

RIVM rapport 601500004/2007

**Diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen
in oppervlaktewater van gebieden met
intensieve veehouderij**

M.H.M.M. Montforts¹, G.B.J. Rijs², J.A. Staeb²,
H. Schmitt³

¹ RIVM/Stoffen Expertise Centrum

² Rijkswaterstaat/Waterdienst

³ Universiteit Utrecht, IRAS

Contact: Mark Montforts
Stoffen Expertise Centrum
mark.montforts@rivm.nl

ISBN 978-90-6960-190-8

Ministerie van Verkeer en Waterstaat



Rijkswaterstaat

Dit onderzoek werd verricht door het RIVM en de Waterdienst in opdracht en ten laste van het ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en het ministerie van Verkeer en Waterstaat.

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 - 274 29 71

Abstract

Veterinary medicines and natural hormones in surface water in areas with intensive animal husbandry

Natural hormones are present in small waterways near intensive husbandry farms, but local fish populations were not affected. Also antibiotics have been detected, and an increased diversity in resistance genes against antibiotics within the local aquatic bacteria was found, compared to a nature reserve. Environmental risk limits for the mentioned substances are not available. It is recommended to estimate the risk of these substances. It is also desirable to investigate the possible effects of resistance genes on the environment.

These results follow from the research of RIVM and the Centre for Water Management performed by order of the Ministries of VROM, LNV and VenW. A field pilot study was conducted in 2004 and 2005 into the presence of natural hormones and veterinary medicines in polder ditches and regional surface waters. Water and sediments in different locations were analysed.

The concentrations of natural hormones range up to a few, occasionally several dozens, nanogrammes per litre surface water. In sediments the range is up to several hundreds of nanogrammes per kilo. At some locations higher values were found. The caught fish did not show any signs of hormonal disruption. To exclude any effects of natural hormones RIVM and Centre for Water Management advice to research the sensitivity of other species, for example amphibians and invertebrates.

The measured concentrations of veterinary medicines are comparable to that of the natural hormones. Four antibiotics were identified in the water: flumequin, sulfadiazin, trimethoprim and tylosin. In the agricultural areas more types of resistance genes were found than in nature reserves, suggesting that this coincides with the presence of animal husbandry. RIVM and the Centre for Water Management advice to further characterise the presence and effects of antibiotic resistance genes in surface waters.

Key words: surface water, animal husbandry, hormones, estrogenic effect, veterinary medicine, antibiotic resistance genes

Rapport in het kort

Diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in oppervlaktewater van gebieden met intensieve veehouderij

Natuurlijke hormonen komen voor in kleine oppervlaktewateren in het landelijk gebied, maar effecten op de lokale brasempopulatie werden niet gevonden. Daarnaast zijn antibiotica aangetoond, en werd een grotere verscheidenheid aan resistentiegenen in bacteriën tegen antibiotica aangetoond, dan in een natuurgebied. Milieukwaliteitsnormen voor bovengenoemde stoffen ontbreken. Het verdient aanbeveling de risico's van de concentraties van deze stoffen in te schatten. Ook is het gewenst de mogelijke effecten van resistentiegenen op het milieu nader uit te zoeken.

Dat blijkt uit een studie van het RIVM en de Waterdienst in opdracht van de ministeries VROM, LNV en VenW. In gebieden met intensieve veehouderij is in 2004 en 2005 een verkennend onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid van natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen in poldersloten en regionale oppervlaktewateren. Hiervoor zijn op verschillende locaties metingen uitgevoerd in water en waterbodem.

De concentraties natuurlijke hormonen bedragen soms tientallen nanogrammen per liter oppervlaktewater. Voor de waterbodem is dat enkele honderden nanogrammen per kilogram waterbodem. Op enkele locaties werden hogere gehalten aangetroffen. De gevangen brasems vertoonden geen hormoonverstoring. Om mogelijke effecten van natuurlijke hormonen uit te sluiten adviseren het RIVM en de Waterdienst om ook de gevoeligheid bij andere diersoorten te meten, bijvoorbeeld bij amfibieën en ongewervelden.

De gemeten concentraties diergeneesmiddelen zijn in dezelfde orde als die van natuurlijke hormonen. Vier antibiotica zijn in het water aangetoond, namelijk flumequine, sulfadiazine, trimethoprim en tylosine. In het landelijk gebied zijn meer soorten resistentiegenen tegen antibiotica gemeten dan in een natuurgebied. Vermoedelijk hangt dit samen met de aanwezigheid van veehouderijen. Onderzoek naar een oorzakelijk verband is eveneens gewenst.

Trefwoorden: oppervlaktewater, intensieve veehouderij, hormonen, oestrogeen effect, diergeneesmiddelen, antibiotica, resistentie

Inhoud

SAMENVATTING	9
1. INLEIDING.....	11
1.1 ACHTERGROND VAN HET ONDERZOEK.....	11
1.2 LEESWIJZER.....	12
2. HET VOORKOMEN VAN NATUURLIJKE HORMONEN EN DIERGENEESMIDDELEN IN HET MILIEU.....	13
3. SELECTIE VAN STOFFEN EN MONSTERLOCATIES.....	15
3.1 DIERGROEPEN, MEDICATIE EN MESTAANWENDING.....	15
3.2 BEMONSTERINGSLOCATIES	16
4. WERKWIJZE EN ANALYTISCHE METHODEN.....	21
4.1 MONSTERNAME EN TRANSPORT	21
4.2 CHEMISCHE ANALYSES.....	22
4.2.1 <i>Algemene parameters</i>	22
4.2.2 <i>Hormonen</i>	22
4.2.3 <i>Diergeneesmiddelen</i>	24
4.3 BIOLOGISCHE EFFECTMETINGEN	27
4.3.1 <i>ER-CALUX</i>	27
4.3.2 <i>Vitellogeninemetingen in brasems</i>	28
5. RESULTATEN.....	31
5.1 HORMONEN	31
5.1.1 <i>Kwaliteitscontrole</i>	31
5.1.2 <i>Meetresultaten water</i>	32
5.2 DIERGENEESMIDDELEN	37
5.2.1 <i>Resultaat methodeontwikkeling</i>	37
5.2.2 <i>Meetresultaten water</i>	37
5.2.3 <i>Meetresultaten sediment</i>	38
5.3 ER-CALUX.....	42
5.4 VITELLOGENINEMETINGEN IN BRASEMS.....	43
5.4.1 <i>Veldwerk</i>	43
5.4.2 <i>Viskarakteristieken</i>	43
5.4.3 <i>Vitellogeninemetingen</i>	44
5.5 RESISTENTIEONTWIKKELING BIJ BACTERIËN	45
6. DISCUSSIE EN CONCLUSIES	49
6.1 DISCUSSIE	49
6.2 CONCLUSIES.....	53
LITERATUUR	55
BIJLAGE 1: MESTAANWENDING IN NEDERLAND	63
BIJLAGE 2: GEGEVENS OVER HET VOORKOMEN EN HET GEDRAG IN HET MILIEU VAN HORMONEN EN DIERGENEESMIDDELEN	65

Samenvatting

De Gezondheidsraad heeft na onderzoeken in 1999 en 2001 geadviseerd om de aanwezigheid van twee stofgroepen in het watermilieu te onderzoeken, te weten geneesmiddelen en hormoonontregelende stoffen, en de gevolgen ervan voor het ecosysteem. Dit heeft voor hormoonontregelende stoffen geleid tot het Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES). Ook is een aantal monitoringscampagnes uitgevoerd naar de aanwezigheid van humane geneesmiddelen in afvalwater, oppervlaktewater, grondwater en drinkwater. In deze onderzoeken is vrijwel geen aandacht besteed aan diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in wateren gelegen in landelijke gebieden met (intensieve) veehouderij. Daarom hebben de betrokken ministeries het onderzoek 'Diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in oppervlaktewater van gebieden met intensieve veehouderij' laten uitvoeren.

In dit verkennende onderzoek is gekeken naar de aanwezigheid van natuurlijke hormonen en een aantal (dier)geneesmiddelen in poldersloten en regionale oppervlaktewateren in gebieden met (intensieve) veehouderij. Hierbij zijn in 2004 en 2005 metingen in het oppervlaktewater en de waterbodem uitgevoerd.

Een gericht onderzoek naar de route van verspreiding, vanuit de mest via uit- en afspoeling van het land, naar drainagebuizen en oppervlaktewater, is bewust buiten beschouwing gelaten. Dergelijk onderzoek is bewerkelijk door de diverse compartimenten die onderzocht moeten worden, en vereist dat op meerdere locaties de hele keten, van dier tot en met het water, gecontroleerd wordt. Gekozen is voor een verkennend onderzoek op meerdere locaties, zodat met de beschikbare middelen een algemeen representatief overzicht verkregen kon worden. Het is daardoor niet mogelijk om relaties te leggen tussen de bedrijfsvoering van een specifiek veeteeltbedrijf en de emissies van diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen, concentraties in oppervlaktewater en effecten in het watermilieu.

De aangetroffen concentraties natuurlijke hormonen zijn vergelijkbaar met in de literatuur gerapporteerde waarden van enkele (soms tientallen) nanogrammen per liter oppervlaktewater en enkele honderden nanogrammen per kilogram waterbodem. Op één locatie werden hogere gehalten aangetroffen, namelijk tot 7,8 µg/kg (droge stof) voor oestron in de waterbodem en tot 25-50 ng/l in het oppervlaktewater voor de hormonen 17α- en 17β-oestradiol. Ook werd het synthetische hormoon 17α-ethinyloestradiol in hoge gehalten aangetroffen in een van de watermonsters, wat opmerkelijk is omdat deze stof doorgaans niet in zulke hoge concentraties in oppervlaktewater of stedelijk afvalwater wordt aangetroffen.

Er is ook gekeken naar het optreden van oestrogene effecten bij vissen en antibioticaresistentie bij bacteriën. Dit geeft inzicht in de gevolgen van de aanwezigheid van gemeten concentraties hormonen of antibiotica. Deze beoordeling kan ook als 'biomarker'

dienen voor (eerdere) blootstelling, in het geval dat de concentraties niet (meer) aantoonbaar zijn.

Er is geen relatie aangetoond tussen de gemeten concentraties van de hormonen en de totale hormoonverstorende potentie zoals die is gemeten met de biologische testmethode ER-CALUX[®]. De brasems in veehouderijgebieden vertoonden ook geen kenmerken van oestrogene beïnvloeding. De aanwezigheid van natuurlijke hormonen lijkt geen invloed te hebben op de lokale populaties van brasems. Mogelijke effecten op andere populaties in het ecosysteem zijn niet onderzocht. Een vergelijking van de relatieve gevoeligheid van vitellogininemeting bij vissen ten opzichte van de gevoeligheid van bijvoorbeeld amfibieën en ongewervelden voor natuurlijke hormonen strekt tot de aanbeveling.

Ook de gemeten concentraties van diergeneesmiddelen zijn vergelijkbaar met gerapporteerde waarden in de literatuur van diergeneesmiddelen in landelijke gebieden in Europa en de Verenigde Staten en bevinden zich in de orde van enkele nanogrammen per liter water tot enkele duizenden nanogrammen per kilogram waterbodems. Vier antibiotica zijn aangetoond in het water, te weten flumequine, sulfadiazine, trimethoprim en tylosine. In de waterbodems in veeteeltgebieden zijn amoxicilline, flumequine, sulfadiazine en sulfamethoxazole aangetroffen. In gebieden met varkenshouderijen werd consistent flumequine met enkele microgrammen per kilogram aangetoond. Dit is opmerkelijk omdat op basis van het antibioticagebruik bij varkenshouderijen eerder de aanwezigheid van oxytetracycline wordt verwacht in plaats van flumequine. Oxytetracycline werd op slechts één locatie aangetroffen. Het algemene beeld is dat de diergeneesmiddelen minder frequent en in lagere concentraties voorkomen dan dat humane geneesmiddelen buiten het landelijk gebied worden aangetroffen. Omdat milieukwaliteitsnormen voor deze stoffen ontbreken, kunnen de risico's van deze concentraties niet geschat worden.

Er is ook gekeken naar antibioticaresistentie bij bacteriën. Dit onderzoek laat zien dat het gebruik van antibiotica kan leiden tot een grotere diversiteit van antibioticaresistentiegenen in het lokale watermilieu. In het water van een natuurgebied met nauwelijks antropogene beïnvloeding werden geen restanten van antibiotica en weinig resistentiegenen aangetroffen. Uit aanvullend literatuuronderzoek is gebleken dat resistentie van nature algemeen voorkomt. Nader onderzoek naar diversiteit en kwantiteit van antibioticaresistentiegenen in onbelaste gebieden en in potentiële emissiebronnen, zoals mest en stedelijk afvalwater, evenals naar de mogelijke effecten op het milieu, strekt tot aanbeveling.

Het meten van antibioticaresistenten in milieumonsters blijkt een lastige aangelegenheid. De nauwkeurigheid van de toegepaste analysemethoden voor de diergeneesmiddelen was laag, in het bijzonder voor waterbodems. Ook verdere optimalisering van de analysemethoden strekt dus tot aanbeveling, wanneer vervolgonderzoek wordt geïnitieerd.

1. Inleiding

1.1 Achtergrond van het onderzoek

Dit rapport doet verslag van een verkennend onderzoek naar de aanwezigheid van diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in poldersloten en regionale oppervlaktewateren in gebieden met (intensieve) veehouderij en tevens naar mogelijke hormoonverstorende effecten en het voorkomen van antibioticaresistentie. Het onderzoek is verricht op verzoek van de minister, na een toezegging van haar aan de Tweede Kamer.¹

De laatste jaren is kennis van en onderzoek naar de problematiek van geneesmiddelen en hormoonverstorende stoffen in het watermilieu aanzienlijk toegenomen. In Nederland heeft de Gezondheidsraad in twee rapporten (Gezondheidsraad, 1999; 2001) haar bezorgdheid uitgesproken over de aanwezigheid van geneesmiddelen en hormoonontregelende stoffen in het aquatische milieu. De Gezondheidsraad adviseerde serieuze aandacht te besteden aan de problematiek van de aanwezigheid van deze stofgroepen in het (water)milieu en de resulterende nadelige effecten nauwkeurig te volgen.

Dit advies leidde voor wat betreft de hormoonontregelende stoffen onder andere tot het Landelijke Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES), dat een beeld geeft van de aard en omvang van de gemeten concentraties en geassocieerde effecten van oestrogene stoffen in het Nederlandse watermilieu (Vethaak et al., 2002).

Ook over (dier)geneesmiddelen zijn de afgelopen tien jaren diverse overzichtsrapporten verschenen (Derksen et al., 2001; Derksen en De Poorter, 1997; Van Vlaardingen en Montforts, 1999; Mons et al., 2000; Jongbloed et al., 2001). In 2002 hebben KIWA, RIVM, RIWA en RIZA een aantal monitoringscampagnes naar de aanwezigheid van vooral humane geneesmiddelen in afvalwater, oppervlaktewater, grondwater en drinkwater uitgevoerd (Schrap et al., 2003; Sacher en Stoks, 2003; Versteegh et al., 2003; Mons et al., 2003).

In het LOES-onderzoek en in de monitoringscampagnes naar geneesmiddelen is slechts beperkt aandacht geschonken aan de aanwezigheid van natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen in oppervlaktewater in gebieden met (intensieve) veehouderij. Het bleef dus onbekend in welke mate diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen uit mest daadwerkelijk in de poldersloten terecht komen en wat de eventuele nadelige effecten zijn. Het onderzoek dat in dit rapport beschreven wordt is bedoeld om deze ontbrekende kennis aan te vullen. Aanvullend op dit onderzoek is literatuuronderzoek uitgevoerd naar voorkomen en milieueffecten van antibioticaresistentiegenen (Mensink en Montforts, 2007).

¹ Kamerstukken II 1999-2000, 26 624, nr. 2

1.2 Leeswijzer

In hoofdstuk 2 worden de beschikbare gegevens over het voorkomen en het gedrag van natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen uit de openbare literatuur kort samengevat. Bijlage 2 bevat een overzicht van de literatuur tot aanvang 2007.

In hoofdstuk 3 worden de selecties van de monsterlocaties en stoffen toegelicht. Bijlage 1 beschrijft de gegevens over mestaanwending.

Hoofdstuk 4 beschrijft de gehanteerde analysemethoden.

De resultaten van dit onderzoek worden gepresenteerd in hoofdstuk 5.

In hoofdstuk 6 worden de resultaten vergeleken met de bevindingen uit eerdere monitoringsonderzoeken naar natuurlijke hormonen en geneesmiddelen in regionale wateren, en worden conclusies en aanbevelingen geformuleerd.

Opgemerkt wordt dat RIZA en RIKZ in 2007 zijn opgegaan in de Waterdienst van Rijkswaterstaat. Aangezien het onderzoek heeft plaatsgevonden voor dit moment, wordt nog van RIZA en RIKZ gesproken in de voorliggende rapportage.

2. Het voorkomen van natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen in het milieu

In potentie is de bijdrage van de veestapel aan de bruto-emissie van natuurlijke hormonen groter dan die van de menselijke bevolking. In het RIWA-rapport 'Herkomst en lot van natuurlijke oestrogenen in het milieu' wordt de excretie van natuurlijke hormonen van totaal vee berekend op 46,2 kg/dag en voor de mens op 3,2 kg/dag (Blok en Wösten, 2000). Recent is een soortgelijk onderzoek voor Groot-Brittannië gerapporteerd (Johnson et al., 2005).²

Het quotiënt van de jaarproductie aan natuurlijke hormonen, 17 ton hormoon, en het totale areaal aan landbouwgrond in Nederland, 2 miljoen hectare (Van Staalduinen et al., 2001), levert een vracht van gemiddeld 8 gram per hectare op, gelijk aan 2,8 µg/kg grond (0-20 cm). Het verbruik aan antibiotica in de veehouderij bedroeg 402 ton in 2002; wat ruim 60 µg/kg grond zou opleveren (FIDIN, 2003). Deze concentraties kunnen bereikt worden als de stoffen stabiel zijn in de mest en in de bodem. Het is bekend dat stoffen in dit opzicht sterk van elkaar verschillen (Das et al., 2004). Bovendien is gebleken dat de aanwezigheid van antibiotica in mest de concentratie hormonen verhoogt: het verhindert microbiële afbraak (Shore et al., 1993b; Chun et al., 2006).

Uit studies naar de aanwezigheid van bacteriële verontreiniging vanuit landbouwgrond blijkt dat de bacteriën die op het land worden gebracht, hetzij door grazende dieren, hetzij door het uitrijden van mest, in het water terechtkomen (Walker, 1997; Walker en Stedinger, 1999). Bacteriële verontreiniging uit mest bereikt het oppervlaktewater door transport van water door en/of over bodem naar het oppervlaktewater. Het transport is sterk afhankelijk van de grondsoort en hydrologische omstandigheden (Oliver et al., 2003; Shore et al., 2004; Oliver et al., 2005). Het is ook gebleken dat mest van grazende dieren een grotere belasting van drainagewater veroorzaakt dan drijfmest (Vinten et al., 2002; McGechan en Vinten, 2004; Vinten et al., 2004). Soortgelijke waarnemingen zijn gedaan voor de uit- en afspoeling van bodemherbiciden, nutriënten, maar ook voor erosie van bodemdeeltjes (Walker et al., 2005).

Aangezien de residuen van natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen in de bodem gevoelig zijn voor afspoeling of drainage, wordt het oppervlaktewater in het landelijk gebied blootgesteld aan natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen vanuit de veehouderij. De te verwachten concentraties zijn ook afhankelijk van de stoffeigenschappen, en zouden in theorie honderden microgrammen per liter kunnen bedragen. Partitie naar het sediment is ook een belangrijke route (Shore et al., 1993a; Peterson et al., 2000; Boxall et al., 2002a; Shore en

² In deze publicatie is de productie van oestradiol door rundvee een factor zeven onderschat, omdat deze was uitgerekend op basis van gerapporteerde concentraties in faeces (gerapporteerd in Möstl et al., (1984)), waarbij werd *aangenomen* dat de faeces als drooggewicht gerapporteerd waren, terwijl het in feite om versgewicht faeces ging (Persoonlijke mededeling prof. dr. E. Möstl, Universiteit van Wenen, 29 mei 2006.).

Shemesh, 2003; Hanselman et al., 2003; Kay et al., 2004; Kim en Carlson, 2006; Kim en Carlson, 2007).

De openbare wetenschappelijke literatuur bevat diverse publicaties over het voorkomen van diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in het oppervlaktewater en sediment. De gegevens met betrekking tot het voorkomen van deze stoffen in watersystemen in het landelijk gebied worden in Bijlage 2 gepresenteerd.

Diergeneesmiddelen worden gevonden in het landelijke gebied in bodem, water en sediment als microverontreiniging. Oxytetracycline wordt als persistent gekarakteriseerd. De adsorptie aan bodem is sterk maar zowel gebonden residuen als metabolieten vertonen biologische activiteit. Residuen in de bodem kunnen uit- of afspoelen. Sulfonamiden worden in anaerobe mest niet omgezet en worden zelfs teruggevormd uit metabolieten. Zij worden als zeer weinig persistent gekarakteriseerd onder aerobe omstandigheden. Sulfonamiden zijn zeer mobiel in de bodem. Flumequine is persistent in anaerobe sedimenten.

Hormonen worden gevonden in landelijke gebieden in water en sediment als nano-verontreiniging, dat wil zeggen in de nanogrammen per liter of per kilogram. Tijdens transport via drainage of run-off kunnen de concentraties in het afvloeiende water hoger zijn. Natuurlijke hormonen worden als zeer weinig persistent onder aerobe omstandigheden gekarakteriseerd. Zij kunnen aan de bodem adsorberen, maar vertonen nog wel biologische activiteit en zijn gevoelig voor af- en uitspoeling van landbouwgronden.

3. Selectie van stoffen en monsterlocaties

3.1 Diergroepen, medicatie en mestaanwending

Voor de selectie van geschikte bemonsteringslocaties is het verbruik van diergeneesmiddelen en de excretie van natuurlijke hormonen per type veeteeltbedrijf (melkvee, mestkalveren, vleeskuikens, fokvarkens, vleeskuikens) geïnventariseerd in relatie tot het bodemgebruik en de grondsoort (zand, veen, klei). Inventarisatie heeft plaatsgevonden op basis van de aanwezige openbare literatuur en informatie die beschikbaar was bij deskundigen van het Landbouw Economisch Instituut (LEI). In Tabel 3.1 zijn de aandachtstoffen voor analyse per type veeteeltbedrijf gegeven.

Het merendeel van het antibioticaverbruik in Nederland is bestemd voor gemengd gebruik, dat wil zeggen dat 75% van de afgezette middelen bestemd is voor meerdere doeldieren. Van de overige middelen nemen die voor varkens het grootste deel voor hun rekening (FIDIN, 2004).

De melkveebedrijven zijn relevant voor wat betreft de natuurlijke hormonen. Het gebruik van diergeneesmiddelen in deze veeteeltsector is laag. Wel worden vruchtbaarheidshormonen toegepast zoals fertagyl, dinolytic, cenceptyl en receptal met als werkzame stoffen gonadoreline, dinoprosttromethamime of busereline-acetaat.

Tabel 3.1 Keuze van te analyseren natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen per type veeteeltbedrijf.

veeteeltbedrijf	1e keuze	2e keuze
melkkoeien	α/β -oestradiol oestron	
slachtvee/mestkalveren	oxytetracycline 4-epi-oxytetracycline (afbraakproduct) sulfamethoxazole	flumequine trimethoprim sulfadiazine amoxicilline doxycycline α/β -oestradiol oestron
fokvarkens	α/β -oestradiol oestron oxytetracycline 4-epi-oxytetracycline sulfamethoxazole sulfadiazine doxycycline	trimethoprim amoxicilline
vleesvarkens	oxytetracycline 4-epi-oxytetracycline	α/β -oestradiol oestron doxycycline sulfamethoxazole sulfadiazine
vleeskuikens	doxycycline amoxicilline	sulfamethoxazol tylosine
legghennen	-	-

Antibiotica wordt gebruikt door onder andere bedrijven met mestkalveren, fokvarkens en vleesvarkens. De meest gebruikte antibiotica zijn oxytetracycline en sulfamethoxazole, maar ook worden sulfadiazine, doxycycline, amoxicilline, flumequine en trimethoprim toegepast.

Daarnaast worden antiparasitaire middelen toegepast zoals ivermectine, flubendazol, fenbendazol, fenbantel en levamisol.

In de pluimveesector worden naast coccidiostatica, zoals monensin en salinomycine, de antibiotica doxycycline, amoxicilline en in mindere mate sulfamethoxazole en tylosine, gebruikt. Dit gebeurt alleen bij vleeskuikens. Leghennen krijgen geen coccidiostatica.

3.2 Bemonsteringslocaties

Bij de selectie van bemonsteringslocaties is getracht zo veel mogelijk aansluiting te zoeken bij lopende monitoringsprogramma's naar nutriëntenuitspoeling vanuit veehouderij naar oppervlaktewater. Genoemd kunnen worden:

- Het landelijk meetnet effecten mestbeleid.
- De DOVE-projecten die de diffuse belasting van voor wat betreft N en P vanuit de melkveehouderij op zand-, klei- en veengrond naar oppervlaktewater in beeld brengen (Plette et al., 2004).
- Pilots voor monitoring van deelstroomgebieden in Noord-Brabant.
- Meerjarig monitoringsprogramma naar de uit- en afspoeling van landbouwgronden in stroomgebieden en polders.

Doorgaans was er (nog) geen informatie beschikbaar over de relatie tussen de aanwezige veeteeltbedrijven en het uitrijden van een bepaald type mest met de kwaliteit van het ontvangende oppervlaktewater. Ook andere criteria, die specifiek golden voor dit onderzoek, bepaalden de locatiekeuze. Zo mocht de bemonsteringslocatie slechts marginaal beïnvloed worden door andere (huishoudelijke) lozingen met (dier)geneesmiddelen of natuurlijke hormonen. Bovendien moest gelet op de geplande effectmetingen in het veld, onder andere voor het aantonen van hormoonontregeling bij vissen, de mogelijkheid bestaan om, desnoods stroomafwaarts, vissen vanuit een stroomgebied met vooral veehouderij weg te vangen.

Door het Landbouw Economisch Instituut (LEI) zijn op basis van CBS-gegevens enkele figuren met de aanwending per gemeente voor dunne rundveemest, kalvermest, vlees- en fokvarkensmest evenals vaste pluimveemest in Nederland geleverd. Zie ook Bijlage 1 (Puister, 2004). Geschikte bemonsteringslocaties zijn gezocht binnen lopende monitoringsprogramma's naar nutriëntenuitspoeling vanuit veehouderij. Op basis van de illustraties uit Bijlage 1, is een verdeling over grondsoorten en dierhouderijen gezocht. Voor vlees- en fokvarkensmest komen locaties op zandgronden in Oost-Brabant en Drenthe in aanmerking, klei- of veenlocaties met rundveemest in vele gebieden in Nederland en zand/klei-locaties met vaste pluimveemest in de Flevopolders.

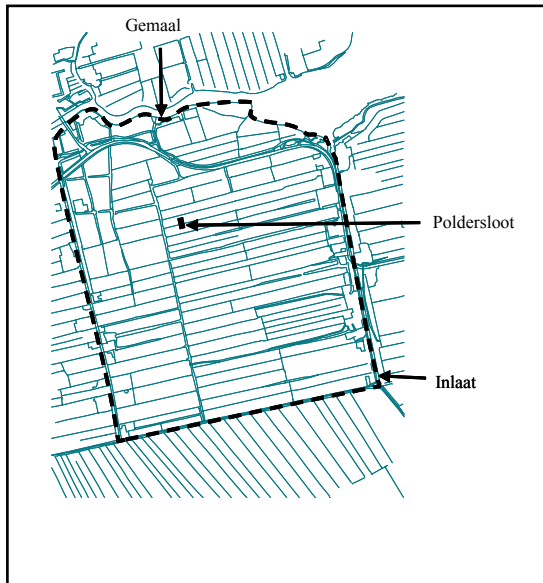
In Tabel 3.2 staan de geselecteerde bemonsteringslocaties voor dit onderzoek vermeld. Deze keuze is bepaald door RIZA en RIVM in samenwerking met het betreffende waterschap. Te

Tabel 3.2 Kenmerken van de bemonsteringslocaties.

locatie	type mest	bodemssoort	bemonsteringsperiode	
			najaar 2004	voorjaar 2005
Vlietpolder - poldersloot - uitlaatwater	melkvee	veen	x x	x x
stroomgebied Raam - Graspeelloop - Rusvensche Loop - Hoge Raam - Lage Raam	(fok)varkens en melkvee	zand	x x	x x
Flevopolder - Oldebroekertocht	vleeskuikens	klei	x	
Waardenburg - greppel - proefsloot	melkvee	klei		x x
Dedemsvaart - greppel	vleesvarkens	zand		x
Naardermeer	referentie			x

onderscheiden zijn de meetperioden najaar 2004 en voorjaar 2005. In het najaar 2004 is een algemeen beeld verkregen van de concentraties en het al dan niet optreden van hormoonontregelende effecten in het veld. De bemonsteringen in het voorjaar 2005 hebben in vergelijking tot die van najaar 2004 dichterbij de bemeste kavel plaatsgevonden en waren gericht op het meten van concentraties diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in oppervlaktewater na bemesting. Het tijdstip van bemonsteren werd bepaald door het moment van uitrijden van de mest en de weersomstandigheden.

De Vlietpolder nabij Woubrugge (Zuid-Holland) wordt als proeflocatie gebruikt binnen het Veeweide-project van het Hoogheemraadschap van Rijnland en binnen het DOVE-project voor het opstellen van N- en P-balansen van melkveebedrijven op veengrond (Plette et al., 2004). De Vlietpolder is ruim 200 hectare groot en de hoeveelheid inlaatwater en uitgeslagen water evenals de waterkwaliteit worden door het Hoogheemraadschap geregistreerd. Binnen het DOVE-project wordt gebruik gemaakt van een proefsloot, zijnde een poldersloot die het water van vier percelen ontvangt. Deze vier percelen worden gebruikt door een melkveebedrijf. Ook de andere bedrijven in de Vlietpolder zijn vooral melkveebedrijven. Het uitlaatwater is het water dat via een gemaal uit de Vlietpolder wordt geslagen. Het water uit de proefsloot en het uitgeslagen polderwater zijn gedurende het najaar 2004/voorjaar 2005 bemonsterd.



Figuur 3.1 Bemonsteringslocatie Vlietpolder met poldersloot en gemaal. De begrenzing van het systeem is aangegeven met de gestreepte lijn.

Het stroomgebied Raam is gelegen nabij dorpje Zeeland in Oost-Brabant in een landelijk gebied met een grote intensiteit aan (fok)varkenshouderijen en verder grasland en akkerbouw. De Rusvensche Loop en Graspeelloop monden uit in de Hoge Raam die op zijn beurt weer uitkomt in de Lage Raam. De Hoge Raam en Lage Raam zijn in het najaar 2004 bemonsterd om een algemeen beeld te krijgen. Het bemonsteringspunt van Lage Raam is bovenstrooms gelegen van uitmonding op de Hoge Raam. De Rusvensche Loop en Graspeelloop zijn in de meetperiode van voorjaar 2005 meegenomen.



Figuur 3.2 Stroomgebied Raam met monsterlocaties Graspeelloop, Rusvensche Loop, Lage en Hoge Raam (foto).

De Oldebroekertocht nabij Biddinghuizen in Flevoland is bemonsterd omdat mest van vleeskuikens op land bewaard wordt en uitgereden zodra het land onbebouwd is. De grondsoort is klei.



Figuur 3.3 Bemonsteringslocatie Oldebroekertocht.

De locatie Waardenburg wordt ook gebruikt binnen het DOVE-project voor het opstellen van N- en P-balansen van melkveebedrijven op kleigrond. Het geselecteerde melkveebedrijf is 34 ha met 60 koeien. Het proefperceel heeft een oppervlakte van circa 4 ha. Het perceel wordt gedraineerd met behulp van drains en greppels en het water wordt afgevoerd via een sloot. Het water uit de greppel en de sloot is in het voorjaar 2005 eenmalig bemonsterd.



Figuur 3.4 Bemonsteringslocatie (sloot) Waardenburg.



Figuur 3.5 Uitgereden varkensmest op locatie Dedemsvaart met bemonsterde greppel.

De locatie Dedemsvaart is verkregen uit het landelijk meetnet effecten mestbeleid. Op dit akkerbouwbedrijf is op de bemonsterde percelen (16 ha) mest van vleesvarkens uitgereden. Drainage van de zanderige bodem vindt plaats via drains en één greppel naar een afvoerende sloot. Het water uit de greppel is in het voorjaar 2005 eenmalig bemonsterd.

Het Naardermeer fungeert als referentielocatie. Van dit natuurgebied mag verondersteld worden dat dit, naar Nederlandse begrippen, minimaal wordt blootgesteld aan menselijke beïnvloeding.

4. Werkwijze en analytische methoden

4.1 Monstername en transport

Van elke geselecteerde locatie is zowel oppervlaktewater als sediment bemonsterd. De bemonstering is uitgevoerd door RIVM en RIZA. Het doel van de meetperiode in het najaar 2004 was een algemeen beeld te krijgen van de concentraties aan natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen in regio's met (intensieve) veehouderij. Ook zouden mogelijke veldeffecten aangetoond moeten worden, in navolging van vergelijkbaar onderzoek bij rioolwaterzuiveringen (Baronti et al., 2000). Hierdoor is bij de opzet van de bemonstering in het najaar 2004 geen rekening gehouden met het werkelijke moment van mest uitrijden. In het voorjaar 2005 is binnen de organisatorische mogelijkheden bij de bemonstering wel geanticipeerd op het tijdstip van mest uitrijden en nadat af- of uitspoeling door regen heeft kunnen plaatsvinden.

De oppervlaktewatermonsters zijn verkregen door middel van een steekmonster. Na homogene menging in een verzamelvat is het water verdeeld over groene glazen literflessen, afgesloten met een zwarte dop met teflon inlay. Sommige analysemethoden, zoals de bacteriële parameters, vereisten andere flessen (steriel). Bij de bemonstering is steeds gewerkt van schoon naar vuil water. Per monsterlocatie is in totaal 16 liter water bemonsterd voor de bepaling van diergeneesmiddelen (5 l), natuurlijke hormonen (1 l), nutriënten (1 l), zware metalen (1 l), algemene parameters (1 l), ER-CALUX[®] (1 l), resistentieontwikkeling (5 l) en bacteriologische parameters (1 l).

De sedimentmonsters zijn genomen met behulp van een Van Veen-happer, waarbij de bovenste laag van het sediment is bemonsterd. Door aanwezigheid van steenafval en plantenresten was dit niet altijd goed mogelijk. Na homogene menging in een verzamelvat is het sediment verdeeld over bruine glazen literpotten. In totaal is 11 liter sediment per monsterlocatie bemonsterd voor de bepaling van natuurlijke hormonen en van ER-CALUX[®] (beide 1 l), en van diergeneesmiddelen, resistentieontwikkeling en algemene parameters (alle 3 l).

Direct na monstername werden de monsters gekoeld getransporteerd en binnen 36 uur na monstername ter verwerking aan de desbetreffende laboratoria aangeboden. De monsters waren niet geconserveerd tot het moment van afleveren.

De oppervlaktewatermonsters werden chemisch geanalyseerd op de geselecteerde diergeneesmiddelen, de natuurlijke hormonen, enkele algemene parameters en de bacteriologische kwaliteit evenals de bioassays voor de bepaling van de oestrogene potentie (ER-CALUX[®]) en resistentieontwikkeling van bacteriën. Alle analyses zijn uitgevoerd in het totale watermonster, dus zonder filtratie vooraf.

De sedimentmonsters zijn eveneens geanalyseerd op de geselecteerde diergeneesmiddelen, resistentieontwikkeling van bacteriën en enkele algemene parameters ter karakterisering van het monster. In de monsterperiode van najaar 2004 zijn daarnaast ook de natuurlijke hormonen en ER-CALUX[®] in het sediment bepaald mede ter verdere optimalisatie van deze analysemethoden in vaste matrices.

Het al dan niet optreden van oestrogene effecten bij waterorganismen is in najaar 2004 onderzocht door mannelijke brasems uit drie regionale wateren in gebieden met (intensieve) veehouderij weg te vangen en te onderzoeken op vervrouwelijking.

4.2 Chemische analyses

De chemische analyses kunnen worden onderverdeeld in algemene parameters ter karakterisering van het water- of sedimentmonster, de natuurlijke hormonen en de geselecteerde diergeneesmiddelen.

4.2.1 Algemene parameters

De algemene karakteriseringsparameters voor oppervlaktewater zijn zwevende stof, P-totaal, N-totaal, de metalen koper, zink en borium, chloride, geleidingsvermogen en pH. Deze algemene analyses zijn in najaar 2004 en voorjaar 2005 respectievelijk uitgevoerd door waterschap Rivierenland en Omegam. Ook zijn enkele van deze algemene parameters ter plekke op de bemonsteringslocatie gemeten. Voor een ander project is in najaar 2004 ook de bacteriologische kwaliteit van een aantal watermonsters bepaald aan de hand van de indicatorparameters E-coli, intestinale enterococci en thermotolerante bacteriën van de coli-groep. Voor de volledigheid zijn deze meetwaarden ook in deze rapportage opgenomen.

Voor de waterbodem zijn de algemene karakteriseringsparameters droogrest, organisch stofgehalte, lutumgehalte (fractie < 2 µm) en de metalen koper en zink, en borium gemeten. Vanwege het oriënterende karakter van dit onderzoek is een verdere fractieverdeling van het sedimentmonster achterwege gelaten. Ook de karakterisering van de sedimentmonsters zijn door waterschap Rivierenland en Omegam uitgevoerd.

4.2.2 Hormonen

De analyses van natuurlijke hormonen in water en sediment zijn uitgevoerd door het Instituut voor Milieuvraagstukken (IVM). Het betreft de analyse van de volgende stoffen: 17α-oestradiol (17α-E2), 17β-oestradiol (E2), oestron (E1), oestriol (E3) evenals de synthetische hormonen 17α-ethinyloestradiol (EE2) en mestranol. Deze synthetische hormonen zijn toegevoegd aan de selectie omdat de analysemethode hierin moeiteloos kon voorzien.

Uitscheiding van de natuurlijke hormonen door zoogdieren gebeurt voornamelijk in de vorm van biologisch inactieve glucuronides en sulfaatconjugaten. In rioolwater en oppervlaktewater wordt echter slechts de gedeconjugeerde vorm aangetroffen (Baronti et al., 2000). Op basis van de beperkte literatuurgegevens met betrekking tot deconjugatie van de

inactieve glucuronides en sulfaten tot vrije oestrogenen in een omgeving met veel bacteriën wordt verwacht dat de emissie van de natuurlijke hormonen uit mest naar het oppervlaktewater voornamelijk in de vorm van gedeglucuronideerde en gedesulfateerde biologische actieve hormonen zal plaatsvinden. Daarom is bij de analyseprocedure van de natuurlijke hormonen geen deconjugatiestap opgenomen.

Water

Omdat er geen conservering is toegepast zijn alle watermonsters zo snel mogelijk na binnenkomst opgewerkt. De opwerking van de monsters bestond uit een Solid Phase Extractie (SPE). Ongeveer 1 liter water is met behulp van SPE geëxtraheerd op een SDB-Speedisk. Als interne standaard is een gedeutereerd β -E2 (E2-d4) toegevoegd. Tot aan verdere opwerking zijn de disks bewaard bij -18°C . Elutie van de disks vond plaats met acetonitril. Na indamping van het acetonitrilextract en opname in 200 μl mobiele fase gefractioneerd over een C_{18} ODS2 HPLC kolom van Water (150x4,6 mm) uitgerust met een guard kolom. De mobiele fase was 65% methanol, de flowsnelheid 1 ml/min. Oestriol, mestranol en de andere hormonen elueerden in drie gescheiden fracties, maar werden na de fractionering weer ingedampt en vervolgens gederiviseerd met een silyleringsreagens. De overmaat silyleringsreagens werd na voltooiing van de derivatisering weggedampt. Het residu werd opgenomen in hexaan, dat de injectiestandaard PCB103 bevatte. Om de laatste restanten silyleringsreagens te verwijderen werd het extract nog eenmaal gewassen met water. De hexaanfase werd via een Na_2SO_4 kolom in een GC-vial overgebracht en ingedampt tot een volume van 100 μl , gereed voor injectie op de GC-ITD. Deze opwerkingsmethode is – op kleine aanpassingen na – ook gebruikt in het LOES-project (Baronti et al., 2000).

De extracten zijn geanalyseerd op een Varian 3800 GC in combinatie met een Saturn 2000 ITD. Van het extract werd 3 μl cold-splitless geïnjecteerd met een CIS3 injector voorzien van een Siltek liner. De GC-kolom was een 30 m CP-SIL 8 CB low bleed MS kolom van Varian, met een interne diameter van 0,25 mm en een filmdikte d_f van 0,25 μm . Er is een Siltek retention gap gebruikt van 1 m en een interne diameter van 0,53 mm. Het temperatuurprogramma was als volgt: start bij 60°C gedurende 1 minuut, toenemend met $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ naar 220°C , daarna met $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ naar 280°C en $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ naar 300°C .

Voor de kwantificering is gebruik gemaakt van de gemiddelde responsfactor van interne standaard E2-d4 in een ijklijn met 6 punten. Er is gecorrigeerd voor de recovery van de gedeutereerde standaard. HPLC-water is als blanco meegenomen, en als controle een met alle te bepalen hormonen gespiked HPLC-water.

Sediment

De sedimentmonsters zijn gezeefd over 2 mm, waarna droging aan de lucht heeft plaatsgevonden gedurende enkele dagen. De gedroogde monsters zijn gehomogeniseerd door kogelmolenvermaling. Van de monsters waarvan voldoende droogmateriaal voorhanden was is ongeveer 20 gram ingewogen.

Aan de monsters is E2-d4 toegevoegd als interne standaard. Het spikingsniveau bedroeg 2 ng/g. Als blanco is 10 gram gewassen zeezand (SETOC 701) gebruikt. Extractie vond plaats met dichloormethaan/acetone 3/1 (v/v) bij een temperatuur van 50°C , een druk van

2000 psi en in 3 cycli (Baronti et al., 2000). De extracten zijn ingedampt voor opzuivering met behulp van gelpermeatiechromatografie.

Het gebruikte gelpermeatiechromatografiesysteem (GPC) is al eerder gevalideerd (Baronti et al., 2000). Het bestaat uit twee gekoppelde Pl-gel 10 μm , 50Å, 300x25 mm GPC-kolommen (Polymer Laboratories), uitgerust met een injectieloop van 2 ml.

Vanwege de zeer donkere kleur en de aanwezigheid van vaste substantie in de met ASE verkregen extracten zijn de monsters uit de Vlietpolder in twee of drie keer op de GPC geïnjecteerd, waarbij de vial is nagespoeld met 0,5 ml dichloormethaan. Als eluens is dichloormethaan gebruikt met een flowsnelheid van 10 ml/min.

Vanwege de zeer slechte verkregen recovery van de interne standaard bij het monster Lage Raam is bij de tweede opwerking geen gebruik meer gemaakt van GPC maar met behulp van gecombineerde C₁₈/NH₂ cartridges. Na ASE is het extract bijna drooggedampt en opgenomen in 5 ml 0,2 M NaAc buffer pH 5,5 en over de cartridges gebracht. Ook genoemde Vlietpoldermonsters zijn op deze wijze bewerkt, maar deze hebben wel een eerste opzuivering met behulp van GPC ondergaan.

Alle extracten van sedimentmonsters zijn gefractioneerd met behulp van HPLC overeenkomstig de watermonsters.

4.2.3 Diergeneesmiddelen

De analyses van diergeneesmiddelen in water en sediment zijn uitgevoerd door het RIZA-laboratorium. Het betreft de analyse van de volgende geselecteerde diergeneesmiddelen: oxytetracycline, α - en β -apo-oxytetracycline, sulfamethoxazole, amoxicilline, doxycycline, trimethoprim en tylosine. Omdat er geen standaardanalysemethoden voor diergeneesmiddelen in milieumonsters beschikbaar zijn, zijn deze voor de geselecteerde stoffen in oppervlaktewater en sediment binnen dit project door het RIZA-laboratorium ontwikkeld. Hierbij is gebruik gemaakt van een zogenaamd 'experimental design', dat het mogelijk maakt om naar een methode te zoeken die het meest optimale resultaat geeft voor alle geselecteerde stoffen. Gelet op het verkennende karakter van dit onderzoek en de beperkte omvang was het niet efficiënt om een methodeoptimalisatie per stof uit te voeren.

Aan de hand van de beschikbare literatuur zijn kansrijke extractiemethoden geselecteerd die als basis hebben gediend voor de methodeontwikkeling. De analyses zijn uitgevoerd met LC-MS/MS.

Water

Gelet op de grote overlap in geselecteerde stoffen (tetracyclines en sulfonamides) is er voor gekozen om de methodeontwikkeling voor oppervlaktewater te baseren op de in de literatuur beschreven analysemethode van Lindsey et al. (2001). Hierbij zijn de volgende parameters uitgetest: het aanzuren van het monster, het toevoegen van EDTA en het SPE-materiaal.

Het aanzuren van het monster werd nodig geacht om de extractie-efficiëntie van de zwak zure sulfonamides te verbeteren, terwijl voor neutrale stoffen geen nadelig effect werd verwacht ten aanzien van de recovery.

Lindsey et al. (2001) maken melding van het gebruik van EDTA om metalen te complexeren die de extractie van de tetracyclines bemoeilijken. De tetracyclines vormen geladen complexen met vrij opgeloste metalen die niet met C18-SPE materiaal kunnen worden geëxtraheerd.

Door twee SPE-kolommaterialen (Oasis-HLB en ENVI) te testen is nagegaan of de methode uitgebreid kon worden tot de hele groep geselecteerde stoffen. Oasis-HLB heeft een brede toepasbaarheid en is in het verleden ook gebruikt voor de extractie van geneesmiddelen uit oppervlaktewater. ENVI heeft als praktisch voordeel dat de SPE-deeltjes groter zijn waardoor het minder last heeft van zwevend stof in monsters.

De uitvoering van de 'experimental designs' valt buiten het blikveld van dit rapport. Het verkregen resultaat was dat het beste gebruik kon worden gemaakt van aanzuren met 40 µg/l H₂SO₄, 0,5 g EDTA en ENVI-SPE materiaal. Dit heeft geresulteerd in de volgende analysemethode:

De monsters werden binnen 36 uur na monsternamen in het laboratorium ingevroren (-20°C) ter conservering. Voor de analyse werd een monsterfles ontdooid. Aan 200 ml monster werd 40 µl geconcentreerd zwavelzuur (H₂SO₄) en 0,5 g ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) toegevoegd. Een ENVI Chrom P (200 mg) SPE kolom werd geconditioneerd met 5 ml methanol en 5 ml Milli-Q water. Vervolgens werd het monster geconcentreerd op de SPE-kolom met een flowsnelheid van 10 ml/min en werd de kolom gedroogd door gedurende vijf minuten lucht door te zuigen. De kolom werd geëluëerd met 3 ml methanol. Dit extract werd ingedampt tot ongeveer 0,5 ml met een stikstofstroom bij 50°C en daarna opgenomen in 0,5 ml water/methanol (90/10). Van dit extract werd 20 µl geïnjecteerd op het HPLC/MS/MS systeem.

Sediment

De methodeontwikkeling voor de geselecteerde diergeneesmiddelen in sediment is opgezet aan de hand van de artikelen van Christian et al. (2003) en Jacobsen et al. (2004). Christian et al. beschrijven een vrij algemene extractie met minimale manipulatie van het extract. Daarentegen gebruiken Jacobsen et al. een uitgebreide clean up en concentratiestap na extractie. Zij rapporteren een redelijke recovery van doelstoffen (inclusief oxytetracycline) aan gespiked sediment.

Christian et al. maken gebruik van ASE-extractie voor bodemmonsters (10 g nat) met een methanol/water-mengsel (80/20 v/v). De ASE wordt gebruikt bij een temperatuur van 100°C bij een druk van 140 bar (2030 psi). Het verkregen extract werd vervolgens middels een Rotavap ontdaan van methanol waarna het waterige extract over een 45 µm filter werd geleid. Jacobsen et al. maken ook gebruik van een ASE-extractie voor bodemmonsters (10 g nat) met een methanol/0,2 M citraat-mengsel (50/50 v/v) (pH = 4,7). Zij voerden de extractie uit bij kamertemperatuur (25°C) en een druk van 1500 psi (103 bar). Vervolgens werd het extract verdund met 0,2 M citraatoplossing tot 10% methanol. Een tandem clean up werd daarna uitgevoerd met een ionenwisselaarkolom (SAX) en een SPE-kolom (Oasis HLB). De doelstoffen werden vervolgens met 2 ml methanol van de Oasis HLB-kolom geëluëerd.

Op basis van de hierboven beschreven methoden werden een viertal parameters gedefinieerd die binnen het experimental design werden geoptimaliseerd, te weten; de ASE-temperatuur, het ASE-extractiemiddel, de clean up/concentratie stap en het gebruik van EDTA.

De uitvoering van de experimental designs valt buiten het blikveld van dit rapport. Hieruit bleek dat het beste gebruik gemaakt kon worden van extractie bij 25°C met methanol/citraat-oplossing, zonder toevoeging van EDTA en een clean up met ENVI SPE-materiaal. Dit heeft geresulteerd in de volgende analysemethode:

Van het natte sedimentmonster werd 10 gram door middel van Pressurized Liquid Extraction (PLE) en Accelerated Solvent Extractor (ASE, Dionex, Nederland) geëxtraheerd in 2 cycli gebruik makend van 33 ml cellen, met methanol/0,2 M citraat buffer (pH = 4,7) (50/50) als extractant, bij 25 °C, 100 bar, een preheat tijd van 1 min, en een statische extractie tijd van 10 min, een flush van 90% en purge tijd van 120 s. Extractie van natte monsters met PLE is vrij kritisch omdat makkelijk verstopping in het apparaat kan optreden. Een goede werkwijze was om de cellen te vullen met 2 cellulosefilters (Whatman, 19,8 mm Dionex), 5 g volledig gedeactiveerd Aluminiumoxide (KN Alumina B, ICN, Nederland), vervolgens het gehomogeniseerde mengsel van 10 g nat sediment en 35 g glas parels (2 mm Diameter), en de cel op te vullen met glaspereels. Het PLE-extract (ongeveer 30 ml) werd verdund tot 150 ml met Milli-Q water en de pH wordt op pH=7 gesteld met 4 M Natriumhydroxide-oplossing. Clean-up en concentratie van het verdunde extract werd uitgevoerd met een 250 mg ENVI-Chrom P cartridge. De cartridge werd geëluëerd met 4 ml methanol. Dit eluaat werd geconcentreerd met een stikstofstroom tot ongeveer 0,5 ml en opgenomen in 0,5 ml water/methanol (90/10). Van dit extract werd 20 µl geïnjecteerd op het HPLC/MS/MS systeem.

Antibioticaresistentiegenen

Het meten van resistentieontwikkeling van bacteriën wordt uitgevoerd als een indicator voor directe of indirecte beïnvloeding van het water en sediment door antibiotica. Oppervlaktewater en sediment van de meeste bemonsteringslocaties zijn getoetst op resistentieontwikkeling door het meten van oxytetracycline- en sulfonamideresistentiegenen. Voor het aantonen van de resistentiegenen werd de Polymerase Chain Reaction (PCR) methode gebruikt. Deze PCR-methode is in staat om uit kleine hoeveelheden DNA specifiek één of meer gedeeltes te vermenigvuldigen tot er genoeg van is om het te analyseren. De specificiteit van de PCR-reactie komt tot stand door het gebruik van zogenaamde 'primers', korte stukken DNA die alleen de gezochte resistentiegenen complementeren. Hier werd gebruik gemaakt van primers die eerder door andere onderzoekers ontwikkeld werden. Van alle bekende tetracyclineresistentiegenen (>30) werden voor dit onderzoek alleen de zeven primersets voor tetracyclineresistentiegenen gekozen die veelvuldig gerapporteerd zijn in de openbare literatuur; te weten *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(J)*, *tet(O)*, *tet(S)*, en *tet(W)*. Voor sulfonamideresistentie op plasmides werden alle drie bekende primersets voor sulfonamideresistentiegenen (*sul1*, *sul2* en *sul3*) meegenomen.

De bepaling van resistentiegenen in complexe milieumonsters berust op het specifiek aantonen van korte stukken DNA, die voor de gezochte resistentiegenen coderen. Daarvoor moet eerst DNA uit de milieumonsters worden geëxtraheerd en vervolgens door middel van de PCR het gezochte gen vermenigvuldigd en gedetecteerd worden.

Om DNA te extraheren, werden de monsters geschud en met reagentia behandeld die celwanden van de bacteriën beschadigen. Andere celbestanddelen werden afgescheiden en het DNA werd in de overblijvende oplossing door middel van silicakolommetjes gezuiverd. Opwerken (zuiveren) is in het bijzonder voor bodem- en sedimentmonsters nodig, omdat anders humuszuren die mede geëxtraheerd zijn de PCR reacties kunnen remmen. Uiteindelijk werd de DNA-concentratie in de extracten bepaald nadat deze in gelijke verdunningen waren gebracht.

De gevoeligheid van de PCR-reactie berust op het feit dat de gezochte DNA-stukjes exponentieel vermenigvuldigd worden. Ze kunnen na de reactie met gel-electroforese aangetoond worden.

Om de kwaliteit van de metingen te waarborgen, werden de volgende maatregelen in acht genomen:

- PCR-controles: gebruik van positieve controles die bekende hoeveelheden DNA van stammen met het resistentiegen bevatten, en gebruik van negatieve controles;
- Extractiecontrole: aan een (DNA-vrij) sedimentmonster werden bekende hoeveelheden resistentiegen-DNA toegevoegd en gekeken of de genen met PCR aangetoond konden worden;
- DNA-extractie en PCR werden in tweevoud uitgevoerd.

Uit de resultaten bleek dat de PCR de verwachte sensitiviteit had en dat toegevoegd DNA in de meeste monsters met de verwachte gevoeligheid aangetoond kon worden. Voor sommige genen was de gevoeligheid van de PCR-bepalingen iets minder, maar toch voldoende om resistentie aan te kunnen aantonen mits deze in tenminste 0,1% van de bacteriën optrad. Er was meestal een goede overeenstemming van de duplobepalingen.

4.3 Biologische effectmetingen

De biologische effectmetingen kunnen worden onderverdeeld in metingen naar oestrogene potentie met behulp van de in vitro biologische testmethode ER-CALUX[®], en het daadwerkelijk aantonen van oestrogene effecten bij vissen in het veld in gebieden met (intensieve) veehouderij.

4.3.1 ER-CALUX

De ER-CALUX[®]-bioassay maakt gebruik van humane borst carcinoma (T47D) cellen die stabiel getransfecteerd zijn met een plasmide dat het ERE-gen van het vuurvliegje (*Photinus pyralis*) bevat als reporter gen voor de aanwezigheid van oestrogene stoffen. Wanneer oestrogene stoffen aan de cellen worden aangeboden zullen deze de celwand passeren, binden

aan de humane ER-receptor, deze activeren, waarna binding aan de ERE-gen optreedt. Als gevolg hiervan wordt er in de cel een hoeveelheid luciferase gevormd. Dit enzym is in staat het aan de celinhoud toegevoegde luciferine te oxideren, waarbij licht vrijkomt. Deze hoeveelheid vrijgekomen licht is rechtstreeks een maat voor de oestrogene potentie van het aangeboden milieumonster. De ER-CALUX[®]-bioassay vergelijkt deze activatie van de oestrogeenreceptor met die van 17 β -oestradiol die als referentie wordt gebruikt. De uiteindelijke oestrogene activiteit wordt uitgedrukt als 17 β -oestradiol equivalenten (EEQ's). De ER-CALUX[®]-bioassay is uitgevoerd met extracten die bereid zijn voor de chemische analyse van de natuurlijke hormonen. Voor gebruik in de ER-CALUX kan een aantal opzuiveringsstappen, die nodig zijn bij de chemische analyses van hormonen, achterwege blijven. De extracten zijn bij 4°C bewaard totdat verdere verwerking bij BioDetection Systems plaatsvond. Voor gebruik zijn de extracten overgebracht naar DMSO; in 50 μ l DMSO voor de waterextracten en 100 μ l voor de sedimentextracten. Van alle extracten zijn verdunningen gemaakt in DMSO, welke vervolgens in drievoud zijn getest in de ER-CALUX[®]-bioassay.

4.3.2 Vitellogeninemetingen in brasems

In navolging van het LOES-onderzoek en het aantonen van oestrogene effecten in vissen in regionale wateren (Vethaak et al. 2002) zijn in dit verkennend onderzoek op een aantal locaties in gebieden met (intensieve) veehouderij brasems weggevangen. Van deze brasems zijn algemene viskarakteristieken bepaald. In het bloedplasma van de mannelijke brasems zijn vitellogenine(VTG)-bepalingen uitgevoerd.

AquaSense heeft dit veldonderzoek uitgevoerd, waarbij Aquaterra was ingehuurd voor het daadwerkelijk wegvangen van de vissen. Voor elke locatie is contact opgenomen met de lokale waterbeheerder en de visrechtgebende. Verder is dit onderzoek als dierproef (Wet op de Dierproeven) gekwalificeerd en is goedkeuring hiervoor verleend door de Dier Experimenten Commissie.

Veldwerk

Er is naar gestreefd om per locatie tenminste 20 mannelijke brasems te vangen. Er werd vermoed dat op het oog slechts beperkt onderscheid te maken zou zijn tussen mannelijke en vrouwelijke brasems omdat naar verwachting slechts een klein deel van mannelijke brasem in november paaiuitslag heeft. Om te voorkomen dat er selectief gevist zou worden op mannetjes met paaiuitslag (en daarmee de mannetjes zonder paaiuitslag worden gemist) zijn - indien aanwezig - tenminste 40 brasems van minimaal 30 cm lengte opgevisst. Als vangstmethoden zijn een zegen, kieuwnetten en elektrische vismethoden toegepast.

Alle gevangen brasems zijn in een beluchte vistank levend in het laboratorium van AquaSense afgeleverd.

De gevangen brasems zijn allereerst verdoofd met MS222 waarna de sekse bepaald werd. Van de vrouwelijke brasems is uitsluitend de totale lengte, de vorklengte en het totale lichaamsgewicht gemeten. Van de mannelijke brasems is genoteerd of ze wel of geen paaiuitslag hadden en zijn daarna uitgebreider onderzocht. Van de mannelijke brasems is

bloed afgenomen en na centrifuge zijn de bloedplasmapreparaten bij -80°C bewaard ten behoeve van VTG-metingen. De gonaden (geslachtsorganen) en lever zijn geprepareerd voor verdere gewichtsbepaling. De gonaden zijn geconserveerd in 4% formaline voor eventueel nog later uit te voeren histologisch onderzoek. Het somatisch lichaamsgewicht, zijnde het totaalgewicht minus gewicht organen in buikholte, is vastgesteld. De leeftijd is bepaald aan de hand 4 tot 6 getrokken schubben per vis.

Verder zijn de gonadosomatische index (GSI) en heptosomatische index (HSI) berekend. De GSI is het gewicht van de gonaden gedeeld door het totaal gewicht $\times 100\%$. Een hoge GSI is een indicatie voor een verhoogde reproductieve activiteit. De HSI is het gewicht van de lever gedeeld door het totaal gewicht $\times 100\%$. Een hoge HSI kan duiden op een goede voedingsstatus, maar kan ook een teken zijn van verhoogde leveractiviteit door blootstelling aan organische microverontreinigingen.

De conditiefactor is uitgerekend volgens Gerritsen et al. (2003).

Vitellogenineanalyse

VTG is de voorloper van dooiereiwit en wordt normaliter alleen door vrouwelijke vissen in grote hoeveelheden geproduceerd. Na synthese in de lever komt het via de bloedbaan in de gonade terecht, waar het wordt omgezet in onder andere vitelline. Onder invloed van stoffen met een vervrouwelijkende werking kan echter ook in mannelijke vissen VTG gevormd worden. In mannetjes hoopt het eiwit zich op in het bloed. De aanwezigheid van VTG in het bloedplasma van mannelijke vissen is een aanwijzing voor recente blootstelling aan stoffen met een vervrouwelijkende (oestrogene) werking en kan daarom als biomarker worden gebruikt.

Voor het meten van vitellogenine in het bloedplasma van vissen wordt gebruik gemaakt van een indirecte, competitieve 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'. Deze assay maakt gebruik van een immunologische reactie van vitellogenine met een anti-VTG antilichaam. Middels toevoeging van een secundair antilichaam wordt een kleuring verkregen die met behulp van een fluorescentiemeter wordt gekwantificeerd. De analyses worden uitgevoerd in 96-wells microtiter platen, waarbij elk monster in duplo op dezelfde 96-wells plaat wordt getest. Een meer gedetailleerde beschrijving van de VTG-meting wordt gegeven in het deelrapport van AquaSense (Derksen et al. 2004) en het LOES-rapport (Vethaak et al., 2002).

5. Resultaten

5.1 Hormonen

5.1.1 Kwaliteitscontrole

Voor de watermonsters is als blanco HPLC-water gebruikt. In de meetserie zijn ‘gespikede’ watermonsters (HPLC-water) met alle te bepalen hormonen meegenomen ter beoordeling van de prestaties van de analysemethode in de betreffende meetserie. In Tabel 5.1 zijn de resultaten weergegeven van de recoveries van de hormonen uit deze ‘gespikede’ HPLC-watermonsters.

De recoveries van de hormonen zijn goed te noemen. De spreiding in de recovery van oestron, 17α -ethinyloestradiol en mestranol is met respectievelijk 27%, 25% en 35% weliswaar aan de hoge kant. De recoveries voor oestron en 17α -ethinyloestradiol zijn soms zeer hoog (tot 173%) of voor mestranol soms zeer laag (tot 24%). Deze hoge recoveries zijn waarschijnlijk te wijten aan ongecontroleerde fragmentatie van het moederion in de iontrap. Deze problemen treden niet alleen op bij de analyse van extracten van echte monsters, maar ook bij injectie van een zuivere standaard. Dit duidt erop dat het probleem inherent is aan de eigenschappen van de stof zelf en dat monstersamenstelling er geen invloed op heeft.

Als blanco voor de sedimentbepalingen is gewassen zeezand (SETOC 701) gebruikt. Aan alle waterbodemmonsters is de gedeutereerde interne standaard E2-d4 toegevoegd. Het spikingsniveau bedroeg 2 ng/g. De recoveries zijn weergegeven in Tabel 5.2. Het waterbodemmonster Lage Raam is op basis van de slechte recovery (3%) opnieuw geanalyseerd, maar ook de recovery van de tweede meting was opnieuw laag (10%). Er is geen duidelijke verklaring voor deze lage recoveries voor deze monsters. Voor de bepaling van de gemiddelde recovery is deze meting buiten beschouwing gelaten.

De gemiddelde recovery van E2-d4 is 69% met een spreiding van 50%. Dit wordt veroorzaakt door de ingewikkelde monstervoorbewerking en -analyse, maar ook door het relatief lage niveau waarop de monsters gespiked waren met de gedeutereerde interne standaard (2 ng/g).

Tabel 5.1 Recoveries van de hormonen uit ‘gespikede’ watermonsters.

parameter	najaar 2004 (%)	Spreiding RSD (%)	aantal metingen (n)	voorjaar 2005 (%)	
17α -oestradiol	107	7	9	94	82
oestron	173	27	8	98	96
17β -oestradiol	70	14	9	96	106
oestriol	125	9	3	99	88
17α -ethinyloestradiol	103	25	8	140	173
mestranol	24	35	8		

Tabel 5.2 Recoveries van de hormonen uit 'gespikede' waterbodemmonsters.

monster	recovery E2-d4 (%)
blanco	53
gespiked SETOC 701	59
Vlietpolder poldersloot	32
Vlietpolder uitlaatwater	78
Hoge Raam	132
Lage Raam*	10
Oldebroekertocht	58

* Niet meegenomen in de bepaling van gemiddelde en spreiding.

5.1.2 Meetresultaten water

In Tabel 5.3 zijn de resultaten weergegeven van de analyse van de hormonen en algemene parameters in de oppervlaktewatermonsters van najaar 2004. Behalve in de monsters uit de Vlietpolder liggen de hormoongehalten onder de detectielimiet. De detectielimieten (LOD) worden vastgesteld als driemaal de ruis in het chromatogram in het tijdsvenster waar ook de te analyseren stoffen elueren. Voor alle hormonen was deze 0,5-0,6 ng/l.

De gehalten aan 17 α - en β -oestradiol, oestron en 17 α -ethinyloestradiol in de Vlietpolder waren zeer hoog. Dergelijke hoge hormoongehalten worden doorgaans niet aangetroffen in oppervlaktewater. Voor poldersloten zijn in het LOES-onderzoek geen hogere hormoongehalten dan 2,8 ng/l aangetroffen. Deze resultaten riepen daarom vraagtekens op. Dit synthetische oestrogene hormoon wordt geassocieerd met humaan gebruik in de anticonceptiepillen. Het gebruik hiervan in de (intensieve) veehouderij bij melkkoeien is niet bekend. Door Casey et al. (2003) is in studies naar de degradatie van natuurlijke en synthetische hormonen waargenomen dat mestranol voor een klein deel wordt omgezet in 17 α -ethinyloestradiol. Omdat gebruik van mestranol slechts een humane toepassing kent, de omzetting niet volledig is, en het mestranolgehalte onder de detectiegrens ligt, is dit ook geen afdoende verklaring voor de hoge concentraties 17 α -ethinyloestradiol in de Vlietpolder.

Zodra deze hoge hormoongehalten bekend waren is in december 2004 het uitlaatwater van de Vlietpolder opnieuw bemonsterd. Hierin waren de gehalten van de hormonen lager dan de detectielimieten; 17 α -oestradiol (<0,5 ng/l), oestron (<1,6 ng/l), β -oestradiol (<1 ng/l), oestriol en 17 α -ethinyloestradiol (<1,0 ng/l).

In 2005 zijn de reservewatermonsters van de Vlietpolder van najaar 2004, waarin bovenstaande significante hormoongehalten zijn aangetoond en die bij -18 °C zijn bewaard, gemengd en opnieuw geanalyseerd. Opmerkelijk is dat bij de heranalyse van deze monsters in het geheel geen hormonen worden teruggevonden. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat de hormonen toch degradatie ondergaan. De houdbaarheid van watermonsters met concentraties van hormonen in het lage ng/l gebied bij -18 °C is bij het IVM-laboratorium gedurende een zodanig lange periode nooit onderzocht. Afbraak kan, ondanks de lage temperatuur, niet uitgesloten worden. Ook zijn de extracten van de eerste serie

Tabel 5.3 Gehalten hormonen en algemene parameters in oppervlaktewater (najaar 2004)

Monsterlocatie	poldersloot Vlietpolder	uitlaatwater Vlietpolder	Hoge Raam	Lage Raam	Oldebroeker- tocht
<i>Hormonen</i>					
17 α -oestradiol (ng/l)	45	51	<0,5	<0,6	<0,5
oestron (ng/l)	13	25	<0,5	<0,6	<0,5
17 β -oestradiol (ng/l)	43	50	<0,5	<0,6	<0,5
oestriol (ng/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,6	<0,5
17 α -ethinyloestradiol (ng/l)	24	49	<0,5	<0,6	<0,5
mestranol (ng/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,6	<0,5
<i>Algemene parameters</i>					
pH	7,0	7,3	6,7	6,7	7,1
geleidbaarheid (mS/m)	100	100	61	66	73
chloride (mg/l)	118	117	36,3	27,6	45
stikstof Kjeldahl (mg/l)	4,8	4,3	1,5	1,3	1,0
nitriet (mg/l)	0,02	0,03	0,04	0,03	0,04
nitraat (mg/l)	0,11	0,20	1,76	2,98	0,84
onopgeloste bestanddelen (mg/l)	36	20	12	8,2	3,2
koper (μ g/l)	5	3	2	3	< 5
zink (μ g/l)	20	< 9	< 9	< 9	< 5
borium (μ g/l)	190	230	120	94	53
<i>Bacteriologische kwaliteit</i>					
Thermotol. Bact. v/d Coligr. (per 100 ml)	370	100	100		< 20
Escherichia coli (per 100 ml)	249	77	61	260	30
Intestinale Enterococcen (per 100 ml)	32	10	22	22	< 10

Vlietpoldermonsters najaar 2004 opnieuw geanalyseerd, onder andere na nogmaals deze extracten gederivatiseerd te hebben. Directe heranalyse en heranalyse na opnieuw gederivatiseerd te hebben, geven hormoongehalten te zien die in dezelfde orde van grootte liggen als bij de eerste analyse van de Vlietpoldermonsters. Schommelingen in de exacte concentraties kunnen worden toegeschreven aan afbraak van de derivaten tijdens de opslag en kleine verschillen in de efficiency van de derivatisering. Een andere verklaring is dat de monstersamenstelling invloed heeft gehad op het analyseresultaat. Een aantal dagen voor monsternamen zijn de poldersloten uitgebaggerd en op de kant gezet. Veel fijnverdeeld en humusachtig materiaal was in het oppervlaktewater aanwezig.

In Tabel 5.4 zijn de resultaten weergegeven van de analyse van de monsters Vlietpolder poldersloot en uitlaatwater verkregen in 2004, van het bij -18 °C bewaarde watermonster poldersloot, van de heranalyse van de extracten en na nogmaals te gederivatiseerd te hebben. De monsterextracten en de (gederivatiseerde) standaarden zijn naar het RIVM toegestuurd om een onafhankelijke heranalyse uit te voeren. In de IVM-monsterextracten uit 2004 konden

Tabel 5.4 *Hormoonanalyses van de watermonsters poldersloot en uitlaatwater Vlietpolder (najaar 2004).*

hormonen	sloot (ng/l)	uitlaat (ng/l)	mix van sloot en uitlaat (ng/l)	sloot (ng/l)	uitlaat (ng/l)	sloot (ng/l)	uitlaat (ng/l)
monster	1 ^e analyse		reservemonster bij - 18°C	heranalyse van extract		heranalyse van extract met extra derivatisering	
17 α -oestradiol	45	51	<2,6	34	48	60	48
oestron	13	25	<2,6	15	20	34	15
17 β -oestradiol	43	50	<1,7	20	35	50	34
oestriol	<0,5	<0,5	<1,7				
17 α -ethinyloestradiol	24	49	<3,4	21	20	30	19
mestranol	<0,5	<0,5					

oestron, 17 α - en 17 β -oestradiol door het RIVM goed worden aangetoond en bevestigd. Voor 17 α -ethinyloestradiol bleek het iets anders te liggen en kon de identiteit van deze stof niet door het RIVM worden bevestigd. In de met sil-A gederiviseerde standaard van IVM is op de vier door het RIVM geselecteerde m/z-waarden voor 17 α -ethinyloestradiol een signaal waargenomen. De retentietijd is identiek aan de retentietijd van ethinyloestradiol-di-tms van de RIVM-standaard. De ratio's van de m/z-waarden wijken evenwel af van de ratio's van de RIVM-standaarden. Dit heeft gevolgen voor de identificatie van 17 α -ethinyloestradiol in de monsterextracten. Hierin wordt weliswaar een signaal voor 17 α -ethinyloestradiol waargenomen op (bijna) alle 4 de m/z-waarden bij de correcte retentietijd. De ratio's kwamen goed overeen met die van de IVM gederiviseerde standaard, maar verschilden voor die van de RIVM-standaard. Hierdoor kon de identiteit niet worden bevestigd door het RIVM.

Hierna zijn door RIVM-ARO in samenwerking met IVM nog aanvullende experimenten uitgevoerd ter identificatie van 17 α -ethinyloestradiol. De ongederiviseerde IVM-standaard is gederiviseerd conform de RIVM-methode met BSTFA++ en vergeleken met de standaard van het RIVM. Voor 17 α - en 17 β -oestradiol, gemeten als di-tms derivaten kwamen deze overeen. De kwantitatieve resultaten, retentietijden en ratio's waren ook identiek. Voor 17 α -ethinyloestradiol, gemeten als mono-tms derivaat was de correlatie ook bijna 100%. De conclusie was dan ook dat de door IVM aan het RIVM gezonden ongederiviseerde standaard identiek is aan de RIVM-standaard. De enige variabele in het geheel was nog de derivatiseringsstap in de analyse. De watermonsters van IVM worden gederiviseerd met sil-A terwijl het RIVM de derivatiseringsstap uitvoert met MSTFA++. Van de reservemonsters Vlietpolder najaar 2004 was na de uitgevoerde heranalyses niet genoeg monstermateriaal meer over om dit monster ook nog op te werken en te analyseren conform de RIVM-derivatiseringsstap.

In Tabel 5.5 en 5.6 zijn de resultaten weergegeven van de analyse van de hormonen en algemene parameters in de oppervlaktewatermonsters van voorjaar 2005. In tegenstelling tot bij de monsternamperiodes van najaar 2004, is slechts eenmalig een verhoogde concentratie oestron aangetroffen. In het monster bij het melkveebedrijf op kleigrond is in het water van de greppel, waarop de drains uitmonden, een oestrongehalte van 22 ng/l gemeten. In het

Tabel 5.5 Gehalten hormonen en algemene parameters in oppervlaktewater Vlietpolder (voorjaar 2005).

Monsterlocatie	uitlaatwater Vlietpolder 14-03-2005	poldersloot Vlietpolder 08-04-2005	uitlaatwater Vlietpolder 08-04-2005	poldersloot Vlietpolder week 14	uitlaatwater Vlietpolder week 14
Hormonen					
17 α -oestradiol (ng/l)	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
oestron (ng/l)	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
17 β -oestradiol (ng/l)	<1	<1	<1	<1	<1
oestriol (ng/l)	<1	<1	<1	<1	<1
17 α -ethinyloestradiol (ng/l)	<2,1	<2	<2	<2	<2
Algemene parameters					
PH		9,0	8,2		
geleidbaarheid (mS/m)		109	107		
chloride (mg/l)		120	120		
stikstof Kjeldahl (mg/l)		3,5	5,3		
nitriet (mg/l)					
nitraat (mg/l)		0,07	0,09		
fosfaat-opgelost (mg/l)		1,1	0,08		
fosfaat-totaal (mg/l)		1,3	0,32		
onopgeloste bestanddelen (mg/l)		4,9	21		
koper (μ g/l)		<1	3		
zink (μ g/l)		<5	6		
borium (μ g/l)		410	300		
Bacteriologische kwaliteit					
Escherichia coli (per 100 ml)		0	30		
Intestinale Enterococcen (per 100 ml)		0	15		

slootwater waarop het greppelwater werd geloosd was oestron door verdunning al niet meer aantoonbaar. Ook in de diverse watermonsters van de Vlietpolder, zowel poldersloot als uitlaatwater, lagen de gehalten hormonen onder de detectiegrens. De detectielimieten varieerden van 0,5-1,6 ng/l. Voor 17 α -ethinyloestradiol werden iets hogere detectielimieten (1,7-2,9 ng/l) gevonden. Over het algemeen zijn de detectielimieten van voorjaar 2005 allemaal wat hoger dan die in najaar 2004. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat de watermonsters meer zwevend materiaal bevatten doordat monsternamen dicht bij het landbouwperceel heeft plaatsgevonden. Daarentegen waren de watermonsters uit de Vlietpolder vergelijkbaar in beide meetperioden.

5.1.3 Meetresultaten sediment

De resultaten van de hormoonbepalingen in de sedimentmonsters in najaar 2004 zijn weergegeven in Tabel 5.7. De detectielimieten voor de hormonen varieerden afhankelijk van de monsterlocatie tussen de 0,02 en 0,05 μ g/kg ds.

Oestron wordt in alle sedimentmonsters aangetroffen in de range van 0,1-7,8 μ g/kg ds. De hoogste concentraties zijn gemeten in de sedimentmonsters uit de Vlietpolder, waar naast oestron ook 17 α - en 17 β -oestradiol worden aangetroffen. Voor het monster poldersloot waren de concentraties respectievelijk 0,3 en 0,5 μ g/kg ds; voor het uitlaatwater 0,1 en 0,3 μ g/kg ds.

Tabel 5.6 Gehalten hormonen en algemene parameters in oppervlaktewater van overige locaties (voorjaar 2005).

Monsterlocatie	Rusvensche loop	Graspeel-loop	greppel Waarden-burg	proefsloot Waarden-burg	Dedems-vaart	Naarder-meer
Hormonen						
17 α -oestradiol (ng/l)	<1,5	<1,5	<2,2	<1,6	<1,5	<0,8
oestron (ng/l)	<1,5	<1,5	21,8	<1,6	<1,5	<2
17 β -oestradiol (ng/l)	<1	<1	<1,5	<1,1	<1	<0,5
oestriol (ng/l)	<1	<1	<1,5	<1,1	<1	<1
17 α -ethinyloestradiol (ng/l)	<2	<2	<2,9	<2,1	<2	<1,7
Algemene parameters						
pH	6,1	6,4	7,7	8,2	6,2	6,2
geleidbaarheid (mS/m)	50	50	34	82	47	31
chloride (mg/l)	36	35	36	82	39	60
stikstof Kjeldahl (mg/l)	1,6	1,4	6,6	2,8	4,3	1,5
nitriet (mg/l)						
nitraat (mg/l)	5,2	4,4	13	0,05	<0,05	<0,05
fosfaat-opgelost (mg/l)	<0,05	<0,05	0,06	0,76	0,28	<0,05
fosfaat-totaal (mg/l)	0,10	0,08	0,79	0,93	0,47	0,15
Onopgel. bestandd. (mg/l)	20	7,0	442	27	19	5
koper (μ g/l)	7	7	35	4	2	<1
zink (μ g/l)	100	34	59	<5	9	6
borium (μ g/l)	34	40	68	82	35	47
Bacteriologische kwaliteit						
Escherichia coli (per 100 ml)	940	920			85	
Intestinale Enterococcen (per 100 ml)	4100	310			150	

Het voorkomen van vergelijkbare gehalten aan 17 β -oestradiol en oestron in sediment is ook in de literatuur beschreven (Casey et al., 2003). Deze verhoogde hormoongehalten in de Vlietpolder zijn consistent met de gevonden hoge waterconcentraties. Alleen 17 α -ethinyloestradiol wordt ondanks de hoge waterconcentraties, niet teruggevonden in het sediment. Dit is opmerkelijk omdat 17 α -ethinyloestradiol doorgaans beter aan sediment adsorbeert dan de overige natuurlijke hormonen.

In het voorjaar 2005 zijn geen hormoonanalyses in sedimentmonsters uitgevoerd.

Tabel 5.7 Hormoongehalten in sedimentmonsters (najaar 2004).

Monsterlocatie	poldersloot Vlietpolder (μ g/kg ds)	uitlaatwater Vlietpolder gemaal (μ g/kg ds)	Hoge Raam (μ g/kg ds)	Lage Raam (μ g/kg ds)	Oldebroekertocht (μ g/kg ds)
17 α -oestradiol	0,3	0,1	<0,02	<0,05	<0,02
oestron	7,8	3,0	0,1	0,3	0,3
17 β -oestradiol	0,5	0,3	<0,02	<0,05	<0,02
oestriol	<0,04	<0,03	<0,02	<0,05	<0,02
17 α -ethinyloestradiol	<0,04	<0,03	<0,02	<0,05	<0,02
mestranol	<0,04	<0,03	<0,02	<0,05	<0,02

5.2 Diergeneesmiddelen

5.2.1 Resultaat methodeontwikkeling

De resultaten van de verschillende experimenten voor water liggen dicht bij elkaar. Op grond hiervan is ervoor gekozen om de extractie uit te voeren met minimale hoeveelheden zuur (40 µl) en EDTA (0,5 g). Als SPE-materiaal werd ENVI geselecteerd. Op grond van de uitkomsten van de 'experimental design' experimenten is voor sediment gekozen voor een ASE-extractie bij 25°C met een methanol/citraatmengsel zonder toevoeging van EDTA met een Rotavap concentratiestap gevolgd door 45 µm filtratie. In Tabel 5.8 zijn de recoveries weergegeven onder de geselecteerde condities.

Tabel 5.8 Recoveries van doelstoffen aan 'gespikede' Maas/Rijnwater onder gekozen optimale condities.

stof	water gemiddelde recovery	water standaard deviatie gemiddeld	sediment gemiddelde recovery	sediment standaard deviatie gemiddeld
sulfadiazine	44 %	2,4 %	31 %	5,4 %
amoxyciline	61 %	5,8 %	19 %	1,2 %
trimethoprim	64 %	3,6 %	32 %	7,9 %
oxytetracycline	58 %	2,4 %	21%	2,1 %
sulfamethoxazole	52 %	3,2 %	42 %	5,1 %
doxycycline	61 %	3,7 %	5,0 %	1,6 %
tylosine	111 %	53 %	129 %	46 %
flumequine	104 %	6,6 %	72 %	9,0 %
sulfadiazine D4*	43 %	2,2 %	28 %	5,2 %
sulfamethoxazole D4*	46 %	2,3 %	40 %	5,0 %

* interne standaard

5.2.2 Meetresultaten water

De resultaten van de analyses diergeneesmiddelen in de bemonsteringsperiode najaar 2004 zijn gegeven in Tabel 5.9. Alle monsters zijn in duplo gemeten; de recoveries zijn niet nader bepaald. De detectielimieten variëren van 0,1 ng/l tot 20 ng/l. De LC-MS/MS-analyse is voor de afbraakproducten α- en β-apo-oxytetracycline (OTC) op een andere wijze uitgevoerd dan voor oxytetracycline. Dit had evenwel geen nadelig effect op het uiteindelijke resultaat.

Tabel 5.9 Gehalten diergeneesmiddelen (in ng/l) in oppervlaktewater (najaar 2004).

stof	poldersloot Vlietpolder	uitlaatwater Vlietpolder	Hoge Raam	Lage Raam	Oldebroeker- tocht	mix van Rijn / Maas
amoxicilline	<20	nb	<20	<20	<20	61
doxycycline	<1	nb	<1	<1	<1	<1
flumequine	<5	nb	2,5	2,1	<5	1,1
oxytetracycline	<20	nb	<20	<20	<20	<20
sulfadiazine	<0,5	nb	0,9	1,1	<0,5	2,8
sulfamethoxazol	<1	nb	<1	<1	<1	56
trimethoprim	<0,1	nb	<0,1	1,2	<0,1	3,0
tylosine	<0,1	nb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
α-apo-OTC*	<20	nb	<20	<20	<20	<20
β-apo-OTC*	<20	nb	14	8	<20	<20

* Volgens separate LC-MS/MS-analysmethode. De scheiding van α-apo en β-apo-oxytetracycline (OTC) uitgevoerd volgens de literatuur was niet goed reproduceerbaar. In het vervolgonderzoek is de som van oxytetracyclines alleen gemeten volgens de standaardanalysemethode.

In het oppervlaktewater in gebieden met (intensieve) veehouderij waren de meeste geselecteerde diergeneesmiddelen in niet-aantoonbare concentraties aanwezig. Alleen op de bemonsteringslocaties Hoge Raam en Lage Raam zijn β -apo-oxytetracycline, flumequine, sulfadiazine en trimethoprim aangetoond. De hoogst gemeten concentratie is 14 ng/l β -apo-oxytetracycline. Opmerkelijk is dat sulfamethoxazol niet in het oppervlaktewater van veeteeltgebieden wordt aangetoond, ofschoon deze stof veel als diergeneesmiddel wordt gebruikt en goed met het regenwater vanaf landbouwgrond kan uit- of afspoelen.

In het voorjaar van 2005 zijn nogmaals watermonsters genomen en dezelfde diergeneesmiddelen geanalyseerd. Deze watermonsters zijn gedurende vier maanden bij -18°C in de vriescel bewaard alvorens deze te analyseren. Reden hiervoor was dat er voor gekozen was de analysemethode voor de bepaling van diergeneesmiddelen in sediment eerst verder te optimaliseren en daarna zowel de water- als de sedimentmonsters te analyseren. De analysemethode voor de watermonsters is gelijk aan de gebruikte methode uit de bemonsteringsperiode najaar 2004.

Alle watermonsters van voorjaar 2005 zijn geanalyseerd zowel met als zonder spike van 250 ng/l (50 μl van een 1 mg/l oplossing aan 200 ml polderslootwater van Vlietpolder). Door deze werkwijze is per watermonster de recovery bepaald. De ongecorrigeerde meetresultaten met de bijbehorende recoveries en de detectielimieten voor de diergeneesmiddelenanalyses uit voorjaar 2005 zijn weergegeven in Tabel 5.10.

De meetresultaten van voorjaar 2005 zijn vergelijkbaar met die uit de voorgaande periode. Diergeneesmiddelen zijn niet of in zeer lage concentraties in oppervlaktewater in veeteeltgebieden aangetoond. Alleen op de bemonsteringslocaties Rusvensche loop en proefsloot Waardenburg zijn lage concentraties trimethoprim, flumequine en tylosine aangetroffen. In het water van Rijn en Maas zijn enkele ng/l flumequine en trimethoprim aangetoond evenals enkele tientallen ng sulfamethoxazol (11 en 51 ng/l). Alleen in het Maaswater is amoxicilline aangetroffen in een gehalte van 23 ng/l. Opmerkelijk zijn de hogere recoveries van de Maas- en Rijnmonster in vergelijking tot de watermonsters uit veeteeltgebieden. De recovery voor sulfamethoxazol in de veeteeltmonsters is hiervan een goed voorbeeld. Een andere verklaring dan een 'vuile' matrix van de watermonsters kan niet worden gegeven.

5.2.3 Meetresultaten sediment

De resultaten van de analyses van diergeneesmiddelen in sedimenten uit de bemonsteringsperiode najaar 2004 zijn gegeven in Tabel 5.11. Als blanco is gewassen zeezand (SETOC 701) en ook het sedimentmonster Hoge Raam gespiked om een beeld te krijgen van de recovery.

In de waterbodems in gebieden met (intensieve) veehouderij zijn enkele van de geselecteerde diergeneesmiddelen in aantoonbare concentraties aanwezig. In het sediment van poldersloot Vlietpolder zijn amoxicilline, sulfadiazine en sulfamethoxazol aangetoond en in het sediment

Tabel 5.10 Gehalten diergeneesmiddelen in oppervlaktewater (voorjaar 2005).

stof	Vlietpolder				Rusvensche loop		Graspeel-loop		Waardenburg				Dedemsvaart		referentie Naardermeer		Maas Eijsden		Rijn Lobith	
	poldersloot		uitlaat-water		conc	rec	conc	rec	conc	rec	conc	rec	conc	rec	conc	rec	conc	rec	conc	rec
	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)	conc (ng/l)	rec (%)
amoxicilline	<20	29	<20	37	<20	119	<20	74	<20	65	<20	75	<20	64	<20	90	23	99	<20	100
doxycycline	<1	18	<1	18	<1	76	<1	43	<1	39	<1	20	<1	17	<1	37	<1	76	<1	39
flumequine	<5	45	<5	49	<5	51	<5	58	<5	47	4,1	23	<5	51	<5	46	1,6	94	0,8	99
oxytetracycline	<20	13	<20	12	<20	46	<20	17	<20	35	<20	25	<20	18	<20	25	<20	75	<20	50
sulfadiazine	<0,5	24	<0,5	22	<0,5	53	<0,5	51	<0,5	36	<0,5	19	<0,5	42	<0,5	14	<0,5	73	<0,5	82
sulfamethoxazol	<1	4	<1	3	<1	29	<1	17	<1	12	<1	6	<1	10	<1	6	11	58	51	71
trimethoprim	<0,1	15	<0,1	15	0,17	42	<0,1	31	<0,1	29	<0,1	18	<0,1	26	<0,1	27	2,3	71	2,6	49
tylosine	<0,1	91	<0,1	42	<0,1	114	<0,1	116	<0,1	109	1,6	52	<0,1	90	<0,1	111	<0,1	160	<0,1	127

Tabel 5.11 Gehalten diergeneesmiddelen (in µg/kg droge stof) in waterbodems (voorjaar 2005).

stof	Vlietpolder poldersloot		uitlaatwater		Rusvensche loop		Graspeelloop		Waardenburg proefsloot		Dedemsvaart		referentie Naardermeer	
	conc (µg/kg.ds)	rec (%)	conc (µg/kg.ds)	rec (%)	conc (µg/kg.ds)	rec (%)	conc (µg/kg.ds)	rec (%)	conc (µg/kg.ds)	rec (%)	conc (µg/kg.ds)	rec (%)	conc (µg/kg.ds)	rec (%)
amoxicilline	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
doxycycline	<0,1	10	<0,1	11	<0,1	9	<0,1	6	<0,1	23	-	0	<0,1	15
flumequine	<0,5	16	<0,5	25	1,91	24	0,22	39	<0,5	13	<0,5	24	<0,5	4
oxytetracycline	<0,5	25	<0,5	32	<0,5	33	<0,5	29	<0,5	30	-	0	<0,5	33
sulfadiazine	<0,1	55	<0,1	81	0,1	56	<0,1	77	<0,1	62	<0,1	27	<0,1	31
sulfamethoxazol	<0,1	55	<0,1	77	<0,1	75	<0,1	73	<0,1	71	<0,1	44	<0,1	33
trimethoprim	<0,1	15	<0,1	38	<0,1	45	<0,1	56	<0,1	23	<0,1	25	<0,1	5
tylosine	<0,1	35	<0,1	52	<0,1	75	<0,1	81	<0,1	21	<0,1	50	<0,1	35
algemene parameters														
droogrest (%)	13,7		9,30		52,4		34,4		30,5		19,1		12,8	
org. stofgehalte (%)	45,2		44,5		2,6		5,9		9,8		20,8		22,2	
lutumgehalte (%)	16,5		19,1		2,0		0,9		53,3		1,3		4,1	
totaal carbonaat (g/kg.ds)	5		6		< 1		1		2		1		<1	
koper (mg/kg.ds)	23		22		6		14		34		10		17	
zink (mg/kg.ds)	140		120		37		76		140		54		200	
borium (mg/kg.ds)	38		30		17		40		63		19		58	

van Hoge Raam en Lage Raam flumequine. Gelet op de sterk wisselende recoveries zijn alleen de gemeten concentraties aan sulfadiazine en sulfamethoxazol, respectievelijk 5,5 en 3,0 µg/kg.ds, betrouwbaar. De detectielimieten variëren van 0,1-5 µg/kg ds.

Bij de monsters van najaar 2004 bleken de recoveries zeer sterk te wisselen en niet overeen te komen met de resultaten uit de 'experimental design' methodeontwikkeling. Daarom is besloten voor de sedimentmonsters van voorjaar 2005 de analysemethode verder te optimaliseren specifiek gericht op deze monstrematrix. De monsters zijn gedurende deze tijd (4 maanden) opgeslagen in de vriezer bij -18°C. Na deze optimalisatie zijn alle sedimentmonsters geanalyseerd zowel met als zonder spike van 12,5 µg/nat sediment (125 µg/l van een 1 mg/l oplossing aan 10 g nat sediment van proefsloot Vlietpolder). Door deze werkwijze is per sedimentmonster de recovery bepaald. Hierdoor is voor elk monster een beeld te geven van de recovery en niet slechts voor enkele representanten zoals was gedaan met de monsters van najaar 2004. De ongecorrigeerde meetresultaten met de bijbehorende recoveries en de detectielimieten voor de diergeneesmiddelen in sedimenten uit voorjaar 2005 zijn weergegeven in Tabel 5.11.

Ook met de geoptimaliseerde analysemethode blijven de recoveries aan de lage kant. De stoffen amoxicilline en α - en β -apo-oxytetracycline (OTC) werden in geen enkel gespiked sedimentmonster teruggevonden. In tegenstelling tot najaar 2004 was het niet meer mogelijk de stoffen sulfadiazine en sulfamethoxazol in het sediment van poldersloot Vlietpolder aan te tonen. De stof flumequine vertoont een meer consistent beeld. In het stroomgebied Raam in NO-Brabant met onder andere Graspeelloop, Rusvensche Loop, Hoge Raam en Lage Raam is op alle bemonsteringslocaties, ondanks de lage recoveries, flumequine in het sediment aangetroffen.

Tabel 5.12 Gehalten diergeneesmiddelen (in µg/kg droge stof) in waterbodems (najaar 2004).

stof	poldersloot Vlietpolder	uitlaatwater Vlietpolder	Hoge Raam	Lage Raam	Olde- broeker- tocht	recovery zeezand (%)	recovery Hoge Raam (%)
amoxicilline	6,0	<5	<5	<5	<5	91	3
doxycycline	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	80	-3
flumequine	<0,5	<0,5	4,0	1,7	<0,5	91	10
oxytetracycline	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	90	7
sulfadiazine	5,5	<0,1	0,3	<0,1	0,3	82	88
sulfamethoxazol	3,0	<0,1	<0,1	<0,1	0,5	103	53
trimethoprim	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	100	1
tylosine	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	332	76
Oxytetracycline (OTC)*	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	97	4
α -apo-OTC*	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	60	-6
β -apo-OTC*	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	-1	-4
algemene parameters							
droogrest (%)	5,7	17,0	11,2	15,0	14,5		
org. stofgehalte (%)	57,0	20,5	14,5	12,5	9,0		
lutumgehalte (%)	9	9	5	7	4		
calciumcarbonaat (%)	<2	2,1	<2	<2	3,8		
koper (mg/kg.ds)	33	<20	32	32	<20		
zink (mg/kg.ds)	190	110	360	460	45		
borium (mg/kg.ds)					<12		

* Volgens separate LC-MS/MS-analysemethode

5.3 ER-CALUX

De resultaten van de ER-CALUX[®]-metingen staan vermeld in tabel 5.13, uitgedrukt als ng 17 β -oestradiol equivalenten (EEQ) per liter voor de watermonsters en als μ g EEQ per kilogram droge stof voor de waterbodemmonsters. In de beide blanco's zijn geen kwantificeerbare hoeveelheden EEQs aangetroffen. De detectielimiet (LOD) voor de watermonsters was 0,0061 ng EEQ/l, voor de waterbodemmonsters bedroeg de kwantificeringslimiet (LOQ, gedefinieerd als driemaal de LOD) 0,002 μ g EEQ/kg.ds.

Er is geen duidelijk verband tussen de gemeten EEQs in water en in waterbodem afkomstig van dezelfde locatie. Ook een relatie tussen het vóórkomen van de hormonen en de totale oestrogene potentie is niet te vinden. De hoge concentraties 17 α - en 17 β -oestradiol, 17 α -ethinyloestradiol en oestron in de beide Vlietpoldermonsters worden niet bevestigd door een hoge ER-CALUX[®]-respons.

Een factor waar bij de interpretatie van de biologische resultaten rekening mee moet worden gehouden is de vrijwel zekere aanwezigheid van vele onbekende stoffen in de extracten, die de biologische respons beïnvloeden. Hierbij kan gedacht worden aan andere steroidhormonen zoals androgenen en progestagenen, die invloed kunnen hebben op de oestrogene respons in de ER-CALUX[®]. De ER-CALUX[®] maakt gebruik van een borsttumorceldlijn waarin verschillende hormonale routes voor signaaloverdracht intact zijn. De cellen bevatten naast endogene oestrogeenreceptoren ook onder andere androgeen (AR)- en progesteron (PR)-receptoren. Aangezien de monsters afkomstig zijn uit gebieden met melkveehouderij is het niet te verwachten dat significante gehalten androgenen aanwezig zullen zijn in de monsters. Progestagenen maken deel uit van de natuurlijke hormoonhuishouding van vrouwelijke zoogdieren, zodat het voorkomen van progestagene stoffen in de monsters te verwachten is. Zo is bijvoorbeeld de analyse van progesteron (-metabolieten) in de urine van koeien een standaardmethode voor het bepalen van de reproductiecyclus (drachtigheid). De aanwezigheid van progestagenen in een monster kan leiden tot een anti-oestrogeen effect.³

Tabel 5.13 ER-CALUX[®] waarden in oppervlaktewater en waterbodem (najaar 2004).

monsterlocatie	EEQs in water (ng EEQ/l)	spreiding RSD (%) n=3	EEQs in waterbodem (μ g EEQ/kg.ds)	spreiding RSD (%) n=3
blanco	<LOD	-	<LOQ	-
poldersloot Vlietpolder	0,206	13	0,019	7,4
uitlaatwater Vlietpolder	0,249	2,5	0,063	6,1
Hoge Raam	0,413	7,8	0,034	5,5
Lage Raam	0,243	14	0,074	9,9
Oldebroekertocht	0,115	11	0,012	3,1

³ Blootstelling van ER-CALUX[®]-cellen aan progesteron in combinatie met 17 β -oestradiol resulteert in een inhibitie van de door 17 β -oestradiol gemedieerde inductie van luciferase (pers. mededeling J. Legler, IVM).

5.4 Vitellogeninemetingen in brasems

5.4.1 Veldwerk

Van de oorspronkelijk geplande drie onderzoekslocaties zijn uiteindelijk alleen de Lage Raam en Oldebroekertocht bevestigd. Op basis van informatie van een beroepsvisser ter plekke en het Hoogheemraadschap van Rijnland bleek op de derde locatie, de Vlietpolder, niet of nauwelijks brasem voor te komen. Om deze reden is besloten deze onderzoekslocatie te laten vervallen.

De locatie Lage Raam is op 25 oktober 2004 bevestigd nabij de coördinaten $x=182995$ en $y=413118$ over een afstand van circa 2 km. Gevestigd is onder andere met een zegen (sleepnet) en elektrische visapparaten. In totaal zijn 32 volwassen brasems weggevangen.

Twee dagen later is in de Oldebroekertocht nabij de coördinaten $x=178300$ en $y=496400$ over circa 1 km gevestigd naar brasems. Gebruik is gemaakt van een zegen en kieuwnetten. In totaal zijn 41 volwassen brasems uit één school gevangen.

Een meer gedetailleerde beschrijving van het veldwerk en de viskarakteristieken is gegeven in het deelrapport van Aquasense (Derksen, 2004).

5.4.2 Viskarakteristieken

Van de gevangen vrouwelijke brasems werd alleen de lengte (totaal en vork) en het totaalgewicht gemeten. Bij de mannelijke brasems is de lengte (totaal en vork), het gewicht (totaal en somatisch), de leeftijd, het gonade- en het levergewicht bepaald. Om vergelijking met andere visonderzoeken mogelijk te maken zijn het gonade-, lever- en totaalgewicht geïndexeerd tot respectievelijk de GSI (gonade-index), HSI (leverindex) en CF (conditiefactor). De GSI, HSI en CF geven een beeld van de fysiologische toestand van de vis.

In Tabel 5.14 zijn de resultaten van deze metingen samengevat. Deze worden vergeleken met de viskarakteristieken uit het LOES-onderzoek (Vethaak et al., 2002) en het onderzoek naar oestrogene effecten in regionale wateren, die beïnvloed worden door rwzi-effluenten (Gerritsen et al. 2003).

Er zijn relatief weinig mannetjes aangetroffen (ca. 30%). Alle mannelijke vissen hadden paaiuitslag. Paaiuitslag is een typisch kenmerk van mannelijke brasems, dat voor zover bekend alleen in de paaitijd tot expressie komt. Eind oktober lijkt aan de vroege kant om paaiuitslag te verwachten (Gerritsen et al., 2003).

De leeftijd van de mannelijke brasems varieerde van 9 - 13 jaar met een gemiddelde van 11 jaar. De brasems van beide locaties vertoonden een snelle groei met een gemiddelde lengte van 50 tot 52 cm. Uit de CF blijkt dat de vissen in Lage Raam wat zwaarder zijn dan op basis van hun lengte verwacht mag worden, terwijl ze in de Oldebroekertocht precies zo zwaar zijn

Tabel 5.14 Algemene viskarakteristieken van brasems gevangen in Lage Raam en Oldebroekertocht.

parameter	Lage Raam	Oldebroekertocht	LOES- onderzoek (Vethaak et al., 2002) min - max	regionale wateren (Gerritsen et al., 2003) min - max
sexratio (% m/v)	31	29	25 – 73	32 – 63
<i>mannelijke brasems</i>				
n =	10	12	798 ²	137
leeftijd (jaar)	10,7 (0,8) ¹	11,3 (1,1)		6,4 – 13,7
totale lengte (cm)	50,0 (3,2)	52,1 (1,4)	39,5 – 51,6 ²	30,3 – 53,3
vork lengte (cm)	45,7 (2,4)	46,8 (1,5)		
totaal gewicht (g)	1597 (224)	1758 (180)		325 – 2180
gonadengewicht (g)	28,4 (7,6)	27,3 (4,9)		
levergewicht (g)	31,2 (8,4)	23,6 (3,7)		
somatisch gewicht (g)	1381 (180)	1482 (165)		
GSI	1,77 (0,33)	1,59 (0,25)	1,5 – 3,5 / 7 – 15 ³	0,9 – 2,4
HSI	1,93 (0,38)	1,42 (0,17)	1,3 – 2,9	1,4 – 2,7
CF	1,11 (0,19)	1,01 (0,07)	0,78 – 1,03 ⁴	0,97 – 1,21 ⁴
<i>vrouwelijke brasems</i>				
n =	22	29	798 ²	193
totale lengte (cm)	51,1 (3,5)	53,7 (1,5)	39,5 – 51,6 ²	34,0 – 49,8
vork lengte (cm)	45,0 (3,1)	47,2 (1,3)		
totaal gewicht (g)	1666 (296)	1799 (163)		473 – 1880

¹ Tussen haakjes is de standaarddeviatie gegeven.

² Mannetjes én vrouwtjes

³ Voorjaar respectievelijk najaar

⁴ Andere berekeningswijzen voor de CF gebruikt. Dit leidt echter niet tot andere waarden.

als verwacht. Hieruit is geconcludeerd dat de vissen in goede conditie waren. De aangetroffen vissen waren vrij groot vergeleken met die in het LOES-onderzoek en het onderzoek in regionale wateren.

De gonadesomatische index (GSI) en de heptosomatische index (HSI) zijn vergelijkbaar met de ranges die bij eerdere onderzoeken zijn aangetroffen. De GSI lijkt iets hoger (maar waarschijnlijk niet significant) dan de door Gerritsen et al. (2003) bepaalde GSI op de referentielocaties Weerribben en Naardermeer. Voor deze locaties werd door Gerritsen et al. (2003) een HSI van 1,4 aangetroffen. De HSI van de brasems van de Oldebroekertocht is vergelijkbaar met deze referentielocaties, terwijl de index bij de vissen van de Lage Raam iets hoger is. Samenvattend kan geconcludeerd worden dat de gevangen brasems van een goede kwaliteit waren, met viskenmerken die binnen de bekende ranges lagen.

5.4.3 Vitellogeninmetingen

In totaal zijn 22 vitellogenine (Vtg) -metingen uitgevoerd, 10 in het plasma van mannelijke brasems uit de Lage Raam en 12 in die van de Oldebroekertocht. De ruwe resultaten van de metingen per vis worden gepresenteerd in Derksen et al. (2004). Alle Vtg-gehalten liggen onder klasse 1, namelijk < 1000 ng/ml. Op basis van eerder onderzoek naar Vtg in het bloedplasma van brasems (Vethaak et al., 2002; Gerritsen et al., 2003) mag worden verondersteld dat Vtg-gehalten groter dan klasse 1 (meer dan 10.000 ng Vtg/ml) mogelijk zijn

veroorzaakt door verontreinigingen met een oestrogene werking. De resultaten van de Vtg-metingen zijn vergelijkbaar met de regionale wateren zoals de Eem, het Valleikanaal, de Linge en de referentielocatie Weerribben en Naardermeer (Gerritsen et al., 2003). De conclusie is dan ook dat in de weggevangen mannelijke brasems uit Lage Raam en Olderbroekertocht geen oestrogene effecten konden worden aangetoond.

5.5 Resistentieontwikkeling bij bacteriën

De verzamelde monsters kunnen worden gegroepeerd naar lage, gemiddelde, en hoge frequentie van aanwezigheid van resistentiegenen. De groepering in Tabel 5.15 is kwalitatief op basis van de scores in Tabel 5.16 en 5.17.

Tabel 5.15 Indeling van monsterlocaties naar mate van diversiteit van resistentiegenen.

	laag	gemiddeld	hoog
water	Naardermeer (2005) Dedemsvaart (2005) Vlietpolder uitlaatwater (2005)	Oldebroekertocht (2004) Vlietpolder poldersloot (2005) Vlietpolder poldersloot (2004) Vlietpolder uitlaatwater (2004)	Hoge Raam (2004) Lage Raam (2004) Rusvensche loop (2005) Graspeelloop (2005)
waterbodem	Naardermeer (2005) Vlietpolder poldersloot (2004) Vlietpolder uitlaatwater (2004)	Vlietpolder uitlaatwater (2005) Graspeelloop (2005) Dedemsvaart (2005) Vlietpolder poldersloot (2005) Hoge Raam (2004) Lage Raam (2004)	Oldebroekertocht (2004) Rusvensche loop (2005)

De resultaten voor het water staan in Tabel 5.16. Hier zijn alle zeven verschillende resistentiegenen tegen tetracycline en alle drie tegen sulfonamiden aangetroffen, met 0 tot 8 genen per monster.

De resultaten voor de genen in waterbodem worden in Tabel 5.17 weergegeven. Het aantal resistentiegenen was 0 tot 3 per monster.

Tabel 5.16 Detectie van resistentiegenen in water.

environment	sample	tet(B)	tet(C)	tet(D)	tet(J)	tet(O)	tet(S)	tet(W)	sul(I)	sul(II)	sul(III)	count
water	Vlietpolder poldersloot 14/10/04 a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
water	Vlietpolder poldersloot 14/10/04 b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3
water	Vlietpolder uitlaatwater 14/10/04 a	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	-	2
												0
water	Oldebroekertocht 27/10/04 a	(+)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	2
water	Oldebroekertocht 27/10/04 b	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	4
water	Hoge Raam 14/10/04 a	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	5
water	Hoge Raam 14/10/04 b	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	5
water	Lage Raam 14/10/04 b	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	6
water	Lage Raam 14/10/04 a	(+)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	5
water	Vlietpolder poldersloot 8/4/05 a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3
water	Vlietpolder poldersloot 8/4/05 b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3
water	Vlietpolder uitlaatwater 8/4/05 a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
water	Vlietpolder uitlaatwater 8/4/05 b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
water	Graspeelloop 8/4/05 a	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	7
water	Graspeelloop 8/4/05 b	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	7
water	Dedemsvaart 9/5/05 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
water	Dedemsvaart 9/5/05 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
water	Grusvensche loop 8/4/05 a	+	+	(+)	-	+	+	+	+	-	+	7
water	Grusvensche loop 8/4/05 b	+	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	8
water	Naardermeer 23/6/05 a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
water	Naardermeer 23/6/05 b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
water	Naardermeer 23/6/05 c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

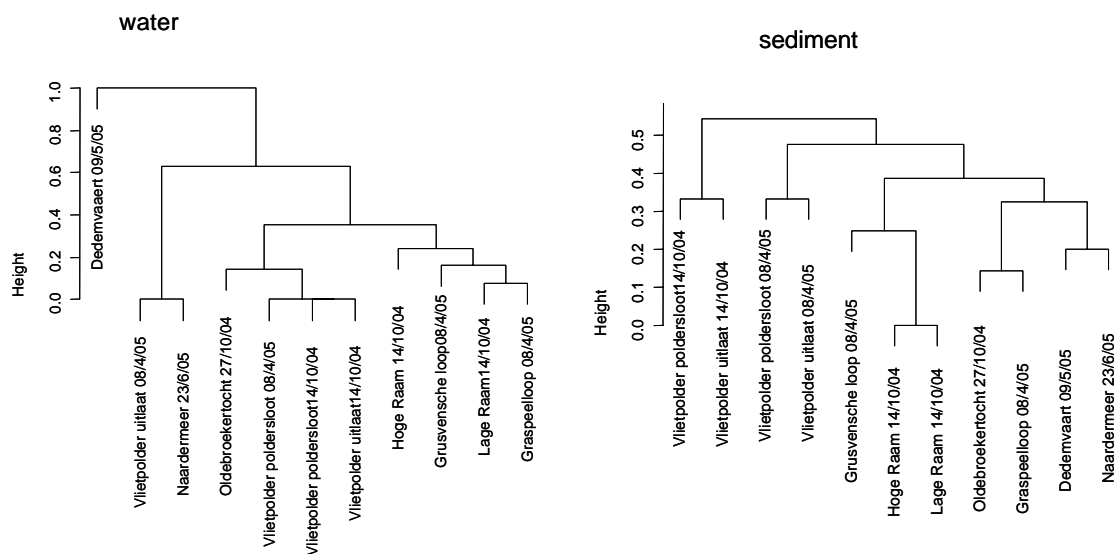
Tabel 5.17 Detectie van resistentiegenen in waterbodem.

environment	sample	tet(B)	tet(C)	tet(D)	tet(J)	tet(O)	tet(S)	tet(W)	sul(I)	sul(II)	sul(III)	count
sediment	Vlietpolder poldersloot 14/10/04 a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
sediment	Vlietpolder poldersloot 14/10/04 b	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	2
sediment	Vlietpolder uitlaatwater 14/10/04 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
sediment	Vlietpolder uitlaatwater 14/10/04 c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
sediment	Oldebroekertocht 27/10/04 a	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	2
sediment	Oldebroekertocht 27/10/04 b	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	4
sediment	Hoge Raam 14/10/04 a	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	3
sediment	Hoge Raam 14/10/04 b	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	2
sediment	Lage Raam 14/10/04 a	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
sediment	Lage Raam 14/10/04 b	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	3
sediment	Vlietpolder poldersloot 8/4/05 a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
sediment	Vlietpolder poldersloot 8/4/05 c	-	-	-	-	(+)	-	-	+	-	+	2
sediment	Vlietpolder uitlaatwater 8/4/05 c	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	3
sediment	Vlietpolder uitlaatwater 8/4/05 d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
sediment	Graspeelloop 8/4/05 a	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	2
sediment	Graspeelloop 8/4/05 b	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	2
sediment	Dedemsvaart 9/5/05 a	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	2
sediment	Dedemsvaart 9/5/05 b	-	-	-	-	(+)	-	-	+	+	-	2
sediment	Grusvensche loop 8/4/05 a	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	3
sediment	Grusvensche loop 8/4/05 c	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	4
sediment	Naardermeer 23/6/05 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
sediment	Naardermeer 23/6/05 b	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	2

Het patroon van resistentiegenen is met multivariate statistiek geanalyseerd. Daarbij werd aanwezigheid van genen uitgedrukt (aan- of afwezig). Aanwezigheid in een van de duplo's was voldoende om te scoren. De correlatie van de monsterlocaties met de matrix (water of sediment) waarin de bepaling gedaan was, en met de veronderstelde bron (varkenshouderij, melkvee, pluimvee) werd bepaald. De analyse van de monsters toonde aan dat zowel de aard van de monsters (water of sediment) als de monsterlocatie (varkenshouderij, melkvee, pluimvee) het patroon beïnvloedt. De analyse doet vermoeden dat monsters van wateren die mogelijk door mest van varkenshouderijen worden beïnvloed afwijken van die van de andere

locaties. Het aantal resistentiegenen in stroomgebied van de Lage Raam met stroomopwaarts de Rusvensche loop, Graspeelloop en Hoge Raam is beduidend hoger dan bijvoorbeeld die in de Vlietpolder met alleen maar melkveebedrijven (Tabel 5.16). Het regionale water dat mogelijk beïnvloed wordt door pluimveemest ligt met midden/hoog hier tussenin. In het natuurgebied het Naardermeer, waar de antropogene beïnvloeding minimaal is, zijn maar weinig resistentiegenen aangetroffen. Opmerkelijk is de lage diversiteit in de Dedemsvaart. Op basis van dat resultaat onderscheidt deze locatie zich van alle andere locaties (zie Figuur 5.2). Binnen die overige locaties onderscheiden Naardermeer en Vlietpolder-uitlaat zich weer van de andere locaties. Hoge en Lage Raam, Graspeelloop en Rusvensche loop vormen op hun beurt een duidelijke groep.

Figuur 5.2 geeft vooral voor het water een goed beeld van de herkomst van de monsters, wanneer deze vergeleken wordt met Tabel 3.2 (kenmerken van de bemonsteringslocaties). De stroomgebieden van de Vlietpolder en de Lage Raam zijn goed van elkaar te onderscheiden. Bij de monsters van de waterbodem is dit minder goed herkenbaar doordat ook op andere bemonsteringslocaties resistentiegenen in de waterbodem werden aangetoond.



Figuur 5.2 Clusteranalyse van het patroon van resistentiegenen in water en waterbodem.

6. Discussie en conclusies

6.1 Discussie

In dit verkennende onderzoek is gekeken naar de aanwezigheid van diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in poldersloten en regionale oppervlaktewateren in gebieden met (intensieve) veehouderij. Zo is een eerste indruk verkregen van de mate van beïnvloeding met deze stofgroepen. Er is gekeken naar het voorkomen van verhoogde concentraties natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen in het water en de waterbodem en hun effecten in het water, zoals vervrouwelijking van mannelijke vissen. Vanwege het verkennende karakter is het niet mogelijk mechanistische relaties te leggen tussen de bedrijfsvoering van een veeteeltbedrijf, de emissies van de stoffen, de aangetroffen concentraties in oppervlaktewater en de optredende effecten in het watermilieu. Ook het meten van de concentraties natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen in mest en in de diverse verspreidingsroutes naar oppervlaktewater zijn buiten de onderzoeksopzet gelaten. Het onderzoek is zo opgezet dat uit de eerste fase (najaar 2004) een algemene indruk kon worden verkregen over de aanwezigheid van de gemeten stoffen en de mogelijke milieueffecten. De tweede fase (voorjaar 2005) was meer gericht op het meten van stofconcentraties in oppervlaktewater na bemesting. Het tijdstip van bemonstering werd bepaald door het moment van uitrijden van mest en de weersomstandigheden. Bij de locatiekeuze is niet alleen het type veehouderij in een gebied betrokken, maar ook het gebruik van het type mest op een bepaalde grondsoort. Bovendien mochten deze locaties slechts marginaal beïnvloed worden door andere (huishoudelijke) lozingen met geneesmiddelen of natuurlijke hormonen. Voor zover bekend waren de bemonsterde locaties in de veeteeltgebieden dan ook representatief voor het gestelde doel van dit verkennende onderzoek.

Natuurlijke hormonen en oestrogene potentie

Het onderzoek heeft lage concentraties van natuurlijke hormonen in het oppervlaktewater en de waterbodem in gebieden met (intensieve) veehouderij aangetoond. Veelal waren de concentraties in het oppervlaktewater lager dan de detectiegrens. In enkele gevallen waren de gemeten gehalten enkele tientallen nanogrammen per liter oppervlaktewater en enkele honderden nanogrammen per kilogram waterbodem (vergelijkbaar met in de literatuur gerapporteerde waarden voor veeteeltgebieden).

Op de locatie Vlietpolder, waar zich vooral melkveebedrijven bevinden, werden hoge hormoongehalten aangetroffen tot 7,8 µg/kg ds voor oestron in waterbodem en tot circa 25-50 ng/l in het oppervlaktewater voor de hormonen 17α- en 17β-oestradiol en oestron. Maar ook het synthetische hormoon 17α-ethinyloestradiol werd in hoge concentraties gemeten. Dit is opmerkelijk, omdat deze stof doorgaans niet in zulke hoge concentraties in oppervlaktewater wordt aangetroffen. 17α-Ethinyloestradiol wordt, voor zover bekend, alleen als actieve stof in

de anticonceptiepil toegepast. Zelfs in ongezuiverd stedelijk afvalwater is de concentratie van deze stof doorgaans lager dan 10 ng/l. Ook in analytisch opzicht is geprobeerd om hiervoor een verklaring te vinden. Heranalyse van het bewaarde extract leverde dezelfde hoge meetwaarden op. In tegenstelling tot de overige natuurlijke hormonen oestron, 17 α - en 17 β -oestradiol, kon de identiteit van 17 α -ethinyloestradiol niet volledig door een ander laboratorium worden vastgesteld. Het geheel opnieuw analyseren van het watermonster, dat gedurende enkele maanden bij -18°C was bewaard, resulteerde in waarden voor alle hormonen die kleiner waren dan de detectiegrens. In de overige watermonsters van de Vlietpolder zijn daarna nooit meer dergelijke hoge hormoongehalten aangetroffen. Deze lagen allemaal onder de detectiegrens. Met uitzondering van oestron (22 ng/l in een greppel) komt dit overeen met de bevindingen uit het LOES-onderzoek. In het LOES-onderzoek zijn enkele verkennende metingen uitgevoerd naar de aanwezigheid van natuurlijke hormonen in poldersloten (Vethaak et al., 2002): alleen oestron kon worden aangetoond in concentraties tot 3 ng/l. Echter, in recent Deens veldonderzoek werden oestron en oestradiol aangetoond in drainagewater van bemeste akkers tot drie maanden na bemesting. De hoogste gemeten concentraties waren respectievelijk 68 en 2,5 ng/l (Kjær et al., 2007).

De meetgegevens hebben geen relatie aangetoond tussen de chemische analyses van de hormonen en de totale oestrogene potentie zoals gemeten door de biologische testmethode ER-CALUX[®]. Zo werden de hoge concentraties 17 α - en 17 β -oestradiol, 17 α -ethinyloestradiol en oestron in de Vlietpoldermonsters niet bevestigd door een hoge ER-CALUX[®]-respons.

Uit het veldonderzoek blijkt dat brasems uit de benedenstroomse wateren in veehouderijgebieden geen kenmerken van oestrogene beïnvloeding vertoonden. De vitellogeninegehalten in het bloed van brasems op twee van de drie wateren waren niet verhoogd. Op de derde locatie, de Vlietpolder, waar de hoogste hormoongehalten zijn gemeten, blijken weinig brasems voor te komen.

Bij vergelijking van de bevindingen uit deze verkenning met de informatie uit het LOES-onderzoek (Vethaak et al., 2002) en het vervolgonderzoek in regionale wateren nabij rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI; Gerritsen et al., 2003) blijkt de beïnvloeding van de wateren in veeteeltgebieden met natuurlijke hormonen en de resulterende oestrogene effecten bij vissen geringer te zijn dan nabij lozingspunten van rwzi's. Dit ondanks het feit dat de concentraties hormonen nabij rwzi-effluenten en in poldersloten een grote overeenkomst vertonen. De concentraties natuurlijke hormonen 17 α - en 17 β -oestradiol liggen doorgaans, zowel in RWZI-effluent als in drainagewater vanuit bemeste landbouwgrond, beneden de detectiegrens en oestron wordt soms tot enkele tientallen μ g/l aangetoond. In RWZI-effluenten wordt soms ook het synthetische hormoon 17 α -ethinyloestradiol boven de detectiegrens aangetoond. Op basis van het min of meer gelijk voorkomen van de hormonen is de verwachting dat ook de oestrogene beïnvloeding op het watermilieu vergelijkbaar zal zijn. De ER-CALUX[®]-waarden liggen inderdaad in dezelfde orde van grootte. Maar op basis

van de gemeten vitellogeninegehalten in het bloedplasma van mannelijke brasems blijkt deze beïnvloeding vanuit veeteeltgebieden veel geringer dan nabij rwzi-effluenten in de Vecht en de Aa. Het is mogelijk dat het stedelijke afvalwater nog andere verontreinigingen bevat met hormoonverstorende werking. Het is eveneens mogelijk dat de waterkwaliteit in het landelijk gebied lokaal sterker verschilt (zowel in ruimte als in tijd), waardoor de weggevangen brasems niet geheel representatief zijn voor het bemonsterde water.

Voor de schatting van risico's van stoffen met een hormoonontregelende werking richtte de commissie, die het rapport van de Gezondheidsraad 'Hormoonontregelaars in ecosystemen' (Gezondheidsraad, 1999) verzorgde, zich op effecten op de voortplanting. Verstoring van de voortplanting heeft immers potentieel een grote invloed op populaties en daarmee op het ecosysteem. De commissie nam daarbij alle geslachtshormoongemediëerde effecten in beschouwing, dat wil zeggen werkingen als gevolg van geslachtshormoonmimicry en antagonisme als gevolg van receptorbinding, en beïnvloeding van de hormoonhuishouding als gevolg van interferentie met geslachtshormoonsynthese, -transport, -afbraak en -uitscheiding. Daarnaast beschouwde zij de effecten die tot stand komen door interactie met het schildklierhormoonsysteem. Het kiezen van de effecten op de voortplanting als uitgangspunt houdt in dat pas sprake is van een 'ontregelaar' als de stof in kwestie ook daadwerkelijk de voortplantingsfysiologie (of het voortplantingsgedrag) verstoort bij individuen of hun nakomelingen. Een verandering van een hormoonspiegel die binnen de grenzen van de normale homeostase valt, en dus niet leidt tot een fysiologische respons (ontregeling), merkt de commissie niet aan als een ontregeling. De commissie noemt amfibieën, vissen (waaronder brasems), en ongewervelden (kreeftachtigen, molluscanen) als geschikte indicatorsoorten. In het licht van deze aanbevelingen kan worden vastgesteld dat vitellogenine een vroege indicator is voor ontregeling; en dat de keuze voor de brasem relevant is. Echter, omdat het onderzoek niet kijkt naar amfibieën en ongewervelden, kunnen geen uitspraken gedaan worden over het hele ecosysteem. Een vergelijking van de relatieve gevoeligheid van vitellogeninemeting bij vissen ten opzichte van de gevoeligheid van bijvoorbeeld amfibieën en ongewervelden (slakken) voor natuurlijke hormonen strekt tot de aanbeveling.

Diergeneesmiddelen en resistentieontwikkeling

Het onderzoek heeft lage concentraties van diergeneesmiddelen in het water en sediment aangetoond. De gemeten gehalten zijn vergelijkbaar met elders gerapporteerde waarden en bevinden zich in de orde van enkele nanogrammen per liter water tot enkele duizenden nanogrammen per kilogram sediment. Deze gehalten kunnen sterk worden bepaald door lokale factoren, maar zijn beduidend lager dan de theoretische maximale waarden die mogelijk geacht werden op basis van andere onderzoeken. Van de acht onderzochte diergeneesmiddelen zijn er vier stoffen, te weten flumequine, sulfadiazine, trimethoprim en tylosine in enkele wateren in veeteeltgebieden aangetoond. Opmerkelijk was dat een van de gemeten diergeneesmiddelen, sulfamethoxazole, dat de eigenschap heeft om met het regenwater uit of van landbouwgrond te spoelen, niet in het oppervlaktewater kon worden

Tabel 6.1 *Aanwezigheid van sulfamethoxazole, trimethoprim en flumequine in RWZI-effluent, regionaal water stroomafwaarts van RWZI-lozing, oppervlaktewater (Schrap et al., 2003; Mill et al., 2006) en regionaal water in veeteeltgebied (dit onderzoek).*

type water	sulfamethoxazole			trimethoprim			flumequine		
	n* (n > dl)	range (ng/l)	med.** (ng/l)	n aantal metingen (n > dl)	range (ng/l)	med. (ng/l)	n aantal metingen (n > dl)	range (ng/l)	med. (ng/l)
RWZI-effluent	15 (11)	<dl-260	110	17 (9)	< dl-170	130	5 (5)	2,3-19	8,3
regionaal water stroomafwaarts RWZI	20 (18)	<dl-120	50	24 (6)	<dl-130	55	-	-	-
oppervlaktewater in Nederland	22 (20)	<dl-85	15	22 (2)	<dl-7,5	6,4	18 (13)	<dl-19	2,7
regionaal water in veeteeltgebied	11 (0)	<dl	<dl	11 (2)	<dl-1,2	0,7	11 (1)	<dl-4,1	4,1

* aantal metingen (aantal metingen boven dl= detectiegrens)

** mediaan van de meetwaarden boven de detectiegrens

aangetoond. Daarentegen werd deze stof samen met het diergeneesmiddel amoxicilline tot enkele tientallen ng/l aangetoond in de Rijn en de Maas. Dit bevestigt het beeld uit eerder monitoringsonderzoek naar geneesmiddelen (Schrap et al., 2003; Mill et al., 2006), waarin de stof sulfamethoxazole in hoge concentraties voorkomt in oppervlaktewater (tot enkele tientallen ng/l), benedenstrooms van lozingspunten van rwzi's (tot 120 ng/l) en in rwzi-effluenten (tot 260 ng/l). In Tabel 6.1 is hiervan een overzicht gegeven, evenals van trimethoprim en flumequine in deze waterstromen.

In het sediment van wateren in veeteeltgebieden zijn aantoonbare gehalten van antibiotica aangetroffen, te weten amoxicilline, flumequine, sulfadiazine en sulfamethoxazole. In wateren in veeteeltgebieden met varkenshouderijen werd consistent flumequine van enkele µg/kg ds aangetoond. Dit is opmerkelijk omdat op basis van het antibioticagebruik bij varkenshouderijen eerder de aanwezigheid van oxytetracycline wordt verwacht in plaats van flumequine. Oxytetracycline is echter in geen water- en sedimentmonster aangetoond. Wel is eenmalig een van de afbraakproducten, β-apo-oxytetracycline, in het water aangetroffen. Omdat milieukwaliteitsnormen voor deze stoffen ontbreken, kunnen de risico's van deze concentraties niet geschat worden.

De aanwezigheid van antibiotica blijkt de aanwezigheid van antibioticaresistentiegenen in bacteriën te bevorderen. Tabel 6.2 (met de maximale meetresultaten voor de verschillende locaties) laat een verband zien tussen de aanwezigheid van residuen diergeneesmiddelen en de mate van resistentieontwikkeling. De meetgegevens geven de indruk dat het gebruik van antibiotica bij de varkensbedrijven een verhoogde diversiteit van bacteriële resistentiegenen tegen de antibiotica oxytetracycline en sulfanomides in het lokale watermilieu tot gevolg heeft. De mate van voorkomen op basis van de resultaten van de chemische analysemethoden van beide antibiotica is beperkt. Of deze resistentiedruk het gevolg is van selectie in het milieu of van transport van resistentiegenen vanuit mest via de bodem naar het water is niet

Tabel 6.2 Overzicht van residuen van diergeneesmiddelen en diversiteit van resistentiegenen.

locatie	type mest	concentraties in water				concentraties in waterbodem				diversiteit resistentie water	diversiteit resistentie waterbodem
		SDZ ng/l	TRM ng/l	OTC ng/l	FQ ng/l	SDZ µg/kg	SMZ µg/kg	FQ µg/kg	AMC µg/kg		
Naardermeer	referentie	-	-	-	-	-	-	-	-	laag	Laag
Vlietpolder uitlaatwater	melkvee	-	-	-	-	-	-	-	-	midden/ laag midden	midden/ laag midden/ laag
Vlietpolder poldersloot		-	-	-	-	5,5	3,0	-	6,0		
Oldebroekertocht	vleeskuikens	-	-	-	-	0,3	0,5	-	-	midden	hoog
Hoge Raam	varkens en melkvee	1,1	-	14	2,5	0,3	-	4	nb	hoog	midden
Lage Raam		-	1,2	-	-	-	-	1,7	nb	hoog	midden
Graspeelloop		-	-	-	-	0,2	-	-	nb	hoog	midden
Rusvensche loop		-	0,2	-	-	0,1	-	1,9	nb	hoog	hoog

SDZ=sulfadiazine TRM=trimethoprim OTC=oxytetracycline FQ=flumequine SMZ=sulfamethoxazole AMC=amoxicilline + afbraakproducten

Nb = niet beoordeeld

onderzocht. In het water van het Naardermeer zijn geen restanten van antibiotica en weinig resistentiegenen aangetroffen. Hier is de antropogene beïnvloeding minimaal.

Uit aanvullend literatuuronderzoek is gebleken dat resistentie van nature algemeen voorkomt (Mensink en Montforts, 2007). Nader onderzoek betreffende het voorkomen van antibioticaresistentiegenen in onbelaste gebieden en in potentiële emissiebronnen, zoals mest en stedelijk afvalwater strekt tot aanbeveling.

De complexe analyse van de antibiotica in milieumonsters en de daarmee samenhangende lage betrouwbaarheid van de toegepaste analysemethoden, in het bijzonder in waterbodems, is een van de andere bevindingen van dit verkennende onderzoek. Verdere optimalisering van de analysemethoden in milieumonsters en uitbreiding met andere veel gebruikte diergeneesmiddelen wordt aanbevolen.

6.2 Conclusies

Dit onderzoek geeft een beeld van de aanwezigheid van natuurlijke hormonen en een aantal veel in Nederland gebruikte diergeneesmiddelen, en van mogelijke effecten op het aquatische ecosysteem.

1. Natuurlijke hormonen en diergeneesmiddelen komen in lage concentraties voor in het oppervlaktewater (tot enkele tientallen ng/l) en waterbodem (tot enkele honderden ng/kg droge stof) in gebieden met veehouderij. Veelal waren de concentraties lager dan de analytische detectiegrens.

2. Deze aanwezigheid van natuurlijke hormonen leidt niet tot oestrogene effecten bij brasems in benedenstrooms gelegen wateren in veeteeltgebieden. De vitellogeninegehalten in het bloedplasma van mannelijke brasems waren niet verhoogd, zoals dat eerder wel was waargenomen in regionale wateren nabij rwzi-effluenten. Echter, omdat het onderzoek niet kijkt naar amfibieën en ongewervelden, kunnen hierover geen uitspraken gedaan worden.
Een vergelijking van de relatieve gevoeligheid van vitellogininemeting bij vissen ten opzichte van de gevoeligheid van andere soorten, bijvoorbeeld amfibieën en ongewervelden (slakken), voor natuurlijke hormonen wordt aanbevolen.
3. Diergeneesmiddelen (antibiotica) komen in wateren van veeteeltgebieden minder frequent en in lagere concentraties voor dan geneesmiddelen in regionale wateren stroomafwaarts van rwzi's. Omdat milieukwaliteitsnormen ontbreken, kunnen de risico's van deze concentraties niet geschat worden.
4. De aanwezigheid van residuen van antibiotica correleert met een hogere diversiteit van resistentiegenen tegen antibiotica in het watermilieu. Dit verkennend onderzoek geeft hiervan een eerste indruk. In wateren, zoals in een natuurgebied, waar geen antibioticarestanten aanwezig zijn, worden weinig antibioticaresistentiegenen aangetroffen. In wateren die (mogelijk) beïnvloed worden door mest van bijvoorbeeld varkenshouderijen, is een verhoogde diversiteit van resistentiegenen tegen de antibiotica oxytetracycline en sulfanomides vastgesteld. Uit aanvullend literatuuronderzoek is gebleken dat resistentie van nature algemeen voorkomt.
Nader onderzoek betreffende het voorkomen van antibioticaresistentiegenen in onbelaste gebieden, in mest en stedelijk afvalwater, en de verspreiding in het watermilieu wordt aanbevolen.
5. Dit onderzoek had een verkennend karakter. Zo is de verspreidingsroute van de mest via de bodem naar het water buiten de onderzoeksopzet gelaten. Aangezien er nog geen analysemethoden voor diergeneesmiddelen in milieumonsters beschikbaar waren, zijn deze voor de geselecteerde antibiotica in dit onderzoek ontwikkeld. Hiervoor heeft nog geen methodeoptimalisatie per stof kunnen plaatsvinden. Verder werd de onderzoeksopzet gekenmerkt door een beperkt aantal bemonsteringslocaties en de lage frequentie van de bemonsteringen in de tijd, waarbij gelet moet worden op de afhankelijkheid van het tijdstip van mestuitrijden en de weersomstandigheden. Door deze (beperkte) onderzoeksopzet was het niet mogelijk om causale relaties te leggen tussen de bedrijfsvoering van een veeteeltbedrijf, de emissies van de betrokken stoffen naar het water, de gemeten gehalten in het oppervlaktewater en de (afwezigheid van) effecten in het watermilieu.
Indien dergelijk onderzoek in de toekomst wel gewenst is, wordt aanbevolen om, alvorens hiermee te starten, de analysemethoden in milieumonsters voor de in Nederland veel gebruikte diergeneesmiddelen verder te optimaliseren.

Literatuur

- Aga DS, O' Connor S, Ensley S, Payero JO, Snow D, Tarkalson D. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:7165-7171.
- Arcand-Hoy LD, Nimrod AC, Benson WH. Endocrine-modulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. *International Journal of Toxicology* 1998;17:139-158.
- Arikan OA, Sikora LJ, Mulbry W, Khan SU, Foster GD. Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves. *Bioresource Technology* 2007;98:169-176.
- Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental science & technology* 2000;34:5059-5066.
- Belfroid AC, van der Horst A, Vethaak AD, Schäfer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cofino WP. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment* 1999;225:101-108.
- Blok J, Wösten MAD. Herkomst en lot van natuurlijke oestrogenen in het milieu. Nieuwegein: RIWA, 2000.
- Boleas S, Alonso C, Pro J, Fernandez C, Carbonell G, Tarazona JV. Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS 3) and influence of manure co-addition. *Journal of Hazardous Materials* 2005;122:233-241.
- Boxall ABA, Blackwell P, Cavallo R, Kay P, Tolls J. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters* 2002a;131:19-28.
- Boxall ABA, Fogg L, Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ. Review of veterinary medicines in the environment. Bristol: UK Environment Agency, 2002b. Environment Agency R & D Technical Report P6-012/8TR.
- Burkhardt M, Stamm C, Waul C, Singer H, Müller S. Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of Environmental Quality* 2005;34:1363-1371.
- Burnison BK, Hartmann A, Lister A, Servos MR, Ternes T, Van der Kraak G. A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural run-off. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2003;22:2243-2250.
- Busheé EL, Edwards DR, Moore PA. Quality of runoff from plots treated with municipal sludge and horse bedding. *ASAE* 1998;41:1035-1041.
- Campagnolo ER, Johnson KR, Karpati A, Rubin CS, Kolpin DW, Meyer MT, Esteban JE, Currier RW, Smith K, Thu KM, McGeehin M. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment* 2002;299:89-95.
- Casey FXM, Larsen GL, Hakk H, Simunek J. Fate and transport of 17 β -estradiol in soil-water systems. *Environmental Science & Technology* 2003;37:2400-2409.
- Chander Y, Kumar K, Goyal SM, Gupta SC. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *Journal of Environmental Quality* 2005;34:1952-1957.
- Christian T, Schneider RJ, Farber HA, Skutlarek D, Meyer MT, Goldbach HE. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 2003;31:36-44.

- Chun S, Lee J, Radosevich M, White DC, Geyer R. Influence of agricultural antibiotics and 17 β -estradiol on the microbial community of soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 2006;41:923-935.
- Colucci MS, Bork H, Topp E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I 17 β -estradiol and estrone. *Journal of Environmental Quality* 2001;30:2070-2076.
- Colucci MS, Topp E. Dissipation of part-per-trillion concentrations of estrogenic hormones from agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 2002;82:335-340.
- Das BS, Lee LS, Rao PSC, Hultgren RP. Sorption and degradation of steroid hormones in soils during transport: column studies and model evaluation. *Environmental science and technology* 2004;38:1460-1470.
- D'Ascenzo G, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. Fate of estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total. Env.* 2003;302:199-209.
- Davis JG, Truman CC, Kim SC, Ascough JC, Carlson K. Antibiotic transport via runoff and soil loss. *Journal of Environmental Quality* 2006;35:2250-2260.
- De Liguoro M, Cibin V, Capolongo F, Halling-Sørensen B, Montesissa C. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 2003;52:203-212.
- Derksen JGM, De Poorter LRM. *Geneesmiddelen in oppervlaktewater. Aanwezigheid en risico's.* Amsterdam: RIWA, 1997.
- Derksen JGM, Van Eijnatten GM, Lahr J, Van der Linde P, Kroon AGM. *Milieu-effecten van humane geneesmiddelen. Aanwezigheid en risico's.* Lelystad, The Netherlands: RIZA, 2001. report nr. 2000.051.
- Derksen JGM. *Oestrogene effecten bij vissen in gebieden met veehouderij. Vitellogenine bij brasems.* Amsterdam: Aquasense, 2004. Rapport 2362.
- Drillia P, Dokianakis SN, Fountoulakis MS, Kornaros M, Stamatelatos K, Lyberatos G. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials* 2005a;122:259-265.
- Drillia P, Stamatelatos K, Lyberatos G. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* 2005b;60:1034-1044.
- FIDIN. *Antibioticrapportage 2002.* Den Haag: FIDIN Werkgroep Antibioticumbeleid, 2003.
- Gerritsen AAM, Rijs GBJ, Klein Breteler GJP, Lahr J. *Oestrogene effecten in vissen in regionale wateren.* Lelystad: RIZA, 2003. Rapport 2003.019.
- Gezondheidsraad. *Hormoonontregelaars in ecosystemen.* Den Haag: Gezondheidsraad, 1999. Advies 1999/13.
- Gezondheidsraad. *Milieurisico's van diergeneesmiddelen.* Den Haag: Gezondheidsraad, 2001. Signalement 2001/17.
- Hakk H, Millner P, Larsen G. Decrease in water-soluble 17 beta-estradiol and testosterone in composted poultry manure with time. *Journal of Environmental Quality* 2005;34:943-950.
- Halling-Sørensen B, Jacobsen AM, Jensen J, Sengeløv G, Vaclavik E, Ingerslev F. Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: a field-scale study in Southern Denmark. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005; 24:802-810.
- Halling-Sørensen B, Lykkeberg A, Ingerslev F, Blackwell P, Tjørnelund J. Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS. *Chemosphere* 2003;50:1331-1342.
- Hanselman TA, Graetz DA, Wilkie AC. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environmental science & technology* 2003;37:5471-5478.

- Hektoen H, Berge JA, Hormazabal V, Yndestad M. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 1995;133:175-184.
- Hildebrand C, Londry KL, Farenhorst A. Sorption and desorption of three endocrine disruptors in soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 2006;41:907-921.
- Holthaus KIE, Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Smith JLL, Carter JE. The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2002;21:2526-2536.
- Hua J, An P, Winter J, Gallert C. Elimination of COD, microorganisms and pharmaceuticals from sewage by trickling through sandy soil below leaking sewers. *Water Research* 2003;37:4395-4404.
- Ingerslev F, Halling-Sørensen B. Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin, and formation of tylosin degradation products in aerobic soil/manure slurries. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2001;48:311-320.
- Ingerslev F, Halling-Sørensen B. Biodegradation properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2000;19:2467-2473.
- Irwin LK, Gray S, Oberdörster E. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquatic Toxicology* 2001;55:49-60.
- Jacobsen AM, Halling-Sørensen B, Ingerslev F, Hansen SH. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004;1038:157-170.
- Jacobsen AM, Lorenzen A, Chapman R, Topp E. Persistence of testosterone and 17 beta-estradiol in soils receiving swine manure or municipal biosolids. *Journal of Environmental Quality* 2005;34:861-871.
- Jagnow G. Mikrobieller Abbau der Futtermittelantibiotika Zink-Bacitracin, Flavophospholipol, Spyracycin und von Tetracyclin in feucht gelagertem und in mit Boden vermischtem Hühnerkot. *Landwirtsch. Forsch., Kongressband* 1977;1:227-234.
- Johnson I, Hervey P. Study on the scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupter priority list of actions. WRC-NSF report UC 6052, 2002
- Johnson AC, Williams RJ. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental science & technology* 2004;38:3649-3658.
- Johnson AC, Williams RJ, Matthiessen P. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Science of the Total Environment* 2005; Available online 1 August 2005.
- Jones AD, Bruland GL, Agrawal SG, Vasudevan D. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005;24:761-770.
- Jongbloed RH, Blankendaal VG, Kan CA, Van Dokkum HP, Bernhard R, Rijs GBJ. Milieurisico's van diergeneesmiddelen en veevoederadditieven in Nederlands oppervlaktewater; een verkennende studie. RIZA Lelystad, The Netherlands. 2001; Report 2001.053.
- Jürgens MD, Williams RJ, Johnson AC. Fate and behaviour of steroid oestrogens in rivers: a scoping study. EA R&D Technical Report P161, 1999.
- Jürgens MD, Holthaus KIE, Johnson AC, Smith JLL, Hetheridge M, Williams RJ. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2002;21:480-488.
- Kay P, Blackwell PA, Boxall ABA. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004;23:1136-1144.

- Kay P, Blackwell PA, Boxall ABA. Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere* 2005;60:497-507.
- Kim S, Carlson K. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. *Water Research* 2006;40:2549-2560.
- Kim S, Carlson K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environmental Science and Technology* 2007;41:50-57.
- Kjær J, Olsen P, Bach K, Barlebo HC, Ingerslev F, Hansen M, Halling-Sørensen B. Leaching of estrogenic hormones from manure-treated structured soils. *Environmental Science & Technology*. Published on web 05/05/2007; DOI 10.1021/es0627747.
- Kolodziej EP, Harter T, Sedlak DL. Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology* 2004;38:6377-6384.
- Kühne M, Ihnen D, Möller G, Aghte O. Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journal of Veterinary Medicine A* 2000;47:379-384.
- Kumar K, Gupta SC, Baidoo SK, Chander Y, Rosen CJ. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality* 2005;34:2082-2085.
- Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Science of the Total Environment* 2002;289:159-168.
- Langhammer JP, Büning-Pfaue H. Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und in landwirtschaftlichen Umfeld. Bonn, Germany: University of Bonn, 1989. Thesis.
- Lee LS, Strock TJ, Sarmah AK, Rao PSC. Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. *Environmental Science and Technology* 2003;37:4098-4105.
- Leonards PEG, Lamoree M, Booy P, van der Horst A, van der Veen I. Validatie van analysemethoden in sediment voor de toepassing van de ER-CALUX® en de DR-CALUX en de bepaling van milieucontaminanten in sediment. IJmuiden: RIVO, 2001a, rapport C078/01.
- Leonards PEG, van der Veen I. Validatie van een GPC-procedure voor de opzuivering van sedimentextracten. IJmuiden: RIVO, 2001b, rapport C077/01.
- Lindsey ME, Meyer M, Thurman EM. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2001;73:4640-4646.
- Loffredo E, Senesi N. Sorption and release of endocrine disruptor compounds onto/from surface and deep horizons of two sandy soils. *Dev Soil Sci* 2002;28A:143-159.
- Loke ML, Tjørnelund J, Halling-Sørensen B. Determination of the distribution coefficient (logKd) of oxytetracycline, Tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere* 2002;48:351-361.
- McGechan MB, Vinten AJA. Simulating transport of E. coli derived from faeces of grazing livestock using the MACRO model. *Soil Use and Management* 2004;20:195-202.
- Mensink BJWG, Montforts MHMM. The ecological risks of antibiotic resistance in aquatic environments: a literature review. Bilthoven, the Netherlands. National Institute for Public Health and the Environment (2007) RIVM report 601500005.
- Mill GMJ, Verhoeven BM, Rijs GBJ. Monitoring geneesmiddelen en oestrogenen 2005. Den Bosch, Waterschap Aa en Maas, 2006.

- Mons MN, Hoogenboom AC, Noij THM. Pharmaceuticals and drinking water supply in the Netherlands. Nieuwegein, the Netherlands: KIWA, 2003. BTO 2003.040.
- Mons MN, Van Genderen J, Van Dijk-Looijaard AM. Inventory on the presence of pharmaceuticals in Dutch water. Nieuwegein, The Netherlands: KIWA, 2000.
- Montforts MHMM. Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products. 1. Other than GMO-containing and Immunological Products. Bilthoven, The Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), 1999. RIVM report 601300001.
- Montforts MHMM, Verschoor AJ. Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products Part 3. Validation of environmental exposure models. Bilthoven, The Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), 2003. RIVM report 601450016.
- Möstl E, Choi HS, Wurm W, Ismail N, Bamberg E. Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 α in faeces. *British Veterinary Journal* 1984;140:287-291.
- Nichols DJ, Daniel TC, Moore PA, Edwards DR, Pote DH. Runoff of estrogen hormone 17 β -estradiol from poultry litter applied to pasture. *J. Environ. Qual.* 1997;26:1002-1006.
- Oliver DM, Clegg CD, Haygarth PM, Heathwaite AL. Determining hydrological pathways for the transfer of potential pathogens from grassland soils to surface waters. *Diffuse Pollution Conference Dublin 2003*;3B: Agriculture:36-41.
- Oliver DM, Heathwaite AL, Haygarth PM, Clegg CD. Transfer of *Escherichia coli* to water from drained and undrained grassland after grazing. *Journal of Environmental Quality* 2005;34:918-925.
- Peterson EW, Davis RK, Orndorff HA. 17 β -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. *Journal of Environmental Quality* 2000;29:826-834.
- Plette S, Van Beek C, Van der Zalm C, Hendriks R. Mest en oppervlaktewater; een synthese van de 3 DOVE projecten ten behoeve van de evaluatie Meststoffenwet 2004. Lelystad : RIZA, 2004. RIZA werkrapport, nr 2004.092x.
- Puister L. Mestaanwending en antibioticagebruik. Wageningen: Landbouw Economisch Instituut, 2004.
- Rabølle M, Spliid NH. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox and oxytetracycline and tylosine in soil. *Chemosphere* 2000;40:715-722.
- Sacher F, Stoks PG. Pharmaceutical Residues in Waters in the Netherlands. Nieuwegein, The Netherlands: Vereniging van Rivierwaterbedrijven (RIWA), 2003. ISBN 90-6683-106-5.
- Samuelsen OB, Lunestad BT, Ervik A, Fjelde S. (1994) Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studies under laboratory conditions. *Aquaculture* 126: 283-290.
- Sangsupan HA, Radcliffe DE, Hartel PG, Jenkins MB, Vencill WK, Cabrera ML. Sorption and transport of 17 beta-estradiol and testosterone in undisturbed soil columns. *Journal of Environmental Quality* 2006;35:2261-2272.
- Schlenker G, Birkelbach C, Glatzel P. Analysis of influence of temperature on the stability of sexual steroids in faeces of cows. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 1999;112:459-464.
- Schlüsener MP, Von Arb M-A, Bester K. Elimination of macrolides, tiamulin and salinomycin during manure storage. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2006;51:21-28.
- Schlüsener MP, Bester K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution* 2006;143:565-571.

- Schmitt H. Verification of soil concentrations of SCP in lab exposed soil samples. Appendix in: Montforts MHMM, Verschoor AJ. Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products Part 3. Validation of environmental exposure models. Bilthoven, The Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), 2003. RIVM report 601450016.
- Schrap SM, Rijs GBJ, Beek MA, Maaskant JFN, Staeb J, Stroomberg G, Tiesnitsch J. Humane en veterinaire geneesmiddelen in Nederlands oppervlaktewater en afvalwater. Lelystad: RIZA, 2003. RIZA report 2003.023.
- Shore L, Gurevitz M, Shemesh M. Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1993a;51:361-366.
- Shore L, Harel-Markowitz E, Gurevich M, Shemesh M. Factors affecting the concentration of testosterone in poultry litter. *Journal of Environmental Science and Health* 1993b;28:1737-1749.
- Shore L, Shemesh M. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry* 2003;75:1859-1871.
- Shore LS, Correll DL, Chakraborty PK. Relationship of fertilisation with chicken manure and concentrations of estrogens in small streams. In: Steele K, (Editor), *Animal waste and the land-water interface*. Boca Raton, USA: CRC Press, 1995. pp. 155-162.
- Shore LS, Reichmann O, Shemesh M, Wenzal A, Litaor MI. Washout of accumulated testosterone in a watershed. *Science of the Total Environment* 2004;332:193-202.
- Soto AM, Calabro JM, Prechtel NV, Yau AY, Orlando EF, Daxenberger A, Kolok IS, Guillette Jr. LJ, Le Bizet B, Lange IG, Sonnenschein C. Androgenic and Estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environmental Health Perspectives* 2004;112:346-352.
- Soulides DA, Pinck LA, Allison FE. Antibiotics in soils: V. Stability and release of soil adsorbed antibiotics. *Soil Science* 1962;94:239-244.
- Ter Laak TL, Gebbink W, Tolls J. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006a;25:904-911.
- Ter Laak TL, Gebbink W, Tolls J. Estimation of soil sorption coefficients of veterinary pharmaceuticals from soil properties. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006b;25:933-941.
- Thiele-Bruhn S, Aust M-O. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2004;47:31-39.
- Thiele-Bruhn S, Seibicke T, Schulten H-R, Leinweber P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environmental Quality* 2004;33:1331-1342.
- Van der Linden S, Felzel EC. Bepaling van de oestrogen activiteit in oppervlaktewater en waterbodembodem extracten met behulp van de ER-CALUX® bioassay. Amsterdam: BDS, 2004, rapport BDS-179-527
- Van Staalduinen LC, Van Zeijts H, Hoogeveen MW, Luesink HH, Van Leeuwen TC, Prins H, Groenwold JG. Het landelijk mestoverschot 2003. Methodiek en berekening. The Hague, The Netherlands: LEI, 2001. Reeks Milieuplanbureau 15.
- Van Vlaardingen PLA, Montforts MHMM. Geneesmiddelen in het milieu. Twee verkennende studies samengevat. Bilthoven: RIVM, 1999. RIVM rapport 734301017.
- Versteegh JFM, Stolker AAM, Niesing W, Muller JJA. Geneesmiddelen in drinkwater en drinkwaterbronnen. Resultaten van het meetprogramma 2002. Bilthoven: RIVM, 2003. RIVM rapport 703719004.
- Vethaak AD, Rijs GBJ, Schrap SM, Ruiter H, Gerritsen A, Lahr J. Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of The Netherlands: Occurrence, Potency and Biological Effects. Lelystad, The Hague, the Netherlands: RIZA/RIKZ, 2002. Report 2002.001.

- Vinten AJA, Douglas JT, Lewis DR, Aitken MN, Fenlon DR. Relative risk of surface water pollution by *E. coli* derived from faeces of grazing animals compared to slurry application. *Soil Use and Management* 2004;20:13-22.
- Vinten AJA, Lewis DR, Fenlon DR, Leach KA, Howard R, Svoboda I, Ogden I. Fate of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157 in soils and drainage water following cattle slurry application at 3 sites in southern Scotland. *Soil Use and Management* 2002;18:223-231.
- Walker A, Rodriguez-Cruz MS, Mitchell MJ. Influence of ageing of residues on the availability of herbicides for leaching. *Environmental Pollution* 2005;133:43-51.
- Walker FR. A fate and transport model of *Cryptosporidium* in the New York city water supply watersheds. Ithaca, USA: Cornell University, 1997.
- Walker FR, Stedinger JR. Fate and transport model of *Cryptosporidium*. *Journal of environmental engineering*. 1999;125:325-333.
- Webb SF. ERA of human pharmaceuticals I - Collation of ecotoxicity data. In: Kümmerer K, *Pharmaceuticals in the environment*. Berlin: Springer Verlag, 2001. pp.
- Wehrhan A, Kasteel R, Simunek J, Groeneweg J, Vereecken H. Transport of sulfadiazine in soil columns - experiments and modelling approaches. *Journal of Contaminant Hydrology* 2007;89:107-135.
- Williams RJ, Johnson AC, Smith JL, Jürgens MD, Holthaus K. Fate and behaviour of steroid oestrogens in aquatic systems. EA R&D Technical Report P2-162/TR, 2001
- Winckler C, Grafe A. Charakterisierung und Verwertung van Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden. Stoffeintrag in Böden durch Tierarzneimittel und pharmakologisch wirksame Futterzusatzstoffe unter besonderer Berücksichtigung von Tetracyklinen. Berlin, Germany: UBA, 2001a. UBA report 29733911 - UBA-FB 000074.
- Winckler C, Grafe A. Transfer of veterinary drugs and pharmacologically-active feed additives into soil with special consideration of tetracyclines - executive summary. *Journal of soils and sediments* 2001b;1:58-62.
- Winckler C, Grafe A. Use of veterinary drugs in intensive animal production: evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *Journal of soils and sediments* 2001c;1:66-70.
- Ying G-G, Kookana RS. Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005;24:2640-2645.
- Young WF, Whitehouse P, Johnson I, Sorokin N. Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters. WRc-NSF report EA5098, 2002
- Yu ZQ, Huang WL. Competitive sorption between 17 alpha-ethinyl estradiol and naphthalene/phenanthrene by sediments. *Environmental Science and Technology* 2005;39:4878-4885.

Bijlage 1: Mestaanwending in Nederland

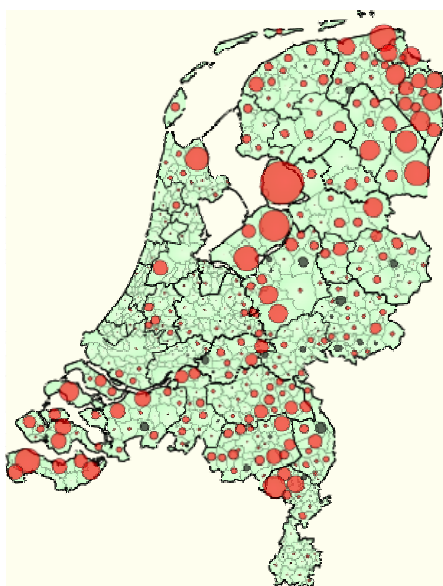
Onderstaande figuren geven de mestaanwending per gemeente weer. Onder mestaanwending wordt verstaan de productie in die gemeente, minus de afvoer, plus de aanvoer. In deze bijlage worden de figuren weergegeven van dunne rundveemest, vaste pluimveemest, dunne vlees- en dunne fokvarkensmest. Deze gegevens zijn van het jaar 2002.

De vaste pluimveemest in de figuur is niet voor 100% afkomstig van vleeskuikens. Van de vaste pluimveemest is 20% afkomstig als droge mest van batterijhennen. Echter de overige 80% is niet alleen van vleeskuikens. Strooiselmest bestaat namelijk ook uit mest van kalkoenen, vleeskuikenouderdieren en leghenouderdieren. De antibioticagegevens uit hoofdstuk 3 gaan alleen over vleeskuikens.

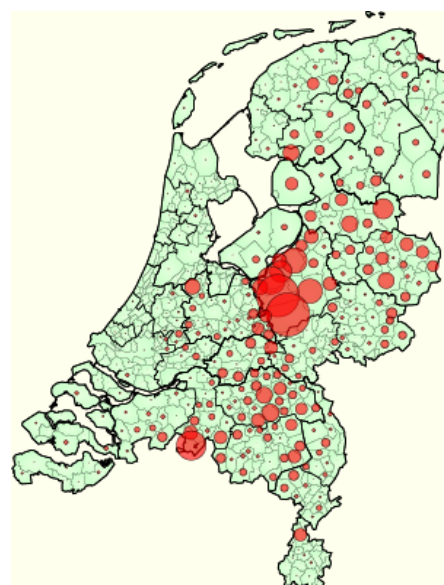
Daarom dient hier gekeken te worden naar het percentage van de vaste pluimveemest in de CBS-gegevens dat alleen voor vleeskuikens van toepassing is. Dat is ongeveer 45% (interne LEI-informatie).

De figuur voor dunne pluimveemest wordt niet weergegeven, omdat dunne pluimveemest altijd afkomstig is van leghennen. Leghennen krijgen geen antibiotica. Ook de figuur voor pluimveemestkorrels wordt niet weergegeven. Deze mest wordt niet gebruikt op Nederlandse bodem.

Voor een beter beeld van de GIS-plaatjes, kan ook op internet worden gekeken. Dan verschijnt bij het aanwijzen met de muis van een bepaalde gemeente (a) naam van de gemeente, (b) het exacte getal (x 1.000 kg) van de hoeveelheid aangewende mest in die gemeente en (c) de grenzen van die gemeente.



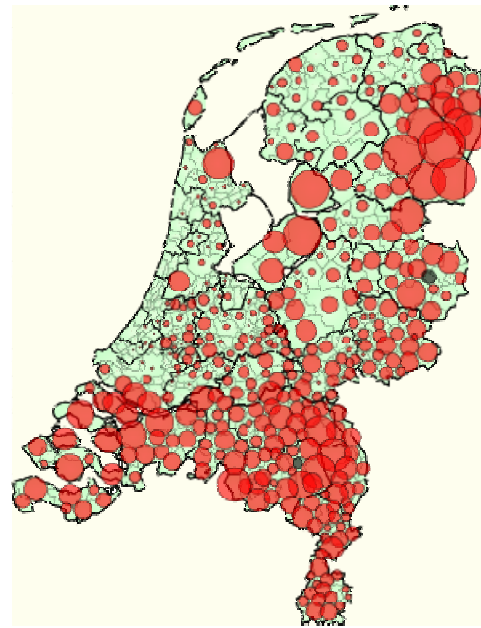
Vaste pluimveemest



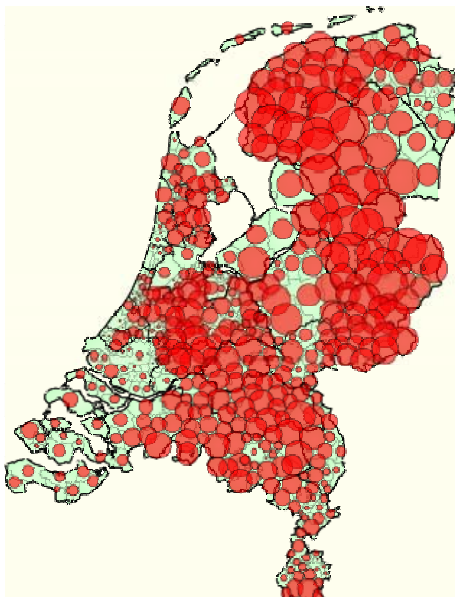
Dunne kalvermest

<http://www.cbs.nl/nl-NL/menu/cijfers>
Kies statline. Hoofdgroepen: landbouw;
mest en mineralen; dierlijke mest;
transport en gebruik van mest en
mineralen. Onderwerpen: gebruik van mest
en mineralen; mestsoorten. Hier de
gewenste mestsoort selecteren. Regio:
gemeenten. Perioden: 2002. Klik
vervolgens op “gegevens tonen” om de
taakbalk te tonen en dan op het plaatje van
Nederland. Nu verschijnt een figuur zoals
op deze pagina’s is weergegeven.

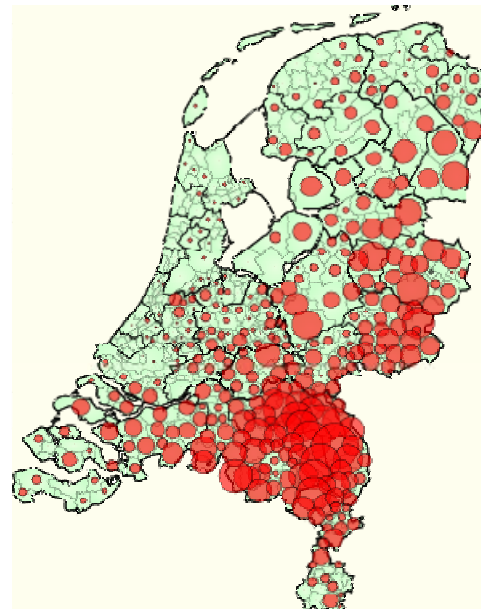
De cirkels geven het gebruik van mest
(tonnage) per gemeente weer. De diameter
van de cirkel is de maat voor het tonnage.
De figuren geven houvast bij de selectie
van locaties verdeeld over zand- veen of
kleigronden en het te verwachten
mestgebruik (Puister, 2004).



Dunne vleesvarkensmest



Dunne rundveemest



Dunne fokvarkensmest

Bijlage 2: Gegevens over het voorkomen en het gedrag in het milieu van hormonen en diergeneesmiddelen

De openbare wetenschappelijke literatuur bevat diverse publicaties over het voorkomen van diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in het oppervlaktewater en sediment. De gegevens met betrekking tot het voorkomen in watersystemen in het landelijk gebied, die minimaal beïnvloed zijn door antropogene verontreiniging, worden in deze bijlage samengevat.

Diergeneesmiddelen in mest, bodem, water en sediment

In deze paragraaf worden beschikbare gegevens over voorkomen en gedrag van tetracyclines en sulfonamiden samengevat.

In een veldstudie in Engeland is de uitspoeling van oxytetracycline (OTC) en sulfachloropyridazine (SCP) bepaald. Het massatransport van de geneesmiddelen vanuit de bodem naar drainagewater bedroeg minder dan 0,5% van de op het land opgebrachte dosis. Piekconcentraties in het drainagewater bereikten 36 µg/l voor OTC en 613 µg/l voor SCP (Kay et al., 2004). In een Italiaans onderzoek werd geen OTC gevonden in kavelsloten naast behandelde akkers. De detectielimiet (LOD) bedroeg 1 µg/l (De Liguoro et al., 2003). In een Amerikaans onderzoek bevatte 31% van de watermonsters naast varkensbedrijven en 67% van de monsters naast pluimveebedrijven concentraties chlor- oxy- en tetracycline, sarafloxacin, lincomycine en sulfadimethoxine, in het algemeen in gehalten <4 µg/l (Campagnolo et al., 2002). In een Amerikaans onderzoek werd sulfamethoxazole gevonden in een van de zes grondwatermonsters, in Washington (0,22 µg/l). Sulfamethoxazole, sulfadimethoxane, sulfamethazine, sulfathiazole, en chlortetracycline, oxytetracycline, en tetracycline werden gevonden in oppervlaktewatermonsters van negen locaties in concentraties van 0,07 - >15 µg/l (Lindsey et al., 2001).

In een onderzoek naar de potentie voor afspoeling is vastgesteld dat tylosine, oxytetracycline en tetracycline relatief weinig afspoelen vergeleken met sulfonamiden, erythromycine en monensin. Met name monensin spoelde 20-40 maal meer af. Monensin spoelt voornamelijk af met het water; terwijl tylosine, oxytetracycline en tetracycline voornamelijk met de sedimentfractie meespoelen (Davis et al., 2006). Het volume afspoeling van grasland wordt versterkt door de aanwezigheid van mest, mogelijk doordat het bodemoppervlak dichtslibt. De afspoeling van sulfonamiden werd daardoor 10 tot 40 maal hoger vergeleken met grasland zonder mest (Burkhardt et al., 2005).

Halfwaardetijden voor de stofgroep van de tetracyclines als geheel in de bodem variëren tussen 4 en 175 dagen, afhankelijk van matrix, aanwezigheid van zuurstof en temperatuur (Jagnow, 1977; Kühne et al., 2000; Winckler en Grafe, 2001a). In met mest behandelde

veldbodem (Nebraska, USA) was de halfwaardetijd van oxytetracyclinehydrochloride (OTC) ($M_w=496,9$ g/mol CAS no. 2058-46-0) kleiner dan drie weken, terwijl het totaalgehalte van structureel verwante stoffen (afbraakproducten) niet afgenomen was na 5 maanden (Aga et al., 2005). De omzetting van OTC in bodemporiewater is gekarakteriseerd door middel van LC-MS-MS (Halling-Sørensen et al., 2003). De metaboliet 4-epi-oxytetracycline (EOTC) ($M_w=460,4$ g/mol) (CAS no. 35259-39-3) wordt tot 60% gevormd uit OTC; de DT50 bedraagt 142 dagen. OTC is vermoedelijk persistent in water/sediment en zal een sterke sorptie aan minerale en organische fracties vertonen. Gerapporteerde halfwaardetijden voor dissipatie in sediment bedragen 9-414 dagen (Boxall et al., 2002b); in bodemporiewater 39 dagen (Halling-Sørensen et al., 2003). Door compostering verdween 95% van het oxytetracycline in kalvermest binnen 6 dagen, terwijl tijdens opslag bij kamertemperatuur hooguit 12% verdween na 37 dagen (Arikan et al., 2007). Adsorptie van OTC aan de bodem wordt met name veroorzaakt door bodemtextuur, CEC, en ijzeroxide (Soulides et al., 1962; Jones et al., 2005). Adsorptieconstanten voor bodem zijn bepaald op $\log K_{oc}$ 2,8-6 l/kg (Rabølle en Spliid, 2000; Jones et al., 2005; Ter Laak et al., 2006a; Ter Laak et al., 2006b); voor mest op $\log K_d$ 1,5-2 l/kg (Loke et al., 2002). De sorptie is pH afhankelijk. Ondanks sterke binding aan bodem vertoont gebonden OTC antimicrobiële activiteit (Chander et al., 2005). In aanwezigheid van mest vertoonde OTC effecten op planten bij concentraties die dit niet lieten zien zonder mest (Boleas et al., 2005). Onder normale condities zal de aanwezigheid van mest de pH van de bodem niet zodanig veranderen dat het een invloed heeft op de uitspoeling van OTC. De uitspoeling van OTC lijkt, ondanks de hoge sorptieconstanten, niet bepaald te worden door colloïdale of geadsorbeerde deeltjes (Kay et al., 2004; Kay et al., 2005). Chlortetracycline kon worden opgenomen uit de bodem door planten, zij het in lage concentraties (2-17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ versgewicht) (Kumar et al., 2005).

Sulfachloropyridazine (SCP) is zeer mobiel in de bodem. De K_d is bepaald op 0,4 tot 35 l/kg (Boxall et al., 2002a; Ter Laak et al., 2006a; Ter Laak et al., 2006b). Van sulfathiazole wordt een K_d van 4,9 l/kg gerapporteerd door Thiele-Bruhn en Aust (2004) met bronvermelding van Langhammer (1989). Sulfapyridine (SPY) is zeer mobiel in de bodem. De K_d is bepaald in twee gronden op 3,47 en 1,02; en 3,22 l/kg; K_{oc} 215 en 63 l/kg (gemiddeld 139 l/kg) en 134 l/kg (Thiele-Bruhn et al., 2004; Thiele-Bruhn en Aust, 2004). De gemiddelde K_{oc} voor SPY is 136 l/kg. Sulfanilamide (SAA) is zeer mobiel in de bodem. De K_f is bepaald in een grond op 0,57 l/kg; K_{oc} 35 l/kg (Thiele-Bruhn en Aust, 2004). Sulfadimidine (SDM) is zeer mobiel in de bodem. De K_f is bepaald in een grond op 0,79 l/kg; K_{oc} 49 l/kg. Dit resultaat is in de range van data van Langhammer (1989) (K_d 0,88-3,47 l/kg) volgens Thiele-Bruhn en Aust (2004). Sulfadiazine (SDZ) is zeer mobiel in de bodem. De K_f is bepaald in een grond op 2,00 l/kg; K_{oc} 124 l/kg (Thiele-Bruhn en Aust, 2004). De uitspoeling zou het best met een model met drie soorten bindingsplaatsen beschreven worden; de sorptieconstante K_f wordt geschat in de range van 0,02 tot 5 l/kg. Voor de grond met 3,3% organische koolstof zijn de K_{oc} 0,6 – 150 l/kg (Wehrhan et al., 2007). Sulfadimethoxine (SDT) is zeer mobiel in de bodem. De K_f is bepaald in een grond op 0,73 l/kg; K_{oc} 45 l/kg (Thiele-Bruhn en Aust, 2004). Sulfamethoxazole (SMX) is zeer mobiel in de bodem. De K_f is bepaald in een grond

op 0,28 l/kg; Koc 62 l/kg (Drillia et al., 2005b). Sulfadimidine- en sulfathiazoleconcentraties in (anaerobe) gier namen toe met de tijd (40 dagen) door terugvorming uit N4-acetylmetaboliëten (Langhammer en Büning-Pfaue, 1989). Sulfonamiden zijn echter niet persistent in bodem en water. In een onderzoek naar de afbreekbaarheid van verschillende sulfonamiden in actief slib zijn twaalf verbindingen (inclusief sulfadiazine) getest. Bij kamertemperatuur werden residuen geëlimineerd binnen 10 dagen na een 'lag-phase' van 7 dagen. Bij 6 °C was de lag-phase 34-47 dagen en de eliminatietijd 12 tot 30 dagen (Ingerslev en Halling-Sørensen, 2000). In een vergelijkend onderzoek naar de omzetting van sulfamethoxazole in actief slib bleek dat de stof als koolstof- en als stikstofbron dient. Indien alternatieve bronnen voorhanden zijn, wordt de stof niet afgebroken (Drillia et al., 2005a). In grond bedroeg de halfwaardetijd van sulfachloropyridazine 5 tot 11 dagen bij 25°C (Schmitt, 2003) in (Montforts and Verschoor, 2003). Teruggerekend naar 10 °C bedraagt de halfwaardetijd 17-37 dagen (Montforts, 1999). In steriele bodem bedroeg de halfwaardetijd van sulfadimidine ongeveer 2 dagen, in fertiele bodem ongeveer 1 dag (20 °C) (Langhammer en Büning-Pfaue, 1989).

In marien sediment onder laboratoriumomstandigheden, bij 8°C in het donker, is flumequine zeer slecht afbreekbaar (Samuelsen et al., 1994). Onder veldomstandigheden is dit eveneens het geval (Hektoen et al., 1995).

Hormonen in mest, bodem, water en sediment

In een onderzoek van Kolodziej et al. (2004) zijn een reeks van androgenen, oestrogenen en progestines gemeten in melkveebedrijven. Drijfmest van melkveebedrijven bevatte tot 650 ng/l aan oestron, tot 10 ng/l 17β-oestradiol, en tot 100 ng/l medroxyprogesteron en testosteron. Opvallend was de grote spreiding afhankelijk van de tijd en de locaties. Testosteron, medroxyprogesteron en oestron werden lokaal aangetroffen in putten in het veld. In ondiep grondwater werd de aanwezigheid van deze hormonen in een enkel geval gesignaleerd, maar onder de kwantificatiegrens. In oppervlaktewater werd meestal oestron aangetroffen. De hoogste concentratie was tot 17 ng/l in drainagewater na een regenbui. De hoogste concentratie testosteron was 1,9 ng/l in een irrigatiekanaal. Oestradiol was altijd <1 ng/l. De concentraties steroïden correleerden niet met die van nitraat. De sporadische aanwezigheid in putten, en de relatief hoge concentraties in irrigatiekanalen, wijzen erop dat de hormonen sterk geadsorbeerd worden in de bodem en daarbij blootstaan aan degradatie, terwijl preferente stroming en run-off bij perioden van regen voor blootstelling van het water zorgen.

Het doel van het onderzoek van Burnison et al. (2003) was gericht op het gebruik van biomarkers om oestrogene stoffen aan te tonen in mest en run-off. De aanwezigheid van deze stoffen werd bevestigd in drainagewater dat verkregen is door 3 uren na een regenbui, nadat varkensmest opgebracht (zonder inwerken) was, 4 liter te verzamelen. De oestrogene activiteit was met name gerelateerd aan (waarschijnlijk) 17α-oestradiol (<5 ng/l) en oestron

(tot 25 ng/l). Behalve oestradiol en oestron blijkt equol (fyto-oestrogeen uit soja) aanwezig te zijn in de mest (tot 265 ng/l in het drainagewater), maar deze stof is tot 1000 maal minder potent dan 17β -oestradiol. Het drainagewater veroorzaakte respons in de YES bioassay (gistcellen). Het artikel vermeldt niet welke concentraties hormonen in de mest gemeten zijn, en niet hoeveel mest opgebracht is per hectare. Ook is niet gerapporteerd hoeveel drainagewater door de regenbui verplaatst is, dus welke fractie uiteindelijk verplaatst is.

Ook in oppervlaktewater in verbinding met rundveebedrijven of graslanden in Nebraska en South Carolina, USA, zijn regelmatig over meerdere jaren lage concentraties oestradiol en oestron (tot 8,5 ng/l) gemeten (Irwin et al., 2001; Soto et al., 2004).

In een Canadees experiment werd 4 uur na een regenbui drainagewater opgevangen van een stuk grond waarop varkensmest was gespoten. Er werd oestrogene activiteit gemeten in het drainagewater met een YES-bioassay, terug te voeren op met name oestradiol en oestron (Burnison et al., 2003).

In een experiment in Maryland (USA) werden oestrogenen (oestron en oestradiol) gevonden in run-off van met kippenmest behandelde velden (14-20 ng/l) (Shore et al., 1995).

In recent Deens veldonderzoek werd oestron en oestradiol aangetoond in drainagewater van bemeste akkers tot drie maanden na bemesting. De hoogste gemeten concentraties waren 68 en 2,5 ng/L, respectievelijk (Kjær et al., 2007).

Over de biologische afbreekbaarheid van de natuurlijke hormonen en adsorptie aan de bodem zijn verscheidene onderzoeken gerapporteerd. (Arcand-Hoy et al., 1998) In een onderzoek naar de oestrogene activiteit van rundermest bij 30°C bleek dat deze, uitgedrukt als oestron-equivalenten, gedurende twee weken niet veranderde, en daarna binnen een week verdwenen was. Bij 5°C was de verdwijning beduidend langzamer; na 13 weken was de activiteit nog meer dan 10% van de hoogst gemeten waarde (Schlenker et al., 1999). Tijdens het composteren (30-70°C) van droge kippenmest verdween oestradiol met een halfwaardetijd van 69 dagen (Hakk et al., 2005).

De adsorptie van 17β -oestradiol hangt samen met de CEC (cation exchange capacity), met een sterke correlatie met klei en organisch materiaal. K_F waarden in bodem zijn gemeten in de range van 86 – 6670 l/kg, met K_{om} -waarden van 1800-72500 l/kg (mediaan 2600 l/kg) (Casey et al., 2003). In vier andere bodems zijn K_d -waarden in de range 31-123 l/kg gemeten, K_{oc} 2800-4200 l/kg, gemiddelde 3700 l/kg (gemiddelde K_{om} circa 2200 l/kg) (Ying en Kookana, 2005). De resultaten van sorptie-experimenten met grond van ongestoorde kolommen, zowel van geploegde als ongeploegde bodems, en van verschillende laagdieptes, zijn iets lager: K_{om} -waarden zijn 700-1400 L/kg. De kolomexperimenten tonen aan dat oestradiol met preferente stroming diepere lagen kan bereiken (Sangsupan et al., 2006). Hildebrand et al. (2006) bepaalden voor oestradiol in een zandbodem een K_f van 34 l/kg ($1/n$ 1,257); K_{om} 2100 l/kg. Lai et al. (2002) bepaalden voor oestradiol in een waterbodem een K_f van 36 l/kg ($1/n$ 0,67); K_{om} 1900 l/kg. Lee et al. (2003) bepaalden K_{om} -waarden van oestradiol: K_{om} 950 L/kg in een sediment; 1700 L/kg in een bodem. Holthaus et al. (2002) bepaalden in riviersedimenten K_d -waarden voor oestradiol van 8 tot 121 l/kg; en in zwevend

materiaal van 19 tot 260 l/kg. De bijbehorende Kom-waarden zijn in de range van 380 tot 3300 l/kg.

In vier bodems zijn voor oestron Kd-waarden in de range 26-108 l/kg gemeten, Koc 2000-3700 l/kg, gemiddelde 2900 l/kg (gemiddelde Kom circa 1700 l/kg) (Ying en Kookana, 2005). Hildebrand et al. (2006) bepaalden voor oestron in een zandbodem een Kf van 407 l/kg (1/n 0,917); Kom 25000 l/kg. Lai et al. (2002) bepaalden voor oestron in een waterbodem een Kf van 54 l/kg (1/n 0,73); Kom 2900 l/kg. Lee et al. (2003) bepaalden Kom waarden van oestron: Kom 910 l/kg in een sediment; 980 l/kg in een bodem.

In vier bodems zijn voor oestriol Kd waarden in de range 9-68 l/kg gemeten, bijbehorende Koc 900-2300 l/kg, gemiddelde 1400 l/kg (gemiddelde Kom circa 800 l/kg) (Ying en Kookana, 2005). Lai et al. (2002) bepaalden voor oestriol in een waterbodem een Kf van 21 l/kg (1/n 0,57); Kom 1100 l/kg.

Hildebrand et al. (2006) bepaalden voor ethinyl-oestradiol in een zandbodem een Kf van 27 l/kg (1/n 0,997); Kom 1700 l/kg. In een silt loam waren deze waarden Kf 30 l/kg (1/n 1,11) Kom 660 l/kg. In een silty clay waren de waarden Kf 96 l/kg (1/n 0,963) met een Kom 1500 l/kg. In een clay loam waren deze waarden Kf 121 l/kg (1/n 0,847) met een Kom 2300 l/kg. Loffredo en Senesi (2002) bepaalden Kom waarden voor ethinyl-oestradiol in de range van 370-920 l/kg in twee zandbodems met grond van zowel de oppervlakte als een diepere horizon. De adsorptie van ethinyl-oestradiol aan riviersediment K_f is in de orde van 0,07-0,15 l/kg (Koc 15000, 8000, en 5000 l/kg) maar vermindert in aanwezigheid van sterk adsorberende stoffen als fenantreen en naftaleen (Yu en Huang, 2005). Lai et al. (2002) bepaalden voor ethinyl-oestradiol in een waterbodem een Kf van 52 l/kg (1/n 0,83); Kom 2800 l/kg. Lee et al. (2003) bepaalden Kom waarden van ethinyl-oestradiol: Kom 620 l/kg in een sediment; 640 en 480 l/kg in twee bodems. Holthaus et al. (2002) bepaalden in riviersedimenten Kd waarden voor ethinyl-oestradiol van 4 tot 74 l/kg; en in zwevend materiaal van 21 tot 122 l/kg. De bijbehorende Kom waarden zijn in de range van 850 tot 6000 l/kg.

De sterke sorptie van oestradiol hindert een snelle afbraak niet: DT50 waarden van 0,4-10 dagen voor oestradiol in bodem werden bepaald bij 20°C (Das et al., 2004). Deze waarnemingen staan naast die van een snelle omzetting tot grondgebonden residu van zowel oestradiol als ethinyl-oestradiol (Colucci en Topp, 2002). De gemiddelde halfwaardetijd voor oestradiol was 0,11 dagen bij 30°C; en voor ethinyl-oestradiol 0,83 dagen. Ook oestron, als metaboliet, verdween binnen drie dagen. In laboratoriumstudies werd de halfwaardetijd van oestradiol en van oestron bepaald bij verschillende temperaturen en vochtgehaltes. Oestron werd gevormd uit oestradiol onder zowel non-steriele als steriele condities; terwijl oestron stabiel was onder steriele condities. In drie bodems werden bij 30°C en 1 mg/kg gehalten van 56 tot 91% grondgebonden residu gevormd binnen drie dagen, terwijl de totale mineralisatie na 91 beperkt bleef tot 11-17%. De DT50-waarden voor dissipatie van oestradiol waren 0,3; 0,2; en 0,5 dagen; de DT50 voor de oestrogene activiteit bedroeg respectievelijk 0,5; 0,6; 0,8

dagen. Voor oestron werden DT50-waarden voor dissipatie bepaald van 0,9; 1,7; en 0,6 dagen; en voor oestrogene activiteit van 1,1; 2,3; en 1,3 dagen. Bij een dosering van 10 mg/kg bleek dat bij toenemende temperatuur over het traject 4-30°C de mineralisatie toeneemt; daarboven niet. Bij 4, 10, 19 en 30 °C bedroegen de DT50 voor dissipatie 3,3; 1,9; 1,5 en 1,3 dagen. Voor de oestrogene activiteit zijn de waarden 5,3; 5,3; 4,6; en 5,8 dagen (Colucci et al., 2001). In een studie naar de omzetting van oestradiol in bodem bij verschillende temperaturen (4-30°C) en verschillende mestconcentraties verliep de omzetting compleet binnen vijf tot tien dagen. Voor mineralisatie van oestradiol is een gezonde microflora noodzakelijk (Jacobsen et al., 2005). De aerobe omzetting in bodem van oestradiol en oestron in een andere studie was eveneens vrijwel compleet binnen 7 dagen bij 20°C (Ying en Kookana, 2005). Deze gegevens wijzen op een snelle omzetting in de bodem bij gematigde temperaturen, met name door vorming van grondgebonden residu. De halfwaardetijd voor de verdwijning van oestradiol en de oestrogene activiteit is in de orde van respectievelijk 2 en 5 dagen bij 10 °C. Gebonden residuen zijn deels beschikbaar voor omzetting en hormonaal actief. Ondanks de sterke binding en snelle afbraak in bodem spoelde van 20 en 30% van de toegevoegde dosis 17 β -oestradiol uit de paardenmest resp. kippenmest, tengevolge van een gesimuleerde regenbui. In het experiment met kippenmest was het verlies na een tweede regenbui 69% van het verlies na de eerste bui, hetgeen in verhouding staat tot het resterende gehalte na de eerste bui (Nichols et al., 1997; Busheé et al., 1998).

Concentraties hormonen in oppervlaktewater worden doorgaans geassocieerd met de aanwezigheid van lozingen van ongezuiverd huishoudelijk afvalwater, zoals riooloverstorten en verspreide bebouwing, en de aanwezigheid van rioolwaterzuiveringen (rwzi-) effluenten (Baronti et al., 2000; Johnson en Williams, 2004). Een overzicht van het gedrag van hormonen in het watermilieu en de mogelijke effecten voor waterorganismen is gegeven in twee Britse studies van WRc-NSF (Jürgens et al., 2002). De meest uitgebreide studies vermelden dat biologische afbraak een belangrijk verwijderingsproces is (Jürgens et al., 2002). Daarnaast treedt sorptie op aan de waterbodem. In laboratoriumstudies met Brits rivierwater varieerden de halfwaardetijden voor hoge concentraties oestradiol van 0,2 tot 8,7 dagen bij 20°C en voor oestron van 0,1 tot 10,9 dagen. Hierbij wordt oestradiol omgezet in oestron. Bij een temperatuur van 10°C waren de halfwaardetijden circa het dubbele dan bij 20°C (Jürgens et al., 2002). Voor meer realistische concentraties oestron en oestradiol (circa 0,5 μ g/l) in Brits rivierwater varieerden de halfwaardetijden tussen 1,5 en 4 dagen (Jürgens et al., 2002). Voor oestradiol en ethinyl-oestradiol zijn halfwaardetijden van 4 tot 10 dagen in water/sediment mengsels bepaald; in water/bodem mengsels waren de halfwaardetijden 0,8-6,5 dagen (Lee et al., 2003). Uit adsorptieproeven (Jürgens et al., 2002) blijkt dat adsorptie van de hormonen veel beter verloopt bij zwevende stof in water dan aan het bodemsediment. De partiticoëfficiënt K_d varieerde voor oestradiol voor bodemsediment van 4-72 l/kg en bij gesuspenderd materiaal van 21-159 l/kg.