34:187-220.
9. Martin TR, Holdich DM. 1986. The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to fresh-water asellids and gammarids). Water Research 20:1137-1147.
10. Elangovan R, Ballance S, White KN, McCrohan CR, Powell JJ. 1999. Accumulation of aluminium by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* in neutral water. Environmental Pollution 106:257-263.
11. Brown B. 1976. Observations on the tolerance of the isopod *Asellus aquaticus* Rac to copper and lead. Water Research 10:555-559.
12. Braginskiy L, Shcherban E. 1978. Acute toxicity of heavy metals to aquatic invertebrates at different temperatures. Hydrobiological journal 14:86-92.
13. Furmanska M. 1979. Studies of the effect of copper, zinc and iron on the biotic components of aquatic ecosystems. Polskie Archwm Hydrobiol 26:213-220.
14. Hasu T, Jokela J, Valtonen ET. 2008. Effects of growth factors and water source on laboratory cultures of a northern *Asellus aquaticus* (Isopoda) population. Aquatic Ecology 42:141-150.
15. Fraser J, Parkin D, Verspoor E. 1978. Tolerance to lead in the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. Water Research 12:637-641.
16. Voorbraak B. 1999. De groeisnelheid van *Asellus aquaticus* L. bij lage concentratie drinkwatersediment. Kiwa N.V., Nieuwegein.

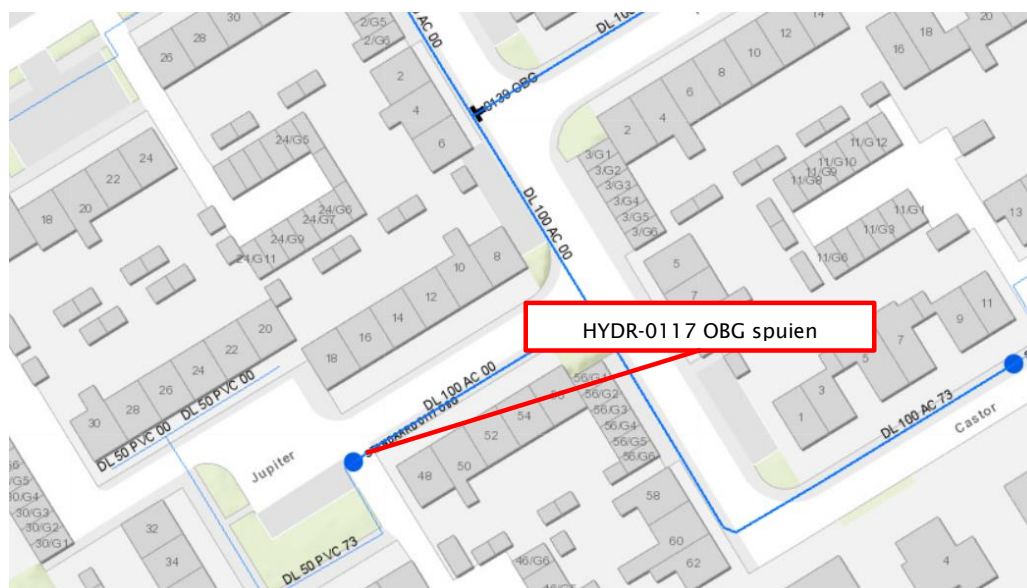
# I Spuiplannen van 13-14 februari 2019, Braakman (Oostburg)



Figuur 13. Afsluiter 0174 OBG dichtzetten, spuien op HYDR-0111 OBG



Figuur 14. Spuien op HYDR-0100 OBG



Figuur 15. Spuien op HYDR-0117 OBG

## II Bepaling benodigde steekproefgrootte

### II.I Overleving

Bij survivalanalyses wordt voor één factor (substraatgehalte of substraattype apart) de Kaplan –Meier test gebruikt. Als er meerdere factoren worden getest wordt de Cox proportional hazards test gebruikt. Aangemerkt dient te worden dat de duur van het experiment ook een te testen factor kan zijn. Voor toepassing van deze tests dient de verhouding in sterfterisico tussen verschillende behandelingen gelijk te zijn in de tijd; met andere woorden de overlevingscurves dienen elkaar niet of slechts beperkt te kruisen, maar de overleving kan in de ene behandeling wel hoger liggen dan bij de andere behandeling.

#### Benodigde steekproefgrootte voor vergelijken overleving

Voor de Cox proportional hazards test is de vuistregel dat er 10-20 gebeurtenissen (sterftes) nodig zijn per parameter die je wilt testen (i.e. substraatgehalte, substraattype). In eerdere overlevingsexperimenten met sediment werden na 4 weken 4 tot 5 sterftes geteld op 60 *Asellus* (16). Uitgaande van een gelijke sterftekans zou dat 10 sterftes op 150 *Asellus* zijn, wat net voldoende is voor het testen van één parameter. Een langere doorlooptijd, waarbij meer sterfte optreedt, is dan ook beter. Ook bij bovenstaand experiment werden duidelijke verschillen tussen groepen (substraatgehalte) pas na zo'n 10 weken zichtbaar (16). Een vervolgvraag is welke effectgrootte met een bepaalde steekproefgrootte aangetoond kan worden.

De minimaal benodigde steekproefgrootte is bepaald aan de hand van een online programma voor Poweranalyse (<http://powerandsamplesize.com/Calculators/>). Deze is berekend voor een tweezijdige Cox proportional hazards test, met een Power (Type II error,  $1-\beta$ , de nulhypothese onterecht niet verwerpen) van 0,8 en een significantie (Type I error, p-waarde, het onterecht verwerpen van de nulhypothese) van 0,05. Ter vergelijking zijn ook de minimaal benodigde steekproefgroottes bepaald voor de Kaplan-Meier test, aan de hand van een ander online programma voor Poweranalyse ([https://www.statstodo.com/SSizSurvival\\_Pgm.php](https://www.statstodo.com/SSizSurvival_Pgm.php)), waarbij dezelfde power en significantie zijn gebruikt.

In Tabel 9 staan de minimale steekproefgroottes weergegeven voor de twee genoemde testen bij goede overleving in de eerste groep (0,95 of 0,95). Hier is te zien dat de Cox Proportional Hazards test het meest gevoelig is voor grote verschillen in Hazard ratio. Dit betekent dat de kans op een gebeurtenis (in dit geval sterfte) in de ene groep een veelvoud is van die in de andere groep. Dit geldt ook voor de Kaplan-Meier test, alleen is deze test minder gevoelig. Wat bij beide tests opvalt, is dat er een redelijk grote steekproefomvang nodig zou zijn om een bepaald verschil te detecteren. Zo zijn bij bijvoorbeeld 10 dieren per groep de verschillen in overleving pas significant vanaf 50% verschil in overlevingskans (zie derde rij van onderen in Tabel 9). Dit pleit sterk voor een grotere groepsomvang, zeker omdat deze steekproefgroottes pas voorkomen nadat al sterfte heeft plaatsgevonden.

Tabel 9. Minimaal benodigde groepsgrootte om een significant verschil aan te tonen ( $\alpha = 0,05$ ,  $(1 - \theta) = 0,8$ ). In de eerste twee kolommen staan de overlevingspercentages per groep weergegeven, in de derde kolom het verschil in overleving, in de volgende twee kolommen (4,5) de hazard rate (sterftekans), en de verhouding hiertussen (hazard ratio). Vervolgens is voor de twee verschillende testen de minimale steekproefgrootte bepaald die nodig zou zijn om een verschil als significant aan te merken.

| Overlevingskans    |                    |          | sterftekans      |                  |                        | steekproefgrootte<br>benodigd voor Cox<br>proportional hazards test |        |        | steekproefgrootte<br>benodigd voor Kaplan-<br>Meier survival test |        |        |
|--------------------|--------------------|----------|------------------|------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------|--------|-------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| Survival<br>Groep1 | Survival<br>Groep2 | verschil | Hazard<br>Groep1 | Hazard<br>Groep2 | Hazard<br>ratio (=1/2) | Totaal                                                              | Groep1 | Groep2 | Totaal                                                            | Groep1 | Groep2 |
| 0,95               | 0,9                | 5%       | 0,050            | 0,100            | 0,500                  | 871                                                                 | 447    | 424    | 889                                                               | 458    | 432    |
| 0,95               | 0,85               | 10%      | 0,050            | 0,150            | 0,333                  | 261                                                                 | 138    | 123    | 300                                                               | 158    | 142    |
| 0,95               | 0,75               | 20%      | 0,050            | 0,250            | 0,200                  | 82                                                                  | 46     | 36     | 119                                                               | 67     | 53     |
| 0,95               | 0,65               | 30%      | 0,050            | 0,350            | 0,143                  | 43                                                                  | 26     | 17     | 76                                                                | 45     | 31     |
| 0,95               | 0,55               | 40%      | 0,050            | 0,450            | 0,111                  | 28                                                                  | 18     | 10     | 59                                                                | 38     | 22     |
| 0,95               | 0,45               | 50%      | 0,050            | 0,550            | 0,091                  | 21                                                                  | 14     | 7      | 52                                                                | 36     | 17     |
| 0,95               | 0,35               | 60%      | 0,050            | 0,650            | 0,077                  | 18                                                                  | 13     | 5      | 50                                                                | 37     | 14     |
| 0,95               | 0,25               | 70%      | 0,050            | 0,750            | 0,067                  | 17                                                                  | 13     | 4      | 55                                                                | 43     | 12     |
| 0,95               | 0,15               | 80%      | 0,050            | 0,850            | 0,059                  | 19                                                                  | 16     | 3      | 72                                                                | 62     | 10     |
| 0,900              | 0,800              | 10%      | 0,100            | 0,200            | 0,500                  | 437                                                                 | 231    | 206    | 419                                                               | 222    | 197    |
| 0,900              | 0,700              | 20%      | 0,100            | 0,300            | 0,333                  | 132                                                                 | 74     | 58     | 145                                                               | 82     | 64     |
| 0,900              | 0,600              | 30%      | 0,100            | 0,400            | 0,250                  | 68                                                                  | 41     | 27     | 87                                                                | 52     | 35     |
| 0,900              | 0,500              | 40%      | 0,100            | 0,500            | 0,200                  | 44                                                                  | 28     | 16     | 65                                                                | 42     | 24     |
| 0,900              | 0,400              | 50%      | 0,100            | 0,600            | 0,167                  | 33                                                                  | 23     | 10     | 56                                                                | 39     | 18     |
| 0,900              | 0,300              | 60%      | 0,100            | 0,700            | 0,143                  | 28                                                                  | 21     | 7      | 55                                                                | 41     | 14     |
| 0,900              | 0,200              | 70%      | 0,100            | 0,800            | 0,125                  | 28                                                                  | 23     | 5      | 62                                                                | 51     | 12     |

In Tabel 10 staan de minimaal benodigde steekproefgroottes weergegeven bij lagere gemiddelde overlevingskansen (grotere sterftekans). In de bovenste helft van de tabel is een gemiddelde overleving van 0,5 (van groep 1 en 2) gebruikt, in de onderste helft is de overleving in groep 2 constant slecht (0,05) en varieert de overleving in groep 1. Hier is te zien dat de minimale steekproefgroottes benodigd om een bepaald significant verschil aan te tonen alleen maar toenemen naarmate de overlevingskans lager is (Tabel 10).

Tabel 10. Minimaal benodigde groepsgrootte om een significant verschil aan te tonen ( $\alpha = 0,05$ ,  $(1 - \beta) = 0,8$ ). In de eerste twee kolommen staan de overlevingspercentages per groep weergegeven, in de derde kolom het verschil in overleving, in de volgende twee kolommen (4,5) de hazard rate (sterftekans), en de verhouding hiertussen (hazard ratio). Vervolgens is voor de twee verschillende testen de minimale steekproefgrootte bepaald die nodig zou zijn om een verschil als significant aan te merken.

| Overlevingskans    |                    |          | sterftekans      |                  |                           | steekproefgrootte<br>benodigd voor Cox<br>proportional hazards test |        |        | steekproefgrootte<br>benodigd voor Kaplan-<br>Meier survival test |        |        |
|--------------------|--------------------|----------|------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------|--------|-------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| Survival<br>Groep1 | Survival<br>Groep2 | verschil | Hazard<br>Groep1 | Hazard<br>Groep2 | Hazard<br>ratio<br>(=1/2) | Totaal                                                              | Groep1 | Groep2 | Totaal                                                            | Groep1 | Groep2 |
| 0,550              | 0,450              | 10%      | 0,450            | 0,550            | 0,818                     | 1569                                                                | 863    | 706    | 3046                                                              | 1603   | 1444   |
| 0,600              | 0,400              | 20%      | 0,400            | 0,600            | 0,667                     | 399                                                                 | 239    | 160    | 782                                                               | 430    | 353    |
| 0,650              | 0,350              | 30%      | 0,350            | 0,650            | 0,538                     | 180                                                                 | 117    | 63     | 218                                                               | 131    | 88     |
| 0,700              | 0,300              | 40%      | 0,300            | 0,700            | 0,429                     | 105                                                                 | 74     | 32     | 115                                                               | 75     | 41     |
| 0,750              | 0,250              | 50%      | 0,250            | 0,750            | 0,333                     | 70                                                                  | 53     | 18     | 81                                                                | 57     | 25     |
| 0,780              | 0,220              | 56%      | 0,220            | 0,780            | 0,282                     | 57                                                                  | 44     | 13     | 69                                                                | 52     | 18     |
| 0,800              | 0,200              | 60%      | 0,200            | 0,800            | 0,250                     | 51                                                                  | 41     | 10     | 67                                                                | 52     | 15     |
| 0,900              | 0,100              | 80%      | 0,100            | 0,900            | 0,111                     | 37                                                                  | 33     | 4      | 67                                                                | 54     | 14     |
| 0,150              | 0,050              | 10%      | 0,850            | 0,950            | 0,895                     | 3772                                                                | 2829   | 943    | 278                                                               | 209    | 70     |
| 0,250              | 0,050              | 20%      | 0,750            | 0,950            | 0,789                     | 1163                                                                | 969    | 194    | 178                                                               | 148    | 30     |
| 0,350              | 0,050              | 30%      | 0,650            | 0,950            | 0,684                     | 621                                                                 | 543    | 78     | 158                                                               | 138    | 20     |
| 0,450              | 0,050              | 40%      | 0,550            | 0,950            | 0,579                     | 389                                                                 | 350    | 39     | 153                                                               | 138    | 16     |
| 0,550              | 0,050              | 50%      | 0,450            | 0,950            | 0,474                     | 264                                                                 | 242    | 22     | 154                                                               | 141    | 13     |
| 0,650              | 0,050              | 60%      | 0,350            | 0,950            | 0,368                     | 174                                                                 | 162    | 12     | 157                                                               | 146    | 12     |
| 0,750              | 0,050              | 70%      | 0,250            | 0,950            | 0,263                     | 125                                                                 | 117    | 8      | 162                                                               | 151    | 11     |
| 0,850              | 0,050              | 80%      | 0,150            | 0,950            | 0,158                     | 80                                                                  | 76     | 4      | 166                                                               | 157    | 10     |

De resultaten van Tabel 10 zouden kunnen suggereren dat het beter zou zijn om de test zo kort mogelijk te laten lopen, zodat er zo min mogelijk sterfte optreedt en de overlevingskans dus hoog is. Dit is –zoals eerder besproken– echter niet helemaal het geval, omdat er ook een redelijk aantal sterftes dient op te treden voordat deze meetbaar zijn. Bij een korte tijdsduur is er grote kans dat er nog te weinig sterftegevallen zijn voorkomen. Bovendien zijn andere relevante parameters, zoals groei, veel minder goed te volgen in een beperkte tijd. Ook hierop zou een gevoeligheidsanalyse uitgevoerd kunnen worden.

## Conclusies

Samenvattend is ervoor gekozen om de duur van het experiment 16 weken te maken, zodat op het eind naar verwachting ongeveer de helft van de *Asellussen* zal zijn overleden. Daarnaast is de groepsgrootte zo groot mogelijk gemaakt (54 *Asellussen* per conditie). Dit kan bijvoorbeeld door maar enkele factoren tegelijk te testen: bijvoorbeeld door alleen substraattypen, bij één substraathoeveelheid, te testen.

Door de metingen op een logaritmische tijdschaal uit te voeren, kan het aantal metingen verminderd worden, bijvoorbeeld 0, 1, 2, 4 dagen, 1, 2, 4, 8, 16 weken. Door vaker in de eerste week te meten, kan een snel overlijden van de dieren gemonitord worden. In het experiment is wekelijks de overleving bepaald aangezien de *Asellussen* elke week worden overgezet naar een nieuwe 6-wells plaat (paragraaf 2.1.6). Dit is vaker dan bovenstaande logaritmische tijdschaal.

## II.II Groei

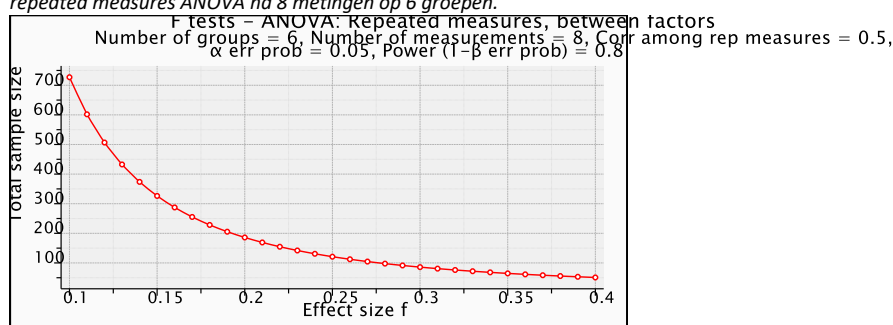
Voor de groeiexperimenten wordt een variantieanalyse (1- of 2-weg [repeated measures] ANOVA) toegepast. Voordat deze statistische analyse toegepast kan worden, moeten enkele aannames gecontroleerd worden: normaal verdeelde waardes en homogene variantie (sphericity test). Indien er sprake is van grote sterfte kan overwogen worden om een mixed model toe te passen, omdat er anders misschien teveel waarnemingen wegvallen.

### Benodigde steekproefgrootte voor vergelijken lengtegroei

Vanuit de eerdere overwegingen (II.1) is ook gekeken naar de minimale benodigde steekproefgrootte om verschillen in lengte en groei te kunnen meten. Hiervoor is gebruik gemaakt van het programma G\*Power (<http://www.gpower.hhu.de/>).

Het eerste scenario dat hiermee onderzocht is, is het testen van lengtemetingen op 8 achtereenvolgende tijdstippen en 6 behandelingen met repeated measures ANOVA. In de poweranalyse is gekeken naar de minimaal benodigde steekproefgrootte bij verschillende effectgroottes. De effectgrootte beschrijft de grootte van het te onderzoeken verschil ten opzichte van de variantie. Als het verschil tussen de gemiddelden van de groepen groter is, of bij een kleinere standaarddeviatie (variant), is de effectgrootte groter. Voor deze experimenten is gekozen voor de volgende classificatie van de effectgrootte: klein effect (0,1), middelgroot effect (0,2) en groot effect (0,4). In Figuur 16 is te zien wat de totale steekproefomvang zou moeten zijn als functie van de effectgrootte, bij 6 behandelingen en een ingestelde  $\alpha=0,05$  en  $\beta=0,8$ . Voor een effectgrootte van 0,2 zou hier een totale steekproefgrootte van 192 benodigd zijn, dus 32 metingen per groep. Bij grotere effecten zijn minder metingen nodig: bij een effectgrootte van 0,4 zijn in totaal 54 nodig, dus 9 per groep.

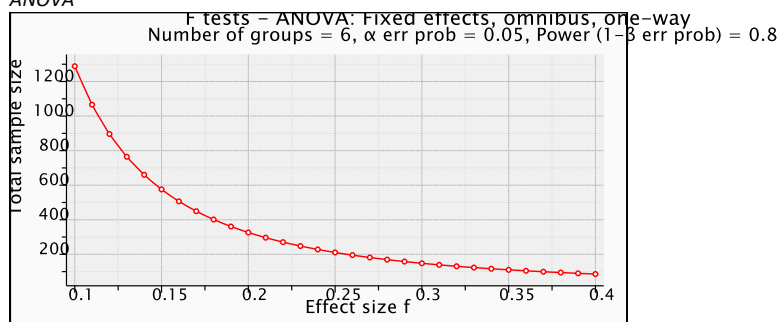
Figuur 16. Berekende minimale steekproefomvang als functie van effectgrootte (bereik 0,1-0,4) om een significant verschil aan te tonen met repeated measures ANOVA na 8 metingen op 6 groepen.



Berekening van de verwachte effectgrootte bij een groot verschil in de groeigegevens, zoals gerapporteerd door (16), geeft een effectgrootte van 0,57-0,58 voor de gemiddelde lengte na 8-16 weken. Om de significantie van een dergelijk effect te kunnen detecteren lijkt een aantal van 9 *Asellus* per groep dus voldoende.

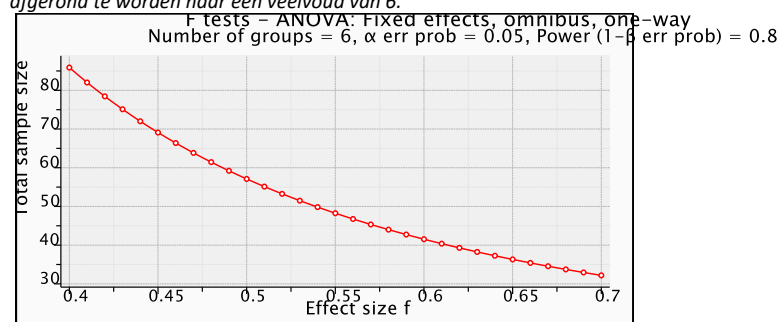
Voor de groeisnelheid wordt maar één getal over de hele periode vergeleken tussen de verschillende groepen. Hiervoor volstaat een 'gewone' eenweg-ANOVA. Omdat er minder getallen vergeleken worden neemt de benodigde steekproefomvang toe om een bepaalde effectgrootte aan te tonen (Figuur 17). Voor een effectgrootte van 0,2 is hier een totale steekproefomvang van 330 nodig (55 per groep), en voor een groot effect 90 dieren (15 per groep).

Figuur 17. Minimale steekproefomvang als functie van effectgrootte (bereik 0,1-0,4) om een significant verschil aan te tonen met eenweg-ANOVA



Uit (16) zijn voor dezelfde lengtedata ook groeisnelheden berekend, hieruit volgt een verwachte effectgrootte van 0,51-0,64 bij grotere verschillen in groeisnelheid, wat overeenkomt met een minimale steekproefgrootte van 60 (10 per groep) - 42 (7 per groep). In Figuur 18 staat de minimale steekproefgrootte weergegeven voor grote verschillen (effectgrootte 0,4 – 0,7).

Figuur 18. Minimale steekproefomvang als functie van effectgrootte (bereik 0,4 - 0,7) om een significant verschil aan te tonen met eenweg-ANOVA. Let op dat bij 6 groepen de daadwerkelijke minimale steekproefgrootte door 6 deelbaar dient te zijn, dus vaak dient naar boven afgerond te worden naar een veelvoud van 6.



### Conclusies/aanbevelingen

Voor het meten van verschillen in lengte en groei zijn tamelijk grote groepen nodig om bij een redelijke effectgrootte een significant verschil te vinden. Voor lengte in de tijd zouden 9 dieren per groep nog acceptabel zijn; voor vergelijking van de groeisnelheid zijn echter 15 dieren per groep nodig om nog een behoorlijk groot verschil aan te kunnen tonen.

Omdat de minimaal benodigde aantallen voor het aantonen van een significant verschil in sterftekans veel hoger zijn, lijkt het aantonen van groeiverschillen wat minder lastig. Wanneer bijvoorbeeld 30 dieren per groep aanwezig zijn dan kan voor lengtegroei al een significant verschil aangetoond worden bij een effectgrootte van 0,2; bij 50 dieren per groep bij een effectgrootte van 0,16 ( $6 \times 30 = 180$  *Asellus*,  $6 \times 50 = 300$  *Asellus*). Voor groei zou bij 30 dieren per groep een significant verschil aangetoond kunnen worden bij een effectgrootte van 0,27, en voor 50 dieren per groep bij een effectgrootte van 0,21 (Figuur 17). Hiervoor geldt natuurlijk wel dat er nog een aanzienlijk deel van de populatie in leven dient te zijn op het moment van bemonsteren en meten. Gezien bovenstaande argumenten is gekozen om met 54 *Asellussen* per conditie te starten, zodat zelf als bijna de helft overlijdt er waarschijnlijk nog een significant verschil kan worden aangetoond.

Als gekozen wordt voor alleen meten van groei (een meting bij de start en meting na een vaste groeiperiode), is het verstandig om de lengtemetingen niet te laat te doen vanwege kans op sterfte, maar de periode moet wel lang genoeg zijn om verschillen in lengtegroei te kunnen laten plaatsvinden. Dit lijkt op basis van (16) tussen 4 en 8 weken het geval te zijn.

### III Resultaten chemische analyses van drinkwater, hemoflowconcentraat en sediment

Tabel 11. Resultaten van alle uitgevoerde chemische analyses op water, sediment en HF-concentraat. Het bladmateriaal is niet geanalyseerd en daarom niet weergegeven in deze tabel. PHMOC: particulate high molecular organic carbon, PHMPC: particulate high molecular protein carbon, PHMCHC: particulate high molecular carbohydrate carbon. \*: Berekende concentraties, # berekende concentratie is gebaseerd op alleen de resultaten van de ICP-MS of de XRF-analyse en daardoor niet volledig, <sup>s</sup> indicatieve waarde door te veel bijgroei van bacteriestam p17. Alle gemeten concentraties (water, hemoflowconcentraat en sediment) staan vermeld in Tabel 11.

|                                |              | Water_BRA  | Water_KRL  | Water_KWR   | HF_BRA | HF_KRL | Sed_BRA | Sed_BRA | Sed_KRL | Sed_KRL |
|--------------------------------|--------------|------------|------------|-------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
|                                |              | _2019      | _2019      | _2020       | _2020  | _2020  | _2019   | _2020   | _2019   | _2020   |
| <b>Aqualab Zuid</b>            |              |            |            |             |        |        |         |         |         |         |
| N-totaal                       | mg/l N       | 2,2        | 2,1        |             | 6,6    | 7,4    |         |         |         |         |
| Ammonium                       | mg/l NH4     |            |            | <0.03       | 0,059  | 0,07   |         |         |         |         |
| Nitraat                        | mg/l NO3     | 7,5        | 7,6        | <1.0        | 7,5    | 9,5    |         |         |         |         |
| Nitriet                        | mg/l NO2     | <0.01      | <0.01      | <0.01       | <0.01  | <0.01  |         |         |         |         |
| P-totaal                       | mg/l P       | <0.1       | <0.1       |             | 0,22   | 0,21   |         |         |         |         |
| Stikstof, Kjeldahl             | mg/l N       | 0,55       | 0,38       |             | 4,9    | 5,2    |         |         |         |         |
| Fosfaat-ortho                  | mg/l PO4     | <0.3       | <0.3       | 0,05        |        |        |         |         |         |         |
| <b>KWR</b>                     |              |            |            |             |        |        |         |         |         |         |
| PHMOC                          | mg C/l       |            |            |             | 32     | 31     |         |         |         |         |
| PHMPC                          | mg C/l       |            |            |             | 2,3    | 2,1    |         |         |         |         |
| PHMCHC                         | mg C/l       |            |            |             | 14     | 16,4   |         |         |         |         |
| AOC-A3                         | µg biop.-C/l | 4,6 ± 0,13 | 5,7 ± 0,33 | 0,24 ± 0,29 | 4275   | 2575   |         |         |         |         |
| <b>LC-OCD</b>                  |              |            |            |             |        |        |         |         |         |         |
| DOC                            | mg C/l       | 2189       | 2264       | 1769        | 27205  | 28932  |         |         |         |         |
| CDOC                           | mg C/l       | 2008       | 2146       | 1563        | 27205  | 28932  |         |         |         |         |
| Biopolymers                    | mg C/l       | 83         | 106        | <1          | 21751  | 21241  |         |         |         |         |
| HS                             | mg C/l       | 1049       | 1158       | 1122        | <5     | <5     |         |         |         |         |
| BB                             | mg C/l       | 552        | 527        | 262         | 3849   | 5216   |         |         |         |         |
| LMW Acids                      | mg C/l       | 16         | 31         | <1          | 105    | 147    |         |         |         |         |
| LMW Neutrals                   | mg C/l       | 308        | 325        | 179         | 1500   | 2327   |         |         |         |         |
| NO <sub>3</sub>                | mg C/l       | 1704       | 1841       | 161         | 1535   | 1918   |         |         |         |         |
| NH <sub>4</sub>                | mg C/l       | <1         | <1         | <1          | 35     | <5     |         |         |         |         |
| <b>XRF</b>                     |              |            |            |             |        |        |         |         |         |         |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | mg/gram      |            |            |             |        |        | 15,8    | 15,4    | 9,1     | 14,1    |
| BaO                            | mg/gram      |            |            |             |        |        | 0,6     | 0,6     | 0,5     | 0,4     |
| C                              | mg/gram      |            |            |             |        |        | 195     | 171     | 310     | 84,3    |
| CaO                            | mg/gram      |            |            |             |        |        | 167,2   | 211,6   | 60,5    | 47,8    |
| CoO                            | mg/gram      |            |            |             |        |        | 0,4     | 0,4     | 0,2     | 0,3     |
| Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | mg/gram      |            |            |             |        |        | 0,2     | 0,2     | <0.2    | 0,4     |
| CuO                            | mg/gram      |            |            |             |        |        | 0,4     | 0,6     | 0,4     | 1,6     |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | mg/gram      |            |            |             |        |        | 208     | 161,1   | 348,2   | 479,3   |

|                                |         |       |       |       |       |       |      |       |      |      |
|--------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|
| K <sub>2</sub> O               | mg/gram |       |       |       |       |       | 2    | 2     | 1,1  | 2,8  |
| MgO                            | mg/gram |       |       |       |       |       | 4    | 3,8   | 4,6  | 7,4  |
| Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | mg/gram |       |       |       |       |       | 7,6  | 5,8   | 4,6  | 3,4  |
| MoO <sub>3</sub>               | mg/gram |       |       |       |       |       | <0.2 | 0,2   | 0,2  | <0.2 |
| N                              | mg/gram |       |       |       |       |       | 19,6 | 16,6  | 10,1 | 8,3  |
| Na <sub>2</sub> O              | mg/gram |       |       |       |       |       | 3    | 3,5   | 2,2  | 2,7  |
| Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | mg/gram |       |       |       |       |       | <0.2 | <0.2  | <0.2 | <0.2 |
| NiO                            | mg/gram |       |       |       |       |       | 0,6  | 0,4   | 0,4  | 0,4  |
| P                              | mg/gram |       |       |       |       |       | 4    | 3,2   | 1,6  | 1,3  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  | mg/gram |       |       |       |       |       | 9,2  | 7,4   | 3,6  | 3    |
| PbO                            | mg/gram |       |       |       |       |       | 0,3  | 0,3   | 0,4  | 0,3  |
| SO <sub>3</sub>                | mg/gram |       |       |       |       |       | 15,4 | 13,5  | 9,4  | 9,6  |
| SiO <sub>2</sub>               | mg/gram |       |       |       |       |       | 87,6 | 118,4 | 72,6 | 199  |
| SnO <sub>2</sub>               | mg/gram |       |       |       |       |       | <0.2 | <0.2  | <0.2 | 0,5  |
| SrO                            | mg/gram |       |       |       |       |       | 0,2  | 0,2   | 0,2  | 0,2  |
| Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | mg/gram |       |       |       |       |       | <0.2 | 0,2   | 0,2  | 0,2  |
| TiO <sub>2</sub>               | mg/gram |       |       |       |       |       | 0,8  | 0,8   | 0,7  | 1,2  |
| V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  | mg/gram |       |       |       |       |       | 0,3  | 0,4   | <0.2 | <0.2 |
| WO <sub>3</sub>                | mg/gram |       |       |       |       |       | 0,2  | 0,3   | 0,3  | 0,3  |
| ZnO                            | mg/gram |       |       |       |       |       | 1,1  | 1,2   | 1,2  | 1,6  |
| ZrO <sub>2</sub>               | mg/gram |       |       |       |       |       | <0.2 | <0.2  | <0.2 | 0,2  |
| <b>ICP-MS</b>                  |         |       |       |       |       |       |      |       |      |      |
| Aluminium                      | µg/l    | 4,6   | 1,6   | 5,6   | 50    | 19    |      |       |      |      |
| Antimoon                       | µg/l    | 0,38  | 0,36  | 0,03  | 0,36  | 0,38  |      |       |      |      |
| Arseen                         | µg/l    | <0.50 | <0.50 | <0.50 | <0.50 | <0.50 |      |       |      |      |
| Barium                         | µg/l    | 25    | 24    | 15    | 30    | 26    |      |       |      |      |
| Beryllium                      | µg/l    | 0,01  | <0.01 | 0,03  | <0.01 | 0,02  |      |       |      |      |
| Bismut                         | µg/l    | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |      |       |      |      |
| Boor                           | µg/l    | 58    | 58    | 27    | 72    | 69    |      |       |      |      |
| Cadmium                        | µg/l    | 0,02  | 0,02  | 0,04  | 0,07  | 0,04  |      |       |      |      |
| Calcium                        | µg/l    | 4375  | 4325  | 44300 | 55035 | 52720 |      |       |      |      |
| Cerium                         | µg/l    | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,11  | 0,04  |      |       |      |      |
| Cesium                         | µg/l    | 0,06  | 0,06  | 0,02  | 0,06  | 0,06  |      |       |      |      |
| Chroom                         | µg/l    | 0,51  | <0.50 | <0.50 | 3,8   | 4,2   |      |       |      |      |
| Dysprosium                     | µg/l    | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,01  | 0,01  |      |       |      |      |
| Erbium                         | µg/l    | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,01  | 0,01  |      |       |      |      |
| Europium                       | µg/l    | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  |      |       |      |      |
| Gadolinium                     | µg/l    | 0,04  | 0,04  | 0,01  | 0,04  | 0,05  |      |       |      |      |
| Gallium                        | µg/l    | 0,01  | 0,02  | 0,01  | 0,11  | 0,03  |      |       |      |      |
| Germanium                      | µg/l    | <0.01 | 0,01  | 0,02  | <0.01 | 0,02  |      |       |      |      |
| Hafnium                        | µg/l    | 0,02  | <0.02 | 0,04  | <0.02 | <0.02 |      |       |      |      |
| Holmium                        | µg/l    | 0,01  | <0.01 | 0,02  | <0.01 | 0,01  |      |       |      |      |
| IJzer                          | µg/l    | <10   | <10   | 13    | 29    | 110   |      |       |      |      |

|              |      |       |       |       |       |       |
|--------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Indium       | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,02  | <0.01 | 0,01  |
| Iridium      | µg/l | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| Kalium       | µg/l | 8315  | 8435  | 1170  | 8070  | 7820  |
| Kobalt       | µg/l | 0,24  | 0,24  | 0,04  | 0,28  | 0,29  |
| Koper        | µg/l | 0,63  | 0,78  | <0.50 | 8,9   | 3,6   |
| Lanthanium   | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,08  | 0,05  |
| Lithium      | µg/l | 8,6   | 8,9   | 3,2   | 8,7   | 8,4   |
| Lood         | µg/l | 0,01  | 0,02  | 0,2   | 0,66  | 0,61  |
| Lutenium     | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,04  | <0.01 | 0,01  |
| Magnesium    | µg/l | 7680  | 8065  | 6025  | 8075  | 7795  |
| Mangaan      | µg/l | 0,06  | 0,06  | 0,35  | 1,3   | 0,58  |
| Molybdeen    | µg/l | 2,2   | 2     | 0,1   | 2     | 1,9   |
| Natrium      | µg/l | 49030 | 53470 | 12900 | 41005 | 44105 |
| Neodymium    | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,01  | 0,04  | 0,03  |
| Nikkel       | µg/l | 3,4   | 3,4   | <0.10 | 4,3   | 3,7   |
| Niobium      | µg/l | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| Osmium       | µg/l | 0,01  | 0,01  | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| Palladium    | µg/l | 0,22  | 0,2   | 0,14  | 0,12  | 0,13  |
| Platina      | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,01  | <0.01 | <0.01 |
| Praseodymium | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,01  | 0,01  | 0,01  |
| Renium       | µg/l | 0,02  | 0,02  | 0,04  | 0,01  | 0,03  |
| Rubidium     | µg/l | 7,2   | 7,2   | 0,55  | 6,8   | 6,7   |
| Ruthenium    | µg/l | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| Samarium     | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,01  | 0,01  | 0,01  |
| Scandium     | µg/l | <1.0  | <1.0  | <1.0  | <1.0  | <1.0  |
| Seleen       | µg/l | <0.50 | <0.50 | <0.50 | 0,67  | 0,59  |
| Strontium    | µg/l | 180   | 170   | 155   | 180   | 170   |
| Tantalium    | µg/l | <0.02 | <0.02 | 0,05  | <0.02 | <0.02 |
| Telluur      | µg/l | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| Terbium      | µg/l | 0,01  | <0.01 | 0,01  | <0.01 | 0,01  |
| Thallium     | µg/l | 0,01  | 0,01  | 0,06  | 0,02  | 0,03  |
| Thorium      | µg/l | <0.10 | <0.10 | <0.10 | <0.10 | <0.10 |
| Thulium      | µg/l | <0.01 | <0.01 | 0,03  | <0.01 | 0,01  |
| Tin          | µg/l | <0.05 | <0.05 | <0.05 | 0,62  | 1,7   |
| Titanium     | µg/l | <0.50 | <0.50 | <0.50 | 1,1   | 2,1   |
| Uranium      | µg/l | 0,04  | 0,4   | 0,06  | 0,03  | 0,45  |
| Vanadium     | µg/l | 0,19  | <0.05 | 0,16  | 0,5   | 0,12  |
| Wolfraam     | µg/l | 0,13  | 0,03  | 0,13  | 0,11  | 0,05  |
| Ytterbium    | µg/l | <0.01 | 0,01  | 0,04  | 0,01  | 0,01  |
| Yttrium      | µg/l | 0,02  | 0,02  | 0,03  | 0,08  | 0,05  |
| Zilver       | µg/l | <0.02 | <0.02 | <0.02 | <0.02 | 0,06  |
| Zink         | µg/l | 1,1   | 1,6   | 1,1   | 7,9   | 6,9   |
| Zirkonium    | µg/l | <0.05 | <0.05 | 0,11  | 0,1   | 0,13  |

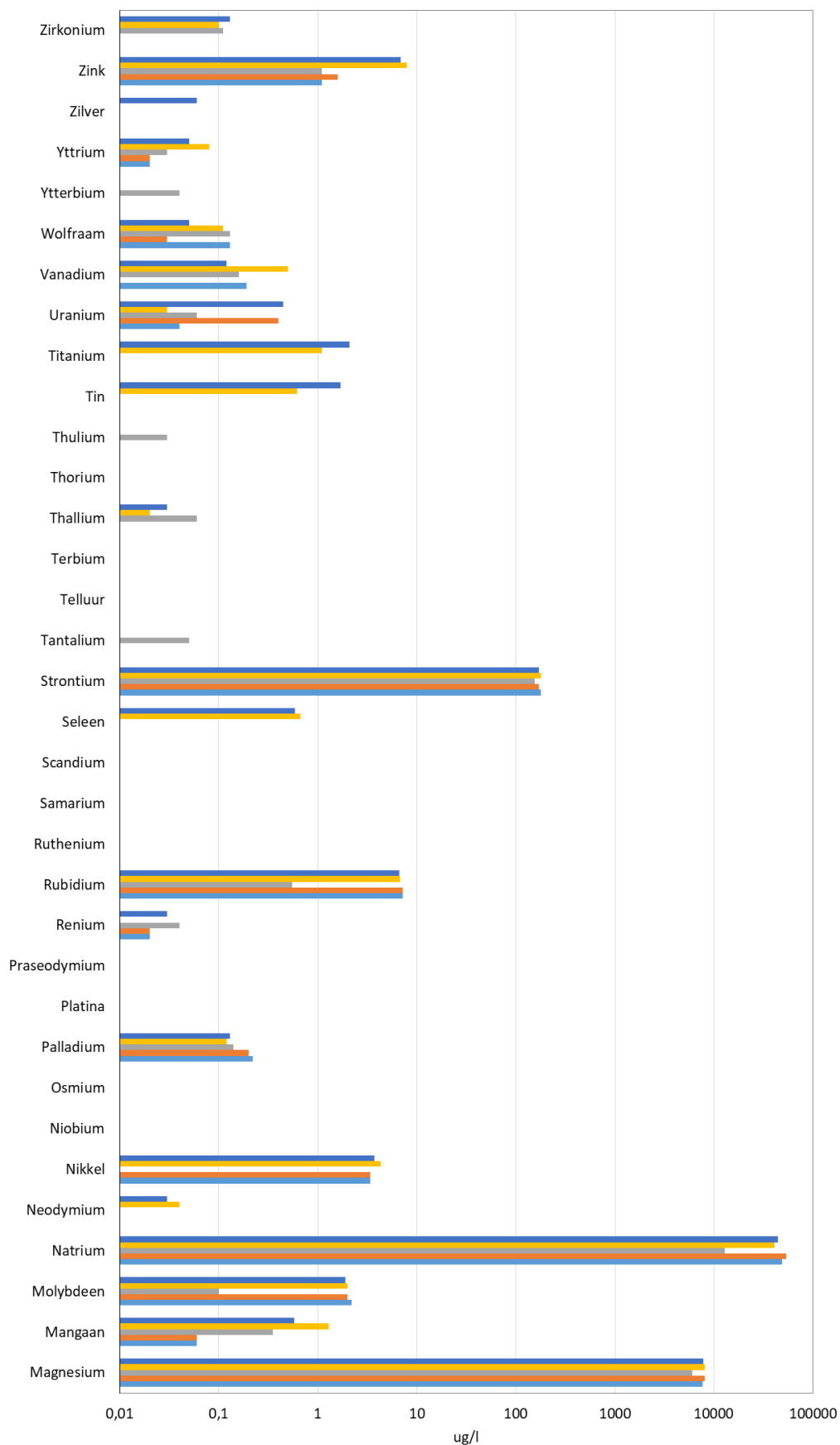
Tabel 12. Chemische samenstelling van de verschillende condities in het overlevingsexperiment: water, water met hemoflowconcentraat en water met sediment (een samenvattende tabel is weergegeven in Tabel 5). Het bladmateriaal is niet geanalyseerd en daarom niet weergegeven in deze tabel. PHMOC: particulate high molecular organic carbon, PHMPC: particulate high molecular protein carbon, PHMCHC: particulate high molecular carbohydrate carbon. \* Gemeten concentraties, <sup>§</sup>: berekende concentraties, <sup>#</sup> berekende concentratie is gebaseerd op alleen de resultaten van de ICP-MS of de XRF-analyse en daardoor niet volledig, <sup>§</sup> indicatieve waarde door te veel bijgroei van bacteriestam p17. Alle gemeten concentraties (water, hemoflowconcentraat en sediment) staan vermeld in Tabel 11.

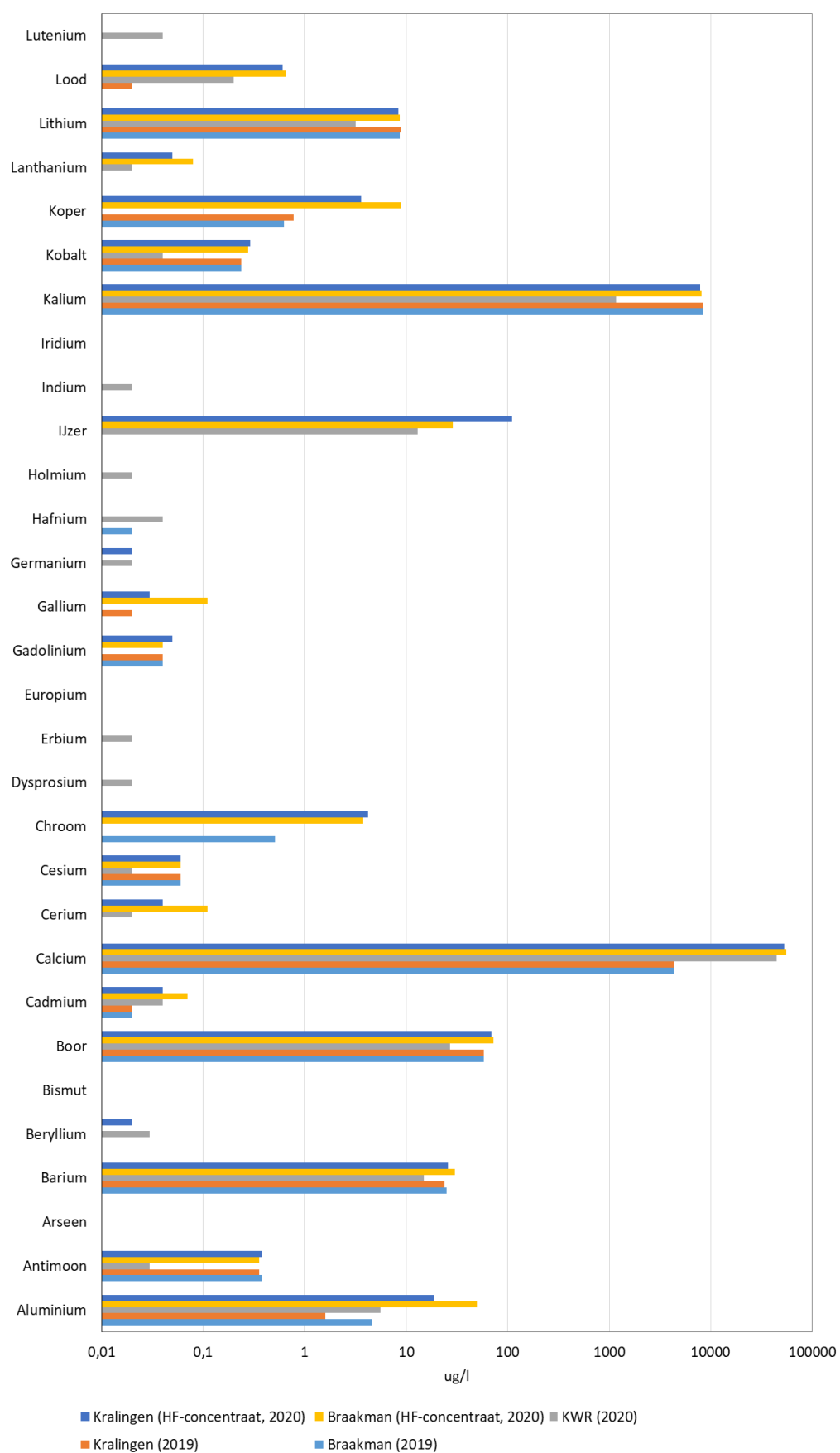
|                                            |              | Analyse | Water_<br>BRA_19* | Water_<br>KRL_19* | Water_<br>KWR_20* | Water+HF<br>_BRA_20 <sup>§</sup> | Water+HF<br>_KRL_20 <sup>§</sup> | Water+Sed<br>BRA_19 <sup>§</sup> | Water+Sed<br>_BRA_20 <sup>§</sup> | Water+Sed<br>_KRL_19 <sup>§</sup> | Water+Sed<br>_KRL_20 <sup>§</sup> |
|--------------------------------------------|--------------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| N-totaal                                   | mg/l N       | AQZ     | 2,2               | 2,1               |                   |                                  |                                  |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Ammonium                                   | mg/l NH4     | AQZ     |                   |                   | <0.03             | <0,03                            | <0,03                            |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Nitraat                                    | mg/l NO3     | AQZ     | 7,5               | 7,6               | <1.0              | <1,0                             | <1,0                             |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Nitriet                                    | mg/l NO2     | AQZ     | <0.01             | <0.01             | <0.01             | 0,01                             | 0,01                             |                                  |                                   |                                   |                                   |
| P-totaal                                   | mg/l P       | AQZ     | <0.1              | <0.1              |                   |                                  |                                  |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Stikstof                                   | mg/l N       | AQZ     | 0,55              | 0,38              |                   |                                  |                                  |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Fosfaat-ortho                              | mg/l PO4     | AQZ     | <0.3              | <0.3              | 0,05              |                                  |                                  |                                  |                                   |                                   |                                   |
| TOC                                        | mg C/l       | KWR     |                   |                   |                   |                                  |                                  |                                  |                                   |                                   |                                   |
| PHMOC                                      | mg C/l       | KWR     |                   |                   |                   | 0,00037                          | 0,00036                          |                                  |                                   |                                   |                                   |
| PHMPC                                      | mg C/l       | KWR     |                   |                   |                   | 0,00003                          | 0,00002                          |                                  |                                   |                                   |                                   |
| PHMCHC                                     | mg C/l       | KWR     |                   |                   |                   | 0,00016                          | 0,00019                          |                                  |                                   |                                   |                                   |
| AOC-A3                                     | µg biop.-C/l | KWR     | 4,6               | 5,7               | 0,25              | 1,1*                             | 0,76*                            | 180±11 <sup>§</sup> *            | 190±22 <sup>§</sup> *             | 170±40 <sup>§</sup> *             | 160±1,9 <sup>§</sup> *            |
| DOC                                        | mg C/l       | LC-OCD  | 2189              | 2264              | 1769              | 1769                             | 1769                             |                                  |                                   |                                   |                                   |
| CDOC                                       | mg C/l       | LC-OCD  | 2008              | 2146              | 1563              | 1563                             | 1563                             |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Biopolymers                                | mg C/l       | LC-OCD  | 83                | 106               | <1                | <1,3                             | <1,2                             |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Humuszuren                                 | mg C/l       | LC-OCD  | 1049              | 1158              | 1122              | <1122                            | <1122                            |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Building blocks                            | mg C/l       | LC-OCD  | 552               | 527               | 262               | 262                              | 262,1                            |                                  |                                   |                                   |                                   |
| LMW Acids                                  | mg C/l       | LC-OCD  | 16                | 31                | <1                | <1,0                             | <1,0                             |                                  |                                   |                                   |                                   |
| LMW Neutrals                               | mg C/l       | LC-OCD  | 308               | 325               | 179               | 179                              | 179                              |                                  |                                   |                                   |                                   |
| NO <sub>3</sub>                            | mg C/l       | LC-OCD  | 1704              | 1841              | 161               | 161                              | 161                              |                                  |                                   |                                   |                                   |
| NH <sub>4</sub>                            | mg C/l       | LC-OCD  | <1                | <1                | <1                | <1,0                             | <1,0                             |                                  |                                   |                                   |                                   |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,64                             | 0,63                              | 0,37                              | 0,58                              |
| BaO                                        | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,06                             | 0,04                              | 0,06                              | 0,04                              |
| C <sup>#</sup>                             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 35,04                            | 30,73                             | 55,71                             | 15,15                             |
| CaO                                        | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 17,75                            | 100,00                            | 11,91                             | 91,17                             |
| CoO                                        | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,02                             | 0,01                              | 0,01                              | 0,01                              |
| Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,01                             | 0,00                              | 0,00                              | 0,01                              |
| CuO                                        | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,01                             | 0,02                              | 0,02                              | 0,05                              |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 4,04                             | 3,14                              | 6,75                              | 9,29                              |
| K <sub>2</sub> O                           | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 16,69                            | 2,40                              | 16,90                             | 2,42                              |
| MgO                                        | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 15,72                            | 12,39                             | 16,54                             | 12,71                             |
| Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub>             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,10                             | 0,08                              | 0,06                              | 0,05                              |
| MoO <sub>3</sub>                           | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,01                             | 0,00                              | 0,01                              | 0,00                              |
| N <sup>#</sup>                             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 3,02                             | 2,56                              | 1,56                              | 1,28                              |
| Na <sub>2</sub> O                          | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 98,20                            | 25,96                             | 107,04                            | 25,93                             |
| Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,00                             | 0,00                              | 0,00                              | 0,00                              |
| NiO                                        | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,03                             | 0,01                              | 0,02                              | 0,01                              |
| p <sup>#</sup>                             | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,28                             | 0,22                              | 0,11                              | 0,09                              |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>#</sup> | µg/l         | XRF     |                   |                   |                   |                                  |                                  | 0,10                             | 0,08                              | 0,04                              | 0,03                              |

|                                |      |        |       |       |       |       |       |      |      |      |       |
|--------------------------------|------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|
| PbO                            | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00  |
| SO <sub>3</sub> <sup>#</sup>   | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 1,04 | 0,91 | 0,63 | 0,65  |
| SiO <sub>2</sub> <sup>#</sup>  | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 6,73 | 9,10 | 5,58 | 15,30 |
| SnO <sub>2</sub>               | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01  |
| SrO                            | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,36 | 0,31 | 0,34 | 0,31  |
| Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00  |
| TiO <sub>2</sub>               | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,05  |
| V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00  |
| WO <sub>3</sub>                | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00  |
| ZnO                            | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,06  |
| ZrO <sub>2</sub>               | µg/l | XRF    |       |       |       |       |       | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00  |
| Aluminium                      | µg/l | ICP-MS | 4,6   | 1,6   | 5,6   | 5,60  | 5,60  |      |      |      |       |
| Antimoon <sup>#</sup>          | µg/l | ICP-MS | 0,38  | 0,36  | 0,03  | 0,03  | 0,03  |      |      |      |       |
| Arseen <sup>#</sup>            | µg/l | ICP-MS | <0.50 | <0.50 | <0.50 | <0,50 | <0,50 |      |      |      |       |
| Barium                         | µg/l | ICP-MS | 25    | 24    | 15    | 15,00 | 15,00 |      |      |      |       |
| Beryllium <sup>#</sup>         | µg/l | ICP-MS | 0,01  | <0.01 | 0,03  | <0,03 | 0,03  |      |      |      |       |
| Bismut <sup>#</sup>            | µg/l | ICP-MS | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0,05 | <0,05 |      |      |      |       |
| Boor <sup>#</sup>              | µg/l | ICP-MS | 58    | 58    | 27    | 27,00 | 27,00 |      |      |      |       |
| Cadmium <sup>#</sup>           | µg/l | ICP-MS | 0,02  | 0,02  | 0,04  | 0,04  | 0,04  |      |      |      |       |
| Calcium                        | µg/l | ICP-MS | 4375  | 4325  | 44300 | 44301 | 44301 |      |      |      |       |
| Cerium <sup>#</sup>            | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,02  | 0,02  |      |      |      |       |
| Cesium <sup>#</sup>            | µg/l | ICP-MS | 0,06  | 0,06  | 0,02  | 0,02  | 0,02  |      |      |      |       |
| Chroom                         | µg/l | ICP-MS | 0,51  | <0.50 | <0.50 | <0,50 | <0,50 |      |      |      |       |
| Dysprosium <sup>#</sup>        | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,02  | 0,02  |      |      |      |       |
| Erbium <sup>#</sup>            | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,02  | 0,02  |      |      |      |       |
| Europium <sup>#</sup>          | µg/l | ICP-MS | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  |      |      |      |       |
| Gadolinium <sup>#</sup>        | µg/l | ICP-MS | 0,04  | 0,04  | 0,01  | 0,01  | 0,01  |      |      |      |       |
| Gallium <sup>#</sup>           | µg/l | ICP-MS | 0,01  | 0,02  | 0,01  | 0,01  | 0,01  |      |      |      |       |
| Germanium <sup>#</sup>         | µg/l | ICP-MS | <0.01 | 0,01  | 0,02  | 0,02  | 0,02  |      |      |      |       |
| Hafnium <sup>#</sup>           | µg/l | ICP-MS | 0,02  | <0.02 | 0,04  | <0,04 | <0,04 |      |      |      |       |
| Holmium <sup>#</sup>           | µg/l | ICP-MS | 0,01  | <0.01 | 0,02  | <0,02 | 0,02  |      |      |      |       |
| IJzer                          | µg/l | ICP-MS | <10   | <10   | 13    | 13,00 | 13,00 |      |      |      |       |
| Indium <sup>#</sup>            | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,02  | <0,02 | 0,02  |      |      |      |       |
| Iridium <sup>#</sup>           | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0,01 | <0,01 |      |      |      |       |
| Kalium                         | µg/l | ICP-MS | 8315  | 8435  | 1170  | 1170  | 1170  |      |      |      |       |
| Kobalt                         | µg/l | ICP-MS | 0,24  | 0,24  | 0,04  | 0,04  | 0,04  |      |      |      |       |
| Koper                          | µg/l | ICP-MS | 0,63  | 0,78  | <0.50 | <0,50 | <0,50 |      |      |      |       |
| Lanthanum <sup>#</sup>         | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,02  | 0,02  | 0,02  |      |      |      |       |
| Lithium <sup>#</sup>           | µg/l | ICP-MS | 8,6   | 8,9   | 3,2   | 3,20  | 3,20  |      |      |      |       |
| Lood                           | µg/l | ICP-MS | 0,01  | 0,02  | 0,2   | 0,20  | 0,20  |      |      |      |       |
| Lutenium <sup>#</sup>          | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,04  | <0,04 | 0,04  |      |      |      |       |
| Magnesium                      | µg/l | ICP-MS | 7680  | 8065  | 6025  | 6025  | 6025  |      |      |      |       |
| Mangaan                        | µg/l | ICP-MS | 0,06  | 0,06  | 0,35  | 0,35  | 0,35  |      |      |      |       |
| Molybdeen                      | µg/l | ICP-MS | 2,2   | 2     | 0,1   | 0,10  | 0,10  |      |      |      |       |
| Natrium                        | µg/l | ICP-MS | 49030 | 53470 | 12900 | 12900 | 12901 |      |      |      |       |
| Neodymium <sup>#</sup>         | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,01  | 0,01  | 0,01  |      |      |      |       |

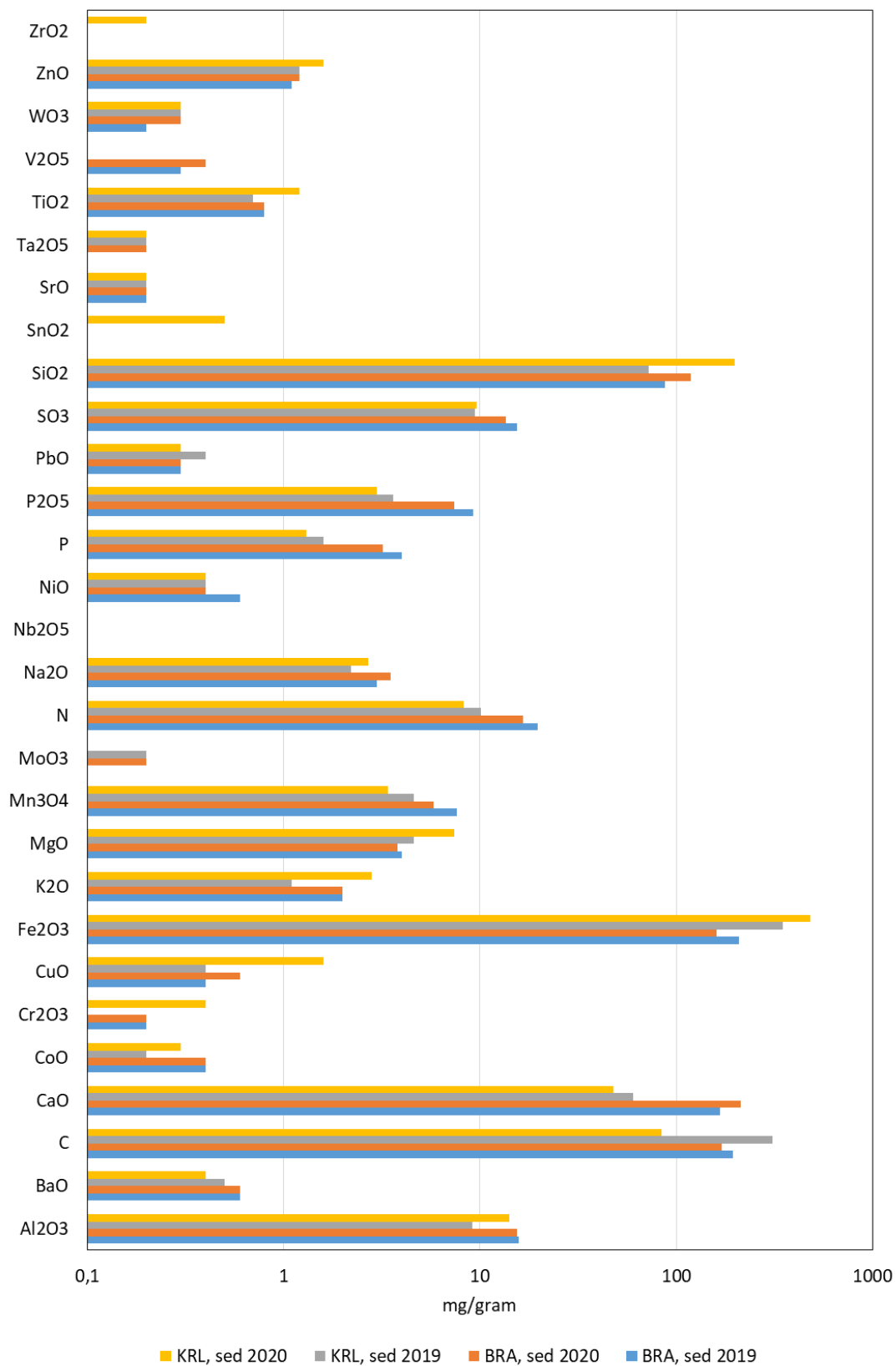
|                           |      |        |       |       |       |       |       |
|---------------------------|------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Nikkel                    | µg/l | ICP-MS | 3,4   | 3,4   | <0.10 | <0,10 | <0,10 |
| Niobium                   | µg/l | ICP-MS | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0,05 | <0,05 |
| Osmium <sup>#</sup>       | µg/l | ICP-MS | 0,01  | 0,01  | <0.01 | <0,01 | <0,01 |
| Palladium <sup>#</sup>    | µg/l | ICP-MS | 0,22  | 0,2   | 0,14  | 0,14  | 0,14  |
| Platina <sup>#</sup>      | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,01  | <0,01 | <0,01 |
| Praseodymium <sup>#</sup> | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,01  | 0,01  | 0,01  |
| Renium <sup>#</sup>       | µg/l | ICP-MS | 0,02  | 0,02  | 0,04  | 0,04  | 0,04  |
| Rubidium <sup>#</sup>     | µg/l | ICP-MS | 7,2   | 7,2   | 0,55  | 0,55  | 0,55  |
| Ruthenium <sup>#</sup>    | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0,01 | <0,01 |
| Samarium <sup>#</sup>     | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,01  | 0,01  | 0,01  |
| Scandium <sup>#</sup>     | µg/l | ICP-MS | <1.0  | <1.0  | <1.0  | <1,00 | <1,00 |
| Seleen <sup>#</sup>       | µg/l | ICP-MS | <0.50 | <0.50 | <0.50 | <0,50 | <0,50 |
| Strontium                 | µg/l | ICP-MS | 180   | 170   | 155   | 155   | 155   |
| Tantalium                 | µg/l | ICP-MS | <0.02 | <0.02 | 0,05  | <0,05 | <0,05 |
| Telluur <sup>#</sup>      | µg/l | ICP-MS | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0,05 | <0,05 |
| Terbium <sup>#</sup>      | µg/l | ICP-MS | 0,01  | <0.01 | 0,01  | <0,01 | 0,01  |
| Thallium <sup>#</sup>     | µg/l | ICP-MS | 0,01  | 0,01  | 0,06  | 0,06  | 0,06  |
| Thorium <sup>#</sup>      | µg/l | ICP-MS | <0.10 | <0.10 | <0.10 | 0,10  | 0,10  |
| Thulium <sup>#</sup>      | µg/l | ICP-MS | <0.01 | <0.01 | 0,03  | <0,03 | 0,03  |
| Tin                       | µg/l | ICP-MS | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0,50 | <0,50 |
| Titanium                  | µg/l | ICP-MS | <0.50 | <0.50 | <0.50 | <0,50 | <0,50 |
| Uranium <sup>#</sup>      | µg/l | ICP-MS | 0,04  | 0,4   | 0,06  | 0,06  | 0,06  |
| Vanadium                  | µg/l | ICP-MS | 0,19  | <0.05 | 0,16  | 0,16  | 0,16  |
| Wolfraam                  | µg/l | ICP-MS | 0,13  | 0,03  | 0,13  | 0,13  | 0,13  |
| Ytterbium <sup>#</sup>    | µg/l | ICP-MS | <0.01 | 0,01  | 0,04  | 0,04  | 0,04  |
| Yttrium <sup>#</sup>      | µg/l | ICP-MS | 0,02  | 0,02  | 0,03  | 0,03  | 0,03  |
| Zilver <sup>#</sup>       | µg/l | ICP-MS | <0.02 | <0.02 | <0.02 | <0,02 | <0,02 |
| Zink                      | µg/l | ICP-MS | 1,1   | 1,6   | 1,1   | 1,10  | 1,10  |
| Zirkonium                 | µg/l | ICP-MS | <0.05 | <0.05 | 0,11  | 0,11  | 0,11  |

Figuur 19. Concentratie metalen, bepaald met ICP-MS, in drinkwater en hemoflowconcentraat dat is gebruikt voor de groei- en overlevingsexperimenten. De resultaten staan opgenomen in Tabel 11.



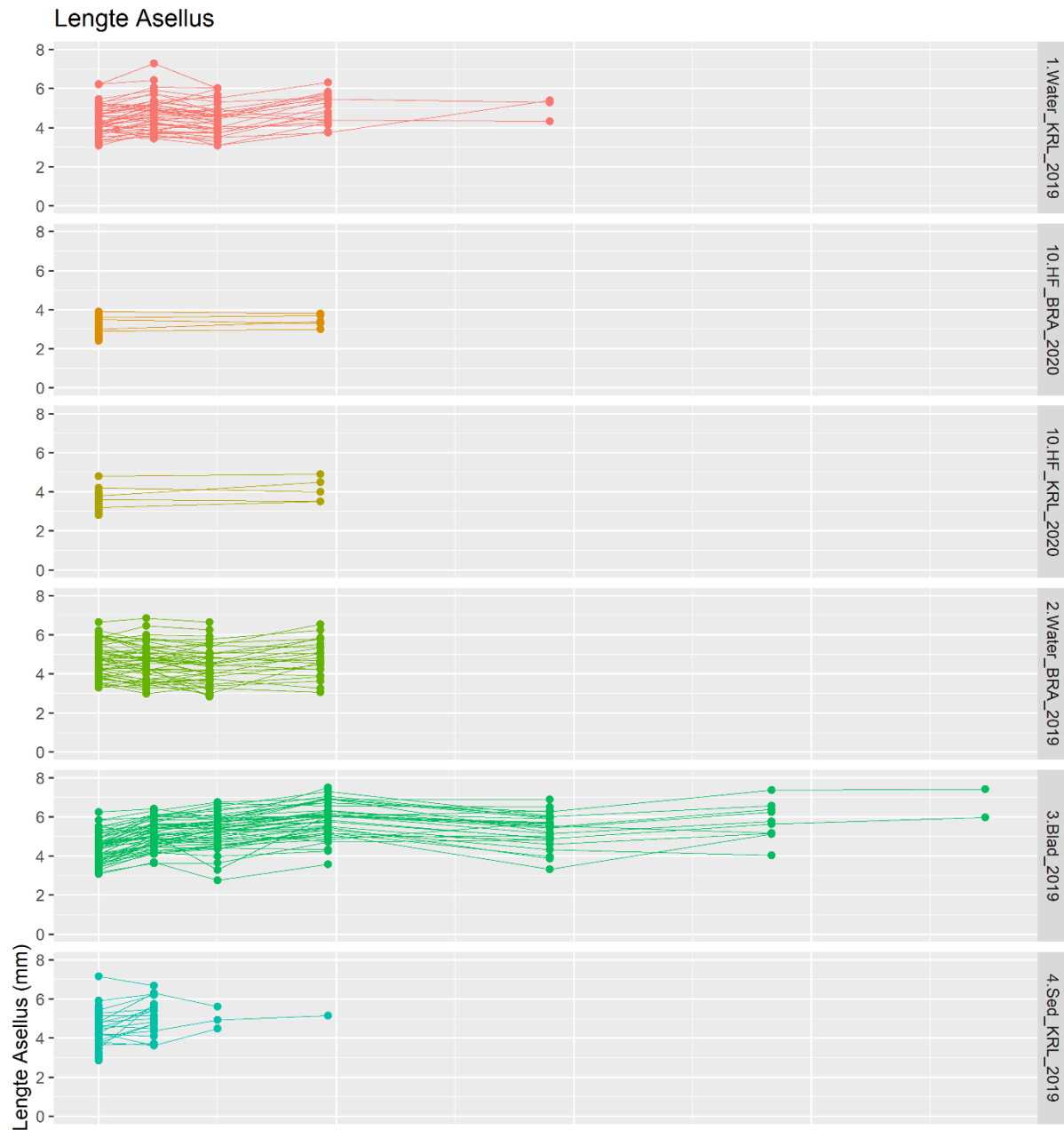


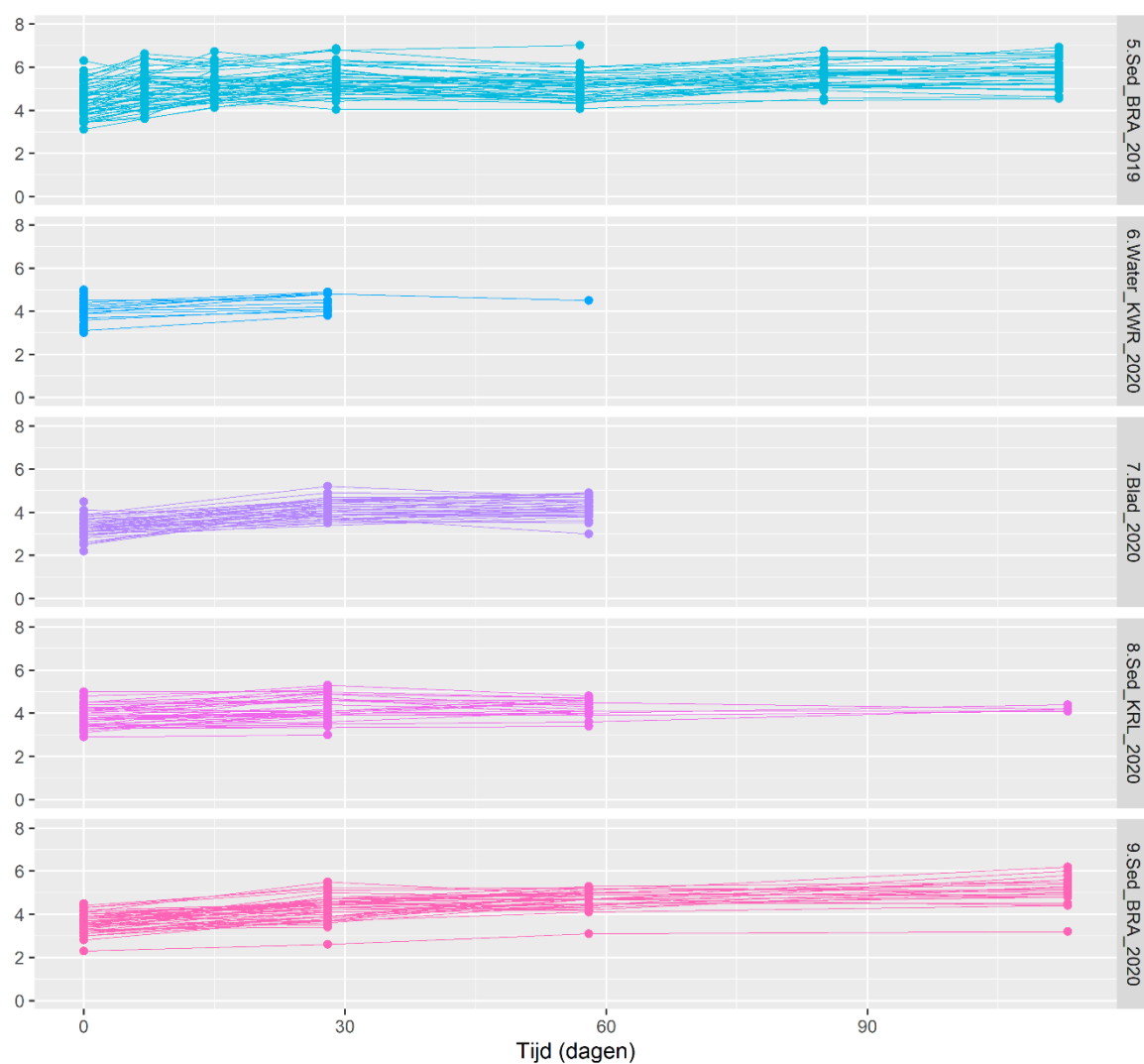
Figuur 20. Gehalte metalen in sediment dat is gebruikt voor de groei- en overlevingsexperimenten. De resultaten staan opgenomen in Tabel 11.



## IV Groei van *Asellus* per conditie

Figuur 21. Groei van *Asellus* (lengte in mm) onder verschillende condities.





## conditie

- 1.Water\_KRL\_2019
- 10.HF\_BRA\_2020
- 10.HF\_KRL\_2020
- 2.Water\_BRA\_2019
- 3.Blad\_2019
- 4.Sed\_KRL\_2019
- 5.Sed\_BRA\_2019
- 6.Water\_KWR\_2020
- 7.Blad\_2020
- 8.Sed\_KRL\_2020
- 9.Sed\_BRA\_2020