

BTO 2018.105 | November 2019

BTO rapport

Literatuurstudie groei en overleving van waterpissebedden in het milieu, op water en sediment uit het distributiegebied

BTO

Literatuurstudie groei en overleving van waterpissebedden in het milieu, op water en sediment uit het distributiegebied

BTO 2018.105 | November 2019

Opdrachtnummer

402045-046

Projectmanager

Dr.ir. Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO – Bedrijfsonderzoek Evides

Kwaliteitsborgers

Dr. ir. Michiel Hootsmans (gedelegeerde borger, alle hoofdstukken), prof. dr. Gertjan Medema (hoofdstuk 2)

Auteurs

dr. ir. Nikki van Bel en dr. ir. Anthony Verschoor

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten. Een jaar na publicatie is het openbaar.

Jaar van publicatie

2019

Meer informatie

dr. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

Keywords

Asellus, *Aeromonas*, sediment, overleving

Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



BTO 2018.105 | November 2019 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

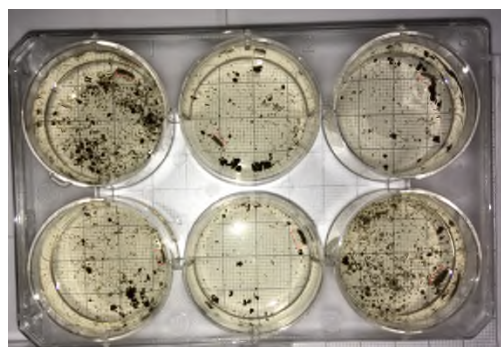
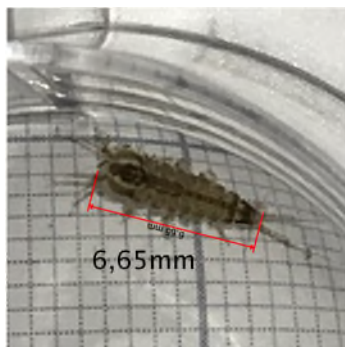
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

Sediment kwaliteit beïnvloedt de overleving van waterpissebedden en kan zo het vóórkomen van Aeromonas mede bepalen

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

In bepaalde delen van het distributiegebied van Evides wordt regelmatig de norm voor *Aeromonas* overschreden. Omdat er waarschijnlijk verband is tussen *Aeromonas* en het voorkomen van waterpissebedden in drinkwaterleidingen is onderzoek gedaan naar de levenscyclus en de natuurlijke voedselbron(nen) van waterpissebedden in het distributienet. Daarnaast is een kweekstelsel voor waterpissebedden opgezet en een testopzet bedacht en getest om het effect van de aanwezigheid van sediment en/of bladmateriaal te meten. Bij het testen van die laatste methode bleek dat de experimentele opzet werkt en dat waterpissebedden goed lijken te groeien op bladmateriaal, maar niet of nauwelijks op sediment uit drinkwaterleidingen. De testopzet kan nu worden ingezet om op basis van verdere experimenten uitspraken te doen over groei en overleving op sediment van verschillende herkomsten gedurende een langere periode. Deze kennis draagt bij aan het oplossen van de *Aeromonas*-normoverschrijdingen in meerdere distributiegebieden.



Lengtemeting van een waterpissebed (links) en overleving en sterfte van waterpissebedden in een 6-wells plaat in water en sediment

Belang: verband tussen *Aeromonas* bacteriën en waterpissebedden in drinkwater ophelderen

De *Aeromonas*-bacterie is opgenomen in het Drinkwaterbesluit en wordt gebruikt als indicator voor de biologische stabiliteit van drinkwater. De groei van *Aeromonas* staat onder invloed van de temperatuur en het gehalte aan voedingsstoffen in het water. Waarschijnlijk is er ook een verband tussen *Aeromonas* en waterpissebedden (*Asellus*) die voorkomen in drinkwaterleidingen, maar over de aard van dit verband is nog weinig bekend. Mogelijk scheiden waterpissebedden en andere

ongewervelde dieren stoffen uit die *Aeromonas* kan benutten voor groei in drinkwater, of *Aeromonas* kan groeien in of op de waterpissebed zelf. Zo is vermeerdering van *Aeromonas* waargenomen in aanwezigheid van (dode) waterpissebedden bij groeiproeven.

Omdat in bepaalde delen van het distributiegebied van Evides de norm voor *Aeromonas* regelmatig wordt overschreden, wil Evides meer weten over de levenscyclus en de natuurlijke voedselbron(nen) van waterpissebedden in het distributienet. Eigen onderzoek van Evides doet

vermoeden dat water en sediment uit verschillende distributiesystemen verschillende effecten kunnen hebben op groei en/of overleving van waterpissebedden, en mogelijk dus ook op *Aeromonas*.

Aanpak: literatuuronderzoek en opzetten groei- en overlevingsexperimenten met waterpissebedden

In een literatuuronderzoek zijn op basis van wetenschappelijke literatuur en oude studies van KWR/Kiwa de voedselbronnen en levenscyclus van waterpissebedden in kaart gebracht. Op basis van deze informatie zijn protocollen opgezet en getest voor een kweekmethode voor waterpissebedden en voor een experimentele opzet om de groei en overleving van waterpissebedden onder verschillende omstandigheden te testen. Die laatste methode is gebruikt om de groei en overleving van *Asellus* te testen met en zonder sediment uit verschillende distributiegebieden.

Resultaten: sediment van Kralingen verhoogt sterfte van waterpissebedden.

Levenscyclus

De levenscyclus van waterpissebedden is sterk afhankelijk van de watertemperatuur. Pas bij een temperatuur boven 3-5°C kunnen waterpissebedden groeien en geslachtsrijp worden. De broedtijd na geslachtelijke voortplanting is ook temperatuurs-afhankelijk; uit elke broedzak komen 20-100 kleine waterpissebedden vrij.

Verspreiding

Waterpissebedden worden over het algemeen meer gevonden in gietijzeren leidingen dan in pvc-leidingen. Hun voorkomen lijkt gerelateerd te zijn aan de hoeveelheid sediment. Waterpissebedden kunnen tegen de stroomrichting in drinkwaterleidingen lopen, of juist met het water mee drijven en zo actief of passief migreren naar gebieden met een andere voedselkwaliteit. Bestrijding in drinkwaterdistributiegebieden is erg lastig aangezien waterpissebedden bestand zijn tegen veel middelen en maatregelen.

Groei en overleving

Waterpissebedden kunnen groeien op drinkwatersediment. Groei en overleving lijken afhankelijk te zijn van zowel de hoeveelheid als

de herkomst (kwaliteit) van het sediment. In groei-experimenten is meestal na 3-4 weken verschil in lengte(groei) te zien tussen de verschillende voedselbronnen. Er is echter ook veel variatie gevonden binnen de verschillende testen met dezelfde sedimentherkomst. Die laatste variatie kan zelfs groter zijn dan de verschillen die optreden tussen sedimenten van verschillende herkomst.

Kweekstelsel

Uit de literatuur blijkt veel variatie te bestaan in de waterpissebedden-kweeksystemen, onder andere in temperatuur, licht-donkericyclus en voedselbron. In de meeste systemen overleven waterpissebedden en soms vindt ook voortplanting plaats. In dit onderzoek is succesvol een kweekstelsel opgezet waarin groei en voortplanting plaats vindt.

Test overlevingsexperiment op bladmateriaal/sediment

Een test van het protocol voor de groei- en overlevingsexperimenten laat zien dat waterpissebedden goed groeien in water met bladmateriaal, maar niet of nauwelijks op drinkwatersediment. In het groei-experiment is verschil in lengte(groei) te zien tussen de verschillende voedselbronnen.

Implementatie: optimalisatie protocol en uitvoeren groei- en overlevingsexperimenten met sediment

Na optimalisatie van een aantal experimentele onderdelen van het groei- en overlevingsexperiment kunnen in een vervolgonderzoek meerdere typen voedsel getest worden gedurende een langere periode. Voor toekomstige experimenten moet eerst een poweranalyse worden uitgevoerd om uit te rekenen hoeveel waterpissebedden nodig zijn om significante verschillen te kunnen meten. Hiervoor wordt de informatie van de literatuurstudie gebruikt.

Rapport

Dit onderzoek is uitgevoerd binnen het Bedrijfsonderzoek voor Evides en beschreven in het rapport *Literatuurstudie groei en overleving van waterpissebedden in het milieu, op water en sediment uit het distributiegebied* (BTO 2018.105).

Inhoud

| | |
|--|-----------|
| Inhoud | 3 |
| 1 Aanleiding onderzoek | 4 |
| 1.1 Belang en doel | 4 |
| 1.2 Doel | 5 |
| 1.3 Opzet van het onderzoek | 5 |
| 2 Literatuuronderzoek waterpissebedden | 6 |
| 2.1 Aanleiding | 6 |
| 2.2 <i>Asellus</i> in het milieu | 7 |
| 2.3 Levenscyclus van <i>Asellus</i> in verschillende milieus | 7 |
| 2.4 Aanwezigheid, effecten en bestrijding van <i>Asellus</i> in het drinkwaterdistributienet | 9 |
| 2.5 Voedselbronnen van waterpissebedden | 13 |
| 2.6 Kweek van <i>Asellus</i> in laboratorium | 19 |
| 2.7 Eerder experimenteel onderzoek door KIWA/KWR | 20 |
| 2.8 Conclusies voor vervolgentoelagen | 22 |
| 3 Methode ontwikkeling <i>Asellus</i> kweek | 24 |
| 3.1 Verzamelen van <i>Asellus</i> | 24 |
| 3.2 Opzet <i>Asellus</i> kweek | 25 |
| 4 Methode ontwikkeling groei- en overlevingsexperiment | 29 |
| 4.1 Materiaal en methoden | 29 |
| 4.2 Resultaten en discussie | 31 |
| 4.3 Aanbevelingen | 32 |
| 5 Referenties | 34 |
| Bijlage I Spuiplannen van 5 juli 2018 | 38 |
| Bijlage II <i>Asellus</i> foto's van spuiactie van 5 juli 2018 | 41 |

1 Aanleiding onderzoek

1.1 Belang en doel

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

De belangrijkste factoren die de groei van *Aeromonas* kunnen beïnvloeden zijn de watertemperatuur en het gehalte en soort voedingsstoffen in het water (Learbuch and van Bel, 2018; van Bel, 2018). Uit gegevens van drinkwaterbedrijven blijkt dat de toename van *Aeromonas* in drinkwater start wanneer de watertemperatuur in het distributiegebied boven ongeveer 7 – 8°C uitkomt, maar dat in het najaar de daling van *Aeromonas* inzet voordat de temperatuur daalt. Dit suggereert dat naast temperatuur ook de beschikbaarheid van voedingsstoffen een rol speelt in het seizoenpatroon van de toename van *Aeromonas* in het drinkwater.

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

In onderzoek van Evides is de aanwezigheid van *Aeromonas* in het distributienet gerelateerd aan de aanwezigheid van ongewervelde dieren (zoals waterpissebedden, *Asellus aquaticus*). In systemen met hoge aantallen *Aeromonas* worden vaak veel ongewervelde dieren aangetroffen, en vice versa. Mogelijk scheiden ongewervelde dieren stoffen uit (BDOC) die door *Aeromonas* worden benut voor groei in dit drinkwater, of kan *Aeromonas* groeien in of op de waterpissebed zelf. Vermeerdering van *Aeromonas* is waargenomen in aanwezigheid van (dode) waterpissebedden bij groeiproeven in verschillende systemen ((van Bel, 2018; van Bel et al., 2017) en eigen onderzoek door Evides).

Naar aanleiding van dit eerdere onderzoek is er interesse om meer te begrijpen over de levenscyclus en de natuurlijke voedselbron(nen) van *Asellus* in het distributienet. Waarschijnlijk foerageren waterpissebedden in het distributiesysteem op het sediment en/of op de biofilm. In het Evides distributiegebied van Braakman komen nauwelijks tot geen waterpissebedden voor en zijn ook de *Aeromonas*-aantallen laag. In distributiegebieden met hoge *Aeromonas*-aantallen, zoals Kralingen en Berenplaat,

komen juist veel waterpissebedden voor. Dit doet vermoeden dat water en sediment uit verschillende distributiesystemen verschillende effecten kunnen hebben op groei en/of overleving van waterpissebedden, en mogelijk dus ook op *Aeromonas*. Of dit ook daadwerkelijk zo is, en in welke mate, is onbekend.

1.2 Doel

Doel van dit onderzoek is om na te gaan: 1) wat de natuurlijke voedingsbronnen zijn van waterpissebedden, 2) een kweekstelsel op te zetten voor *Asellus*, en 3) een testexperiment uit te voeren naar de groei en overleving van *Asellus* in water met of zonder sediment uit het distributiegebied van Evides.

1.3 Opzet van het onderzoek

Eerst is via een literatuuronderzoek meer kennis vergaard over de preferente voedingsbron van waterpissebedden en hoe waterpissebedden te kweken zijn in een laboratoriumomgeving (hoofdstuk 2).

Bij KWR is een kweekmethode voor waterpissebedden opgezet (hoofdstuk 3). In het najaar van 2018 is een proef-overlevingsexperiment uitgevoerd om de experimentele opzet te testen en te optimaliseren (hoofdstuk 4 en 4.2). Vervolgexperimenten die binnen dit project vallen, worden in een ander rapport beschreven.

2 Literatuuronderzoek waterpissebedden

2.1 Aanleiding

Waterpissebedden (*Asellus*) zijn al lange tijd aanwezig in de drinkwaterdistributieleidingen in Nederland, maar ook daarbuiten (van Lieverloo and van der Kooij, 1996), en leiden ook af en toe tot klachten van de consument. In de periode 1993-1999 is door KWR, het toenmalige Kiwa, in samenwerking met de Nederlandse drinkwaterbedrijven, het LIDO (Landelijke Inventarisatie van Dierlijke Organismen in drinkwater) onderzoek uitgevoerd. Het doel van het LIDO onderzoek was tweeledig: het vóórkomen van ongewervelde dieren in drinkwater in kaart brengen, nagaan of er een verband is met waterkwaliteitsparameters en distributietechnische parameters en het testen van de effectiviteit van maatregelen in de bedrijfsvoering van productielocaties en schoonmaakacties op het voorkomen van ongewervelde dieren. Ondanks dat de aanwezigheid van *Asellus* in het drinkwater ongewenst is, vormt deze op zichzelf naar alle waarschijnlijkheid geen probleem voor de volksgezondheid.

Sinds enkele jaren bestaat daarnaast vanuit eerder onderzoek het vermoeden dat de aanwezigheid van ongewervelde dieren (b.v. waterpissebedden) een factor is die de groei van de wettelijke parameter *Aeromonas* in het distributienet beïnvloedt. In het verleden is vrij veel onderzoek gedaan naar bijvoorbeeld de levenscyclus, voedingsbronnen en groei van *Asellus*. In deze literatuurstudie is deze kennis verzameld. De hoofdvragen voor deze studie waren:

- Hoe verloopt de levenscyclus van *Asellus*?
- Wat is de voedingsbron voor *Asellus* in het milieu en het drinkwater distributiesysteem?
- Wat is er bekend over het in leven houden en opkweken van *Asellus* in het laboratorium.

Naast deze hoofdvragen zijn nog een aantal andere onderwerpen in beperkte mate behandeld: effectiviteit van reinigingstechnieken voor de verwijdering van *Asellus* uit het distributienet en de toxiciteit van stoffen voor *Asellus*.

Het gepubliceerde wetenschappelijke onderzoek is voornamelijk uitgevoerd met *Asellus* afkomstig uit oppervlaktewateren, bijvoorbeeld rivieren, slootjes of meertjes. In het vervolg van dit literatuuronderzoek worden dit *Asellus* uit het milieu genoemd, in tegenstelling tot *Asellus* die afkomstig zijn uit het drinkwaterdistributienet. In de experimenten die in de literatuur worden beschreven zijn de behandelingen meestal ook zo gekozen dat deze het (oppervlaktewater)milieu nabootsen. Over de levenscyclus en de voedselbron van waterpissebedden in het distributienet is nog weinig bekend. In deze literatuurstudie worden daarom zowel studies van milieu- als drinkwater *Asellus* beschreven. Indien anders aangegeven zijn de besproken resultaten afkomstig van experimenten met *Asellus* uit het milieu.

2.2 *Asellus* in het milieu

De waterpissebed behoort tot de *Asellidae* en is een omnivoor. Ze voeden zich met name met (rottend) organisch materiaal maar kunnen ook kannibalisme vertonen en dode soortgenoten opeten (Marcus et al., 1978). Van nature leeft *Asellus* in oppervlaktewateren zoals vijvers, slootjes en rivieren. Echter, ze komen ook voor in drinkwaterdistributiesystemen wereldwijd (van Lieverloo et al., 2002). Uit metingen in drinkwaterdistributiesystemen van grondwaterproductielocaties blijkt dat in distributiegebieden waar *Asellus* voorkomt ze het grootste deel van de geschatte biomassa in het distributienet vormen (van Lieverloo et al., 1997a; van Lieverloo et al., 2004b; van Lieverloo et al., 2012). Dit is verder beschreven in hoofdstuk 2.4. Vermoedelijk kwamen (en komen) de dieren vooral in het distributienet terecht door intrusie van het grondwater via leidingbreuken als de druk weg valt en omringend water wordt aangezogen. Eén van de factoren voor het 'succes' van *Asellus* in het distributienet is een hoge voortplantingssnelheid van enkele weken tot maanden, waardoor, als ze eenmaal in het distributienet aanwezig zijn, de populatie snel kan toenemen. De reproductie is seksueel waardoor er meerdere exemplaren nodig zijn om een goede *Asellus* populatie te kunnen vormen en zich te vestigen in het distributienet. Andere factoren zijn dat er geen natuurlijke vijanden voorkomen in het distributienet, *Asellus* goed bestand is tegen gewone desinfectiemiddelen (b.v. chloor) die in het distributienet mogen worden gebruikt, *Asellus* zich goed aan de buiswand kan hechten en zo hoge spuisnelheden kan weerstaan en dat er in het distributienet veel plekken zijn waar *Asellus* nagenoeg onbereikbaar is voor bestrijdingsmiddelen, spuien of andere maatregelen (van Lieverloo et al., 2002; van Lieverloo et al., 2004b).

2.3 Levenscyclus van *Asellus* in verschillende milieus

Van de levenscyclus van *Asellus* is veel bekend, maar deze kennis is bijna uitsluitend gebaseerd op *Asellus* afkomstig uit oppervlaktewatermilieus. In het algemeen wordt in de literatuur veel gebruik gemaakt van de term 'graden-dagen' om de groei en ontwikkeling van *Asellus* te beschrijven. Deze parameter is het product van de watertemperatuur en het aantal dagen dat de *Asellus* erover doet om een bepaalde lengte of fase in de ontwikkeling te bereiken. Met deze parameter kan het effect van een variërende watertemperatuur op de levenscyclus van *Asellus* worden meegenomen. Bijvoorbeeld: 1000 graden-dagen betekent dat de groei van *Asellus* 100 dagen duurt bij een watertemperatuur van 10°C, maar ook dat bij 25°C *Asellus* evenveel groeit in slechts 40 dagen. Door gebruik te maken van 'graden-dagen' wordt de groei van *Asellus* dus gecorrigeerd voor het effect van de temperatuur.

2.3.1 Groei

Bij geboorte zijn *Asellus* exemplaren slechts 1 mm groot en doorzichtig, volwassen exemplaren in het distributienet kunnen tot 10 mm lang worden. In het milieu kunnen de dieren echter nog veel groter worden (ongeveer 25 mm). Dit doet vermoeden dat in het distributienet niet voldoende voedsel aanwezig is om deze grootte te bereiken. Gemiddeld wordt aangenomen dat *Asellus* 4 mm groeit in 1000 graden-dagen al hangt dit af van geslacht, soort en hoeveelheid voedselaanbod en waterkwaliteit (Marcus et al., 1978; McCahon and Pascoe, 1988; Økland, 1978; Tolba and Holdich, 1981). Zo is er pas groei als de watertemperatuur boven de 3-5°C uitkomt en neemt bij hogere temperaturen ook de groei van *Asellus* toe (Tabel 1; (Økland, 1978). De temperatuur beïnvloedt met name de maximale lengte van *Asellus*.

Tabel 1. Levenscyclus van *Asellus*. Per fase is gegeven hoe lang deze fase duurt en hoe groot de *Asellus* ongeveer zijn.

| Groeifase | Grootte bij start | Graden-dagen | Referentie |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|
| Bevruchting | 0,3 – 0,4 mm | 161 – 280, bij 7-8°C | (Økland, 1978; Steel, 1961) |
| Exponentiele groei tot geslachtsrijp | 1 mm | 690-900, bij 15°C | (Marcus et al., 1978) |
| Verdere groei | 4 mm | | |

2.3.2 Voortplanting

De levenscyclus is gebaseerd op seksuele reproductie. Voor de bevruchting houdt het mannetje zich vast aan de rug van een vrouwtje. Na vervellen van het achterlijf van het vrouwtje, wat enkele dagen kan duren, vindt de bevruchting plaats. Na de bevruchting overlijdt het mannetje meestal. Na vervelling van het voorlijf van het vrouwtje wordt de broedzak gevormd tussen de eerste vier paar poten (van Lieverloo and van der Kooij, 1996). Het vrouwtje legt haar eitjes (0,3 – 0,4 mm) in deze broedzak, waarbij het aantal eitjes dat een vrouwtje in haar broedzak draagt afhankelijk is van de lichaamslengte. Zo draagt een klein vrouwtje van 4 mm gemiddeld 21 eitjes en een groot vrouwtje (9 mm) kan meer dan 100 eitjes dragen, maar de individuele variatie is groot (Steel, 1961). Daarnaast beïnvloedt de waterkwaliteit het aantal eitjes en de groei van *Asellus* (Tolba and Holdich, 1981). De broedtijd varieert tussen de 2-3 weken en 3 maanden, waarna de 1 mm grote jongen uitkomen (Tabel 1). Tijdens deze broedperiode kan het vrouwtje niet of nauwelijks eten waardoor deze na de geboorte van de jongen meestal overlijdt (van Lieverloo and van der Kooij, 1996). De broedtijd neemt toe met lagere watertemperaturen, vanaf 7-8°C is de broedtijd 23-35 dagen wat in de buurt ligt van de 300 graden-dagen regel bij temperaturen boven de 4°C (Økland, 1978; Steel, 1961). Eenmaal geboren is de lengtegroei van een individuele *Asellus* exponentieel tot het moment dat ze geslachtsrijp zijn waarna de groeisnelheid afvlakt (Marcus et al., 1978). *Asellus*, zowel mannetjes als vrouwtjes, zijn geslachtsrijp bij een lengte van 3,5 – 4 mm (natgewicht van ongeveer 2 mg). Deze lengtetoeename van 2,5 – 3 mm duurt bij een watertemperatuur van 15°C ongeveer 46-60 dagen (690 - 900 graden-dagen, Tabel 1). Dit komt redelijk overeen met de aanname dat *Asellus* gemiddeld 4 mm groeit in 1000 graden-dagen (paragraaf 2.3.1).

Uit meerdere onderzoeken blijkt dus dat het verloop van de levenscyclus, inclusief voortplanting en groei, in het milieu sterk afhankelijk is van de watertemperatuur. Er is hierbij wel wat variatie mogelijk in de gradendagen-regel voor de verschillende processen in de levenscyclus. In Engeland is gedurende 14 maanden elke maand de *Asellus* populatie van de rivier de Theems in kaart gebracht. Hieruit blijkt dat het broedseizoen langzaam begint in februari, als de watertemperatuur boven de 7 à 8°C uit komt, en vooral de overwinterende, grotere vrouwtjes (>6 mm) zwanger zijn. In de daarop volgende maanden neemt het aantal zwangere vrouwtjes toe met een piek in april wanneer 70% van de vrouwtjes eieren draagt. In mei is er een grote piek van het aantal jongen zichtbaar. Deze jongen worden door de hogere watertemperaturen snel geslachtsrijp en paren waardoor er in juli en augustus weer een wat kleinere piek te zien is in het aantal jongen in het water. In september is een derde, korte, piek van zwangere vrouwtjes zichtbaar, dit zijn kleinere vrouwtjes (4 mm) die in mei – juli zijn geboren. De verwachte piek rond november (afkomstig van de zwangere vrouwtjes in september) is niet of nauwelijks zichtbaar. Hoe lang het duurt voordat de vrouwtjes geslachtsrijp zijn, hangt af van wanneer ze geboren zijn. Vrouwtjes geboren in het begin van de zomer zijn na 1-2 maanden, bij een grootte van 3 tot 4 mm al

geslachtsrijp, vrouwtjes geboren in de herfst groeien langzaam gedurende de winter en zijn 5-6 mm lang als ze in de lente zwanger worden. Zoals hierboven beschreven hangt het aantal eitjes samen met de grootte van het vrouwtje, al is er wel veel variatie. De precieze timing van de levenscyclus hangt met name af van de temperatuur. In koudere gebieden begint het broedseizoen later (Økland, 1978; Steel, 1961).

2.3.3 Fecale pellets

Asellus scheiden fecale pellets uit welke eruit zien als langwerpige staafjes en deze kunnen een groot deel uitmaken van het volume van het sediment in de drinkwaterleidingen. De samenstelling van de pellets kan sterk verschillen. Zo is van fecale pellets afkomstig uit drinkwatersediment de samenstelling bepaald (persoonlijke communicatie Hein van Lieverloo). De droge fractie van de pellets bestaat voor ongeveer 40% uit organisch materiaal, 15% uit zand en ander niet-destroeerbaar materiaal en voor 45% uit ander anorganisch materiaal (35,7% ijzer, 6,8% calcium, 2,5% mangaan).

Daarnaast geven de kleur en oppervlaktestructuur van de pellets informatie over de voeding van *Asellus*. Met chemische en microscopische analyse is achterhaald wat het vermoedelijke bestanddeel is in verschillende typen fecale pellets (persoonlijke communicatie Hein van Lieverloo en (van Lieverloo et al., 2012)):

- mat oranje met een grofkorrelige oppervlaktestructuur: voornamelijk roest-brokjes;
- mat bruin met een fijnkorrelige oppervlaktestructuur: vlokken van ijzer- en mangaanverbindingen, waarschijnlijk in combinatie met ijzerbacteriën;
- glanzend zwart met een zeer fijnkorrelige oppervlaktestructuur: vermoedelijk bitumen, mogelijk ook (actief) kooldeeltjes afkomstig uit de zuivering

Als deze voedselbronnen snel worden afgewisseld, is dit terug te zien in de fecale pellets als afwisselend oranje, bruin of zwarte 'banden'. De sterke monddelen van de *Asellus* maken het mogelijk dat het hard materiaal als roest, bitumen en asbestbrokjes kan fijnmalen en eten. De dieren leven van de micro-organismen en ander organisch materiaal dat op en tussen deze anorganische bestanddelen te vinden is.

2.4 Aanwezigheid, effecten en bestrijding van *Asellus* in het drinkwaterdistributienet

Er is slechts een beperkt aantal studies beschikbaar over het voorkomen van *Asellus* in het drinkwaterdistributienet. Deze zijn afkomstig uit Nederland en omliggende landen. Het meest uitgebreide onderzoek in Nederland zijn de LIDO onderzoeken (Landelijke Inventarisatie van Dierlijke Organismen in drinkwater) uitgevoerd door Kiwa/KWR in de jaren '90 in samenwerking met de Nederlandse drinkwaterbedrijven. In LIDO I is geprobeerd om statistische verbanden te vinden tussen het voorkomen van waterpissebedden en verschillende parameters, waaronder de watersamenstelling en distributie technische factoren (van Lieverloo et al., 2002). In het vervolgonderzoek, LIDO II, is het effect van maatregelen om ongewervelde dieren te verwijderen uit het distributiesysteem getest (van Lieverloo et al., 1998). Meer recentelijk is in Duitsland gekeken naar de aantallen *Asellus* in verschillende drinkwaterdistributienetten en op verschillende, dichtbij elkaar gelegen, locaties in één distributienet (Gunkel et al., 2010).

Uit het eerste LIDO onderzoek en een latere inventarisatiestudie (van der Wielen and van Lieverloo, 2016) kwam naar voren dat (i) in alle onderzochte typen drinkwater

dierlijke organismen voorkwamen, (ii) er grote verschillen waren tussen de voorzieningsgebieden onderling en binnen een voorzieningsgebied zelf, (iii) de aantallen in spuiwater meestal groter waren dan in drinkwater en (iv) de grootste aantallen werden gevonden in drinkwater bereid uit anaeroob grondwater, waarbij regelmatig de streefwaarde werd overschreden, v) er seizoeneffecten zichtbaar waren in de *Asellus*-populatie, waarbij meer *Asellus* voorkwamen bij hogere watertemperaturen en in augustus en september veel jonge (kleinere) *Asellus* aanwezig waren. In de voorzieningsgebieden van grondwaterbedrijven met veel biomassa bleek de biomassa in het spuiwater voor het grootste deel uit waterpissebedden (86%) en uit borstelwormen (12%) te bestaan (van Lieverloo et al., 1997b). Deze biomassaberekeningen zijn gebaseerd op schattingen van de gemiddelde biomassa van de afzonderlijke ongewervelde dieren. In aantallen waren watervlooien en roeipootkreeften echter dominant aanwezig (SWI 94.507 en SWI 95.131). Omgerekend werden $< 0,005 - 5$ *Asellus*/m² leidingwand aangetroffen. De hoeveelheid biomassa van ongewervelde dieren bleek vooral gecorreleerd te zijn aan de biofilmvormingssnelheid (BVS in g ATP/cm²), KMnO₄ verbruik van het drinkwater, troebelheid, het koloniegetal bij 22°C (KG22), het aantal *Aeromonas*-bacteriën in water en sediment, het gehalte ammonium en het gehalte vlokvormig sediment (van Lieverloo et al., 2012).

Het schoonmaken van 39 (gebieden rondom) monsternamelocaties in distributiegebieden, uitgevoerd binnen LIDO II (3 oppervlaktewaterlocaties en 36 grondwaterlocaties), lijkt hooguit een jaar effect te hebben gehad op de aantallen ongewervelde dieren. Aanpassingen in de bedrijfsvoering van 6 pompstations lieten geen effect zien op het vóórkomen van ongewervelde dieren.

2.4.1 Leidingmateriaal

De praktijk leert dat waterpissebedden in alle soorten leidingen voorkomen. In een Deens distributienet (Kopenhagen, grondwater), zonder restchlor dosering, hebben ze een voorkeur voor gietijzeren leidingen boven kunststof leidingen (Christensen et al., 2011). In gietijzeren leidingen komen *Asellus* dus vaker voor en zijn ook de aantallen per m³ spuiwater hoger. Mogelijke oorzaken die de auteurs noemen zijn de hogere leeftijd van de gietijzeren leidingen (62-90 jaar vergeleken met <32 jaar voor kunststof leidingen) waardoor de waterpissebedden langer de tijd hebben gehad om ongestoord een populatie op te bouwen. Daarnaast kunnen gietijzeren leidingen corroderen waardoor er mogelijk meer voedsel aanwezig is, organische stof op ijzerdeeltjes kan accumuleren en er ook meer schuilplaatsen of gebieden met lagere stroomsnelheid aanwezig zijn. Het vóórkomen en de verspreiding van *Asellus* lijkt dus gecorreleerd te zijn aan het leidingmateriaal en de dimensionering van het distributienet. In het verleden werden (Nederlandse) distributienetten overgedimensioneerd ontworpen, terwijl deze tegenwoordig wordt ontworpen op kortere verblijftijden en dus hogere stroomsnelheden zoals bijvoorbeeld het zelfreinigende netwerk.

2.4.2 Sediment

In het distributienet van Kopenhagen was een duidelijk verband zichtbaar tussen het vóórkomen van levende waterpissebedden en het sedimentvolume (Christensen et al., 2011). Levende waterpissebedden waren nagenoeg alleen aanwezig in monsters met een sediment volume boven de 100 ml/m³, er was echter geen verband tussen het aantal waterpissebedden en het sediment volume. Dode exemplaren waren gelijkelijk verdeeld over monsters met een hoog of laag sediment volume en er werd geen relatie met troebelheid, ATP, KG22 en *E. coli* aantallen gevonden.

In het LIDO onderzoek is ook voor het Nederlandse distributienet een correlatie gelegd tussen biomassa van invertebraten en het sedimentvolume (van Lieverloo et al., 2012). Hierin is berekend dat 52% van de variatie in de biomassa in het distributienet wordt veroorzaakt door het sedimentvolume. Hierbij dient gerealiseerd te worden dat dierlijke organismen ook onderdeel zijn van het sediment, maar daarnaast kunnen ook andere factoren een rol spelen. Er zijn bijvoorbeeld ook locaties waar weinig sediment aanwezig is, maar wel hoge aantallen *Asellus*.

2.4.3 Interactie met bacteriën

Naast dat *Asellus* mogelijk een rol speelt in het voorkomen van *Aeromonas* bacteriën in het distributienet, is ook in verschillende studies aangetoond dat in het algemeen ongewervelde dieren in het distributienet bacteriën en potentiële pathogenen kunnen bevatten. Van *Asellus* is gerapporteerd dat deze in microcosmos-experimenten (drinkwater met sediment en dosering van bacteriecultures) *Aeromonas*, bacteriën behorend tot de parameter Koloniegetal bij 22°C, *Klebsiella pneumoniae* en *Campylobacter jejuni* kan bevatten (Christensen et al., 2012; van Bel et al., 2017). *E. coli* en bacteriën van de coligroep werden niet aangetroffen in *Asellus* uit het Deense distributienet, maar kunnen wel in de organismen aanwezig zijn als deze als voedselbron worden aangeboden (Christensen et al., 2013). *K. pneumoniae*, *C. jejuni* en KG22 bacteriën lijken niet te groeien in *Asellus*, maar alleen voor te komen als de concentratie in het water (10^3 cellen/ml) hoog genoeg is (Christensen et al., 2012): gedurende de 25 dagen van het experiment stierf *C. jejuni* snel af (k_i : $0,53 \text{ dag}^{-1}$), gevolgd door *E. coli* (k_i : $0,13 \text{ dag}^{-1}$) en *K. pneumoniae* (k_i : $0,04 \text{ dag}^{-1}$). Het koloniegetal bij 20°C op R2A-medium nam echter versterkt toe in aanwezigheid van een *Asellus* (Christensen et al., 2012).

2.4.4 Bestrijding

Voor bestrijding van *Asellus* in het leidingnet zijn de mogelijkheden beperkt. De meest gebruikte methode is regulier spuien met een spuisnelheid van 1,0 tot 1,5 m/s. Het voordeel is dat de drinkwaterbedrijven dit relatief makkelijk zelf kunnen doen, geen externe partijen nodig hebben en de drinkwaterlevering aan de klanten niet onderbroken hoeft te worden.

Naast conventioneel waterspuien bestaat er ook CO₂-spuien, waarbij drinkwater verrijkt met CO₂ in het leidingnet wordt gepompt. Het CO₂ verdooft de *Asellus* waardoor ze zich niet vast kunnen houden aan de buiswand en met een minimale spuisnelheid van 0,5 m/s weggespuid kunnen worden (Gunkel et al., 2010; Gunkel and Scheideler, 2011). Als er meerdere keren achter elkaar wordt gespuid, eerst conventioneel waterspuien gevolgd door acht keer CO₂-spuien, blijven er *Asellus* uit het distributienet komen, al zijn dit na enkele keren nog maar lage aantallen (Gunkel and Scheideler, 2011). Een voordeel van spuien met CO₂-verrijkt water is dat meer levende *Asellus* worden verwijderd. Nadeel van de lage spuisnelheid is dat dode *Asellus* of andere biomassa niet geheel worden opgewerveld en verwijderd.

Nadeel van regulier spuien is dat een groot deel van de levende *Asellus* niet wordt verwijderd omdat deze, zo wordt algemeen aangenomen, zich kan vasthouden aan de buiswand waardoor het hoge stroomsnelheden kan weerstaan. Bovenstaand voorbeeld, waarbij CO₂ spuien meer *Asellus* verwijdert dan conventioneel spuien, suggereert dat dit inderdaad gebeurt. Vermoedelijk wordt met CO₂-spuien het overgrote deel van de *Asellussen* verwijderd, maar het blijft onbekend hoeveel *Asellussen* met deze reinigingsmethoden niet worden verwijderd.

Zoals uit bovenstaande tekst blijkt, is het nagenoeg onmogelijk om te bewijzen of een reinigingsmethode *Asellus* geheel uit het distributienet verwijdert, aangezien niet gemeten kan worden hoeveel *Asellus* na reiniging in het distributienet zijn achtergebleven. Wel is duidelijk dat CO₂-spuien meer *Asellussen* verwijdert dan regulier spuien.

Er zijn verschillende mogelijke oorzaken waardoor *Asellus* lastig te verwijderen is uit het distributienet: naast dat ze zich lijken te kunnen vasthouden aan de buiswand om zo de hoge stroomsnelheid te weerstaan, kan *Asellus* zich bijvoorbeeld ook in niches bevinden (afsluiters, etc) waar een verhoogde watersnelheid geen invloed op heeft. Onderzoek in Nederland heeft laten zien dat regulier spuien met 1,0 m/s gemiddeld 42% van de intacte *Asellus* (levend en dood) populatie verwijdert en 83% van de niet-intacte *Asellus* populatie (met een kop (van Lieverloo et al., 2004b)). Alleen langdurig en systematisch gedurende meerdere jaren spuien geeft een duidelijke vermindering van het aantal *Asellus* in het distributienet. Ervaringen van de Antwerpse Water Werken in België laten zien dat bij een jaarlijks terugkerend systematisch programma van spuien met water en lucht de aantallen waterpissebedden pas na 5 jaar tot 10% en na 7 jaar tot 1% waren afgenomen (van Lieverloo et al., 2002; van Lieverloo et al., 2004b). De begindichtheid van de waterpissebedden was 1,21 per m² buiswand (dit komt overeen met 44 *Asellus* per m³ bij een leidingdiameter van 110 mm PVC).

Een andere mogelijkheid is om chemische stoffen aan het water te doseren. In de periode 1970-1990 is met name in Engeland en Polen ervaring opgedaan met pyrethrine, of de synthetische versie permethrine. Deze stof is niet toxisch voor zoogdieren, maar doodt wel zeer snel *Asellus* bij lage concentraties. Een dosis van 10 µg/l verlamt de *Asellus* snel en binnen 24 uur overlijden ze (Oleszkiewicz et al., 2001). De stof is echter wel erg toxisch voor vissen en wordt onder andere daarom niet veel gebruikt.

Problematisch voor alle bestrijdingsmethoden is dat *Asellus* niet altijd bereikbaar is voor de reinigingsmethode. Zo is één situatie bekend waarin na zeer intensief spuien ongeveer 25% van het totaal aantal verwijderde *Asellus* zich in de koppelingen (moffen) van een asbestcementleiding bevond (persoonlijke communicatie Hein van Lieverloo en (van Lieverloo and van der Kooij, 1996)). Deze *Aselli* zijn daardoor niet bereikbaar voor reinigingsmethoden zoals ice-pigging, CO₂-spuien, normaal spuien of pyrethrine. Het CO₂-verrijkt water en de pyrethrine diffunderen zeer waarschijnlijk niet snel genoeg in deze ruimtes om de daar aanwezige *Asellus* af te doden of te verdoven (van Lieverloo et al., 2004b).

Hoe lang het distributienet vervolgens schoon blijft na de behandeling hangt ervan af of de oorzaak wordt weggenomen. Indien dit niet het geval is, zal de *Asellus* populatie zich snel herstellen. In theorie is het voldoende als twee individuen, één van elk geslacht, overblijven na de reiniging waarna snel een nieuwe populatie opgebouwd kan worden. Omdat *Asellus* ook tegen de waterstroom in kan lopen, kan het zich niet alleen benedenstrooms verspreiden (door lopen of door zich mee te laten voeren op de waterstroom) maar ook bovenstrooms (persoonlijke communicatie Günter Gunkel). *Asellus* kan alleen worden beperkt door er voor te zorgen dat er zo min mogelijk voedsel aanwezig is voor *Asellus*.

2.5 Voedselbronnen van waterpissebedden

2.5.1 Voedselbronnen in het milieu

2.5.1.1 Algemene voeding

De natuurlijke omgeving van *Asellus* is oppervlaktewater waar ze over de bodem lopen. In deze omgeving leeft *Asellus* voornamelijk op (rottende) bladeren en sediment met daarop een microbiële flora.

Onderzoek met *Asellus* uit het milieu en verschillende voedselbronnen laat zien dat bij 15°C de groeisnelheid van *Asellus* varieert tussen 0,7 – 5,8% per dag (gelijk aan 15 graden-dagen; toename in natgewicht, gebaseerd op de gemeten lengtetoeename). De sterkste groei is op jonge *Elodea* (waterpest) bladeren zonder epiphyten (5,8% toename van natgewicht per dag), oudere *Elodea* bladeren, materiaal bedekt met epiphytische algen en rottende eikenbladeren (3,7 – 5,3% toename natgewicht per dag). De groeisnelheid van *Asellus* is lager op een voedingsbron bestaande uit een reïncultuur van bacteriën of gekweekte bacteriën uit oppervlaktewater, filamenteuze algen, *Asellus* feces, net gedode *Asellus* en sediment uit een meer (1,3 – 2,2% per dag) (Marcus et al., 1978). Zelfs *Asellus* die gedurende 21 dagen in gefiltreerd (22 µm filter) en gesteriliseerd oppervlaktewater werden gehouden, zonder extra voedselbron, groeide nog met 0,7 – 1,0% per dag. De aanwezige dode biomassa kan dus als voedingsbron dienen, al lijkt dit net voldoende voor de *Asellus* om in leven te blijven en is groei niet of nauwelijks mogelijk. Daarnaast is niet duidelijk op welk deel van de bovenstaande voedingsbronnen *Asellus* zich voedt. Bij een dode *Asellus* kan het gaan om kannibalisme maar mogelijk ook de bacteriën en schimmels die op de dode *Asellus* gaan groeien en als voedselbron voor de levende *Asellus* dienen. In de hier beschreven experimenten is niet gekeken naar voortplanting, maar alleen naar groei door het natgewicht te bepalen.

In laboratoriumstudies wordt bij voorkeur bladmateriaal gebruikt als voedselbron voor *Asellus*. *Asellus* groeit met name goed op bladeren die zijn voorbehandeld door deze eerst te drogen en vervolgens ongeveer twee weken in water met een kleine hoeveelheid oppervlaktewater te laten liggen. Op deze manier wordt het rottingsproces van het blad door bacteriën en schimmels versneld gestart (o.a. Bloor, 2010; McCahon and Pascoe, 1988). Experimenten hebben laten zien dat *Asellus* meer groeit wanneer bladeren worden voorbehandeld in drinkwater geënt met oppervlaktewater, vergeleken met wanneer verse bladeren of bladeren voorbehandeld in schoon drinkwater worden gebruikt (Graca et al., 1993a; Oppenheimer, 1997). De schimmels die bij het rottingsproces van de bladeren betrokken zijn, lijken in deze experimenten de belangrijkste voedingsbron voor *Asellus* (Bloor, 2010; Graca et al., 1993a, b). Deze groeiexperimenten zijn gedaan met volwassen *Asellus*. Erg jonge *Asellus* kunnen niet alleen op bladmateriaal overleven maar hebben de fecale pellets van een volwassen *Asellus* nodig, bijvoorbeeld in de vorm van drinkwatersediment (Rossi and Vitagliano-Tadini, 1978). Als rottend bladmateriaal met fecale pellets worden toegediend als voedselbron, groeien de jonge *Asellus* 2x zo snel als wanneer alleen bladmateriaal wordt aangeboden.

Microbiologische analyse laat zien dat op zowel het rottende plantmateriaal als in de fecale pellets schimmels aanwezig zijn, voornamelijk *Alternaria* en *Fusarium*. In groeiexperimenten geeft een voedselbron bestaande uit kolonies van deze twee schimmels de grootste groei, 3x zo snel als op alleen bladmateriaal (Rossi and Vitagliano-Tadini, 1978).

Het voedingspatroon van jonge *Asellus* verschilt van oude exemplaren. Zo kunnen jonge *Asellus* niet alleen op bladmateriaal overleven maar hebben zij de eerste 25 dagen de feces van een volwassen *Asellus* nodig in de voeding (McCahon and Pascoe, 1988). Na deze periode kan de, inmiddels volwassen, *Asellus* overleven op voorbehandeld, en dus rottend, bladmateriaal. Ondanks dat volwassen exemplaren fecale pellets niet nodig hebben voor groei (toename van natgewicht), kunnen ze hier, zoals hierboven beschreven, wel beperkt op groeien (Marcus et al., 1978). Er is geen literatuur beschikbaar naar de functie van de fecale pellets voor jonge *Asellus*. Waarschijnlijk zijn de pellets een voedselbron, maar mogelijk is het ook een bron van entmateriaal van symbiotische micro-organismen die *Asellus* helpen in het afbreken van moeilijk afbreekbare stoffen.

Uit hetzelfde onderzoek blijkt dat een reïncultuur van de bacterie *Sphaerotilus natans*, opgekweekte bacteriën afkomstig uit kraanwater ook tot groei leidt (1,61% gewichtstoename per dag). Dit zijn echter niet de preferente voedingsbronnen. In deze studie zijn *Asellus* uit oppervlaktewater gebruikt, maar de resultaten bevestigen dat *Asellus* in een drinkwaterdistributiesysteem waarschijnlijk genoeg voedsel kan vinden om te overleven, groeien en waarschijnlijk ook reproduceren. Echter, in de meeste studies wordt alleen gekeken naar groei en overleving, maar niet naar reproductie. In het distributienet zullen met name de biofilm en de micro-organismen daarin, het sediment op de buiswand en fecale pellets een belangrijke rol spelen.

2.5.1.2 Vetzuren als voedselbron

Er is geen literatuur beschikbaar die laat zien dat *Asellus* (opgeloste) nutriënten direct uit het water kunnen filteren en gebruiken. In het algemeen worden voor organismen in water-ecosystemen een aantal vetzuren, met name de meervoudig onverzadigde vetzuren (omega 3 en omega 6), beschouwd als essentiële vetzuren. Deze stoffen zijn belangrijk voor groei, reproductie en neurale ontwikkeling (Brett and Müller - Navarra, 1997) en moeten daarom in het drinkwater aanwezig zijn om overleving en groei van *Asellus* mogelijk te maken. Deze vetzuren worden voornamelijk door planten (phytoplankton) gesynthetiseerd waardoor ze in de (oppervlakte)watercyclus terecht komen. De meervoudig onverzadigde vetzuren kunnen vervolgens wel door o.a. ongewervelde dieren en zoöplankton worden omgezet naar andere soorten vetzuren die weer door hogere organismen worden opgenomen (Brett and Müller - Navarra, 1997). De meervoudig onverzadigde vetzuren moeten dus aanwezig zijn in het sediment, de biofilm of bacteriën zodat de *Asellus* deze op kan nemen.

De voedselvoorkeuren van *Asellus* geogst uit oppervlaktewater variëren met de seizoenen en de fase in de levenscyclus (Lau et al., 2013). In laboratoriumexperimenten groeien *Asellus* die zijn geogst in de herfst beter op algenvlokken dan *Asellus* die in de lente zijn geogst, maar nemen ze minder vetzuren uit het voedsel op. Daarnaast is de vetzuursamenstelling van het voedsel seizoenafhankelijk en dit is (in beperkte mate) terug te zien in de vetzuursamenstelling van de *Asellus* (Lau et al., 2012). Zo bevatten de *Asellus* die in het voorjaar worden geogst meer omega 3-vetzuren (14,8% van het totale aantal vetzuren) dan in het najaar (10,4%) en in de zomer (5,9%). Het totale aantal verzadigde vetzuren en oleaat was het hoogst in de zomer, omega 6 vetzuren waren het hoogst in de herfst (Lau et al., 2013). Een gemiddelde vetzuursamenstelling van *Asellus* gedurende het hele jaar bevestigt dat omega 3 en 6 vetzuren een groot deel uitmaken van het totale gehalte vetzuren (10,8% en 13,4%), daarnaast is ook het gehalte palmitinezuur hoog (16,4%) (Lau et al., 2012).

Met de *Asellus* geogst in het voorjaar en de herfst zijn ook voedings- en groeiexperimenten uitgevoerd (Lau et al., 2013). Hierbij is *Asellus* verdeeld in vier groepen die gedurende 30 dagen het volgende voedsel kregen: geconditioneerde bladeren (*Betula pendula*), artificiële algenvlokken (TetraPhyll®), een mix van geconditioneerde *B. pendula* bladeren en TetraPhyll® of deze mix aangevuld met commerciële visvoedingsvlokken (TetraMin®). *Asellus* geogst uit oppervlaktewater in het voorjaar krimpen en verliezen gewicht als alleen de bladeren worden gedoseerd (-6 en respectievelijk -18 mg/gram/dag). Omdat dit voorverteerde bladeren zijn, lijkt het onwaarschijnlijk dat *Asellus* deze niet kunnen verteren. De krimp wordt vermoedelijk veroorzaakt doordat de bladeren in deze opzet niet genoeg, of de juiste, voedingsstoffen bevatten. Op de algenvlokken treedt wel groei op bij de voorjaars-*Asellus* (~3 mg/gram/dag), maar er is geen groei of zelfs krimp bij de herfst-*Asellus* (-15 tot +1 mg/gram/dag). Op de mix van bladeren en TetraPhyll, met of zonder visvoedingsvlokken, groeit zowel de voorjaars-*Asellus* (2 - 5 mg/gram/dag) als de herfst-*Asellus* (13 - 22 mg/gram/dag). Opvallend is dat *Asellus* in dit experiment niet groeien op alleen geconditioneerde bladeren, terwijl aangenomen wordt dat dat de voornaamste voedingsbron is van *Asellus* in oppervlaktewater. Van alle *Asellus* exemplaren die in het groeiexperiment zijn gebruikt en verschillend voedsel hebben gehad, is na 30 dagen de vetzuursamenstelling bepaald. *Asellussen* die alleen geconditioneerde bladeren hadden gegeten hadden een duidelijk andere vetzuursamenstelling dan de *Asellus* die één van de drie andere voedingsbronnen (TetraPhyll, bladeren met TetraPhyll, bladeren met TetraPhyll en TetraMin) hadden gehad. De *Asellus* gevoed met bladeren bevat in vergelijking met de *Asellus* die de andere voedingsbronnen hadden gehad, voornamelijk veel arachidonzuur, het enkelvoudig onverzadigde vetzuur oleaat en vacceenzuur, maar juist een verlaagde hoeveelheid palmitoleinezuur, pentadecanoic acid en heptadecanoic acid. Daarnaast bevat de voorjaars-*Asellus* (40,8 - 54,6 mg/gram drooggewicht) meer vetzuren dan de herfst-*Asellus* (20,7 - 28,8 mg/gram drooggewicht), zelfs na de voedingsexperimenten.

Experimenten met *Asellus* in een microkosmos laten zien dat *Asellus* de voorkeur heeft voor voedingstabletten, bestaande uit cellulose, agar, ascorbinezuur (als antioxidant) en plantenmateriaal of het meervoudig onverzadigde vetzuur linoleenzuur (Vonk et al., 2016) boven standaard voedingstabletten die geen plantenmateriaal of linoleenzuur bevatten. De consumptie van de tabletten met linoleenzuur is hoger dan de standaard, maar die met plantenmateriaal wordt het meest gegeten door de *Asellus*. Gemiddeld over 16 dagen eten 6 *Asellus* exemplaren 3 - 8,5 mg van deze tabletten per dag. Ook uit deze studie blijkt dus dat vetzuren een belangrijke bron van organisch materiaal zijn voor *Asellus*.

2.5.2 Voedselbronnen in het distributiesysteem

Algemeen wordt aangenomen dat in het drinkwaterdistributiesysteem het sediment met biofilm op de bodem van de leidingen de voornaamste voedselbron is voor *Asellus*. De fecale pellets van *Asellussen* bestaan uit materiaal (ijzer en mangaan) dat overeen komt met het materiaal waarvan de drinkwaterleidingen zijn gemaakt waarin ze zich bevonden (Christensen et al., 2011). Zoals eerder beschreven, is in het Deense onderzoek een verband aangetoond tussen de aanwezigheid van levende *Asellus* en een groter sedimentvolume (> 100 ml/m³ spuiwater). Aan de andere kant lijken gegevens van Evides erop te wijzen dat dit verband ook omgekeerd kan zijn (persoonlijke mededeling W. Hijnen). Dit wijst er op dat het sediment een belangrijke voedselbron kan zijn, maar dat andere voedingsbronnen niet kunnen worden uitgesloten. Naast het sediment zou mogelijk de biofilm als aanvullende voedingsbron kunnen dienen.

Onderzoek bij KWR suggereert dat *Asellus* beperkt kan groeien en kan overleven op stukjes polyester waarop een biofilm is gegroeid (Mayringer, 1996).

Zoals eerder beschreven leeft *Asellus* in het milieu, oppervlaktewater, voornamelijk op rottend (blad)materiaal en deeltjes op de bodem van meertjes en rivieren. Op dit rottende materiaal zijn bacteriën, schimmels en hoge concentraties organisch materiaal aanwezig. Dit is min of meer vergelijkbaar met sediment afkomstig uit het distributienet waarop een biofilm met micro-organismen waaronder schimmels en bacteriën aanwezig zijn (Gauthier et al., 1999). Door het eten van het sediment krijgt *Asellus* deze aanhangende micro-organismen binnen welke het mogelijk kan gebruiken als voedingsbron of zich gedragen als een symbiont en de *Asellus* helpt in het afbreken van voedingsstoffen (Wang et al., 2007).

Uit verschillende artikelen komt indirect naar voren dat *Asellus* kannibalisme kan vertonen waarbij dode *Asellus* of andere dode invertebraten worden gegeten (Marcus et al., 1978). Ook het eigen nageslacht wordt soms gegeten. Dit treedt met name op als het milieu te klein is voor het aantal *Asellus* dat zich daar bevindt waardoor ze gestrest of gewond kunnen raken. In een laboratoriumsetting worden dode *Asellus* daarom soms uit het aquarium verwijderd, of wordt een groter aquarium gebruikt waaraan ook meer voedsel en bladeren worden gedoseerd. Of in het distributienet kannibalisme plaats vindt, is niet onderzocht maar dit is ook erg lastig.

Eén van de vragen naar de relatie tussen *Asellus* en *Aeromonas* is of *Aeromonas* in staat is om zich in *Asellus* te vermenigvuldigen als ze het maag-darmkanaal passeren, of dat dit niet het geval is. Daarnaast is bekend dat in de hepatopancreas van verschillende soorten isopoden symbiotische bacteriën aanwezig zijn (Wang et al., 2007), al zijn er ook soorten waarin bacteriën afwezig zijn. Een mogelijkheid is dat deze bacteriën de gastheer helpen met het verteren van voedsel waardoor er meer nutriënten vrijkomen (Zimmer and Bartholmé, 2003). In de hepatopancreas van *Asellus* zijn voornamelijk proteobacteria, maar ook gammaproteobacteria aanwezig, waaronder voornamelijk *Rickettsiella* en *Burkholderia* en in enkele gevallen *Rhodobacter* en *Aeromonas*. De microbiële populatie in *Asellus* verzameld uit verschillende oppervlaktewaterlocaties varieert en is dus afhankelijk van het milieu, omstandigheden en voedingsbron. Dit in tegenstelling tot andere isopoden waarbij de hepatopancreas bevolkt wordt door een vrij continue microbiële populatie, ongeacht of ze van verschillende locaties zijn verzameld (Wang et al., 2007). De variërende bacteriepopulatie in *Asellus* suggereert dat er geen sprake is van symbiose, in tegenstelling tot de andere isopoden die wel een stabiele microbiële populatie bevatten.

Daarnaast is *Aeromonas* chitinolytisch. *Aeromonas* bacteriën bevatten het enzym chitinase wat onderdeel is van een enzymatische route waarin chitine wordt afgebroken (Chen et al., 1991; Halder et al., 2012). Het pantser van veel invertebraten, waaronder *Asellus*, bestaat voor een deel uit chitine. Mogelijk kan *Aeromonas*, eventueel in symbiose met andere bacteriën, de chitine in (dode) *Asellus* afbreken. Groeiproeven met een *Aeromonas* reïncultuur waaraan chitine was gedoseerd, lieten echter geen groei van *Aeromonas* zien (van Bel et al., 2016). Of *Aeromonas* inderdaad geen chitine kan afbreken, is echter niet zeker aangezien niet de juiste stikstofbron is gedoseerd in deze groeiproef (nitraat in plaats van ammonium).

2.5.3 Toxische stoffen voor *Asellus*

Macroinvertebraten, waaronder *Asellus*, worden vaak gebruikt voor toxiciteitstesten, als representatief organisme en macro-invertebrata voor de isopoden en andere invertebraten die in het watermilieu voorkomen. Hierdoor is relatief veel bekend over

de gevoeligheid van *Asellus* voor verschillende soorten (toxische) stoffen. Voor deze experimenten worden altijd *Asellus* uit het milieu gebruikt, bijvoorbeeld afkomstig uit een sloot of vijver, die worden verzameld en in het laboratorium worden gehouden (McCahon and Pascoe, 1988). Omdat dit buiten de scope van het onderzoek valt, wordt dit hieronder slechts beperkt besproken.

In Tabel 2 is een kort, niet compleet, overzicht gegeven van de LC₅₀-waarde van een aantal geteste stoffen voor *Asellus*. Van een aantal stoffen wordt onder de tabel nog een toelichting gegeven. Bij alle onderstaande waarden en beschrijvingen van toxiciteit van de besproken stoffen moet opgemerkt worden dat metaal toxiciteit sterk afhangt van de pH en bufferende eigenschappen van het water.

Tabel 2. LC₅₀ waarde van toxische stoffen voor *Asellus*, zoals bepaald in acute toxiciteitstesten.

| | LC ₅₀ bij blootstellingstijd | | | | Referenties |
|-----------|---|-------------------------|-------------------------------|----------------|--|
| | 24 uur | 48 uur | 72 uur | 96 uur | |
| Aluminium | - | 6,57 ppm | - | 4,37 ppm | (Martin and Holdich, 1986) |
| Ammonium | - | - | - | - | |
| Cadmium | 15,3 ppm | 4,6 ppm | 1,9 ppm | 0,6 en 1,3 ppm | (Braginskiy and Shcherban, 1978) (Martin and Holdich, 1986) |
| Chroom | - | 937 ppm | - | 442 ppm | (Martin and Holdich, 1986) |
| Ijzer | - | 81,1 en 183 ppm | - | 124 ppm | (Furmanska, 1979) (Martin and Holdich, 1986) |
| Koper | - | 32,1 ppm en 1,2-2,5 ppm | 2,5 ppm | 9,2 ppm | (Furmanska, 1979) (Martin and Holdich, 1986) (Brown, 1976) (Braginskiy and Shcherban, 1978) |
| Lood | 105-457 pp, | 120 ppm | - | 64 ppm | (Martin and Holdich, 1986) (Fraser et al., 1978) |
| Mangaan | - | 771 ppm | - | 333 ppm | (Martin and Holdich, 1986) |
| Kwik | - | 0,7 ppm | - | 0,2 ppm | (Martin and Holdich, 1986) |
| Nikkel | - | 435 ppm | 2000 ppm (LC ₁₀₀) | 119 ppm | (Martin and Holdich, 1986) (Braginskiy and Shcherban, 1978) |
| Zink | - | 52,3 - 54,1 ppm | 1,5 ppm | 18,2 ppm | (Furmanska, 1979) (Martin and Holdich, 1986) (Braginskiy and Shcherban, 1978) |

2.5.3.1 Aluminium

Blootstelling van *Asellus* aan aluminium (0, 100, 300, 400, 500 µg/l) heeft geen effect op de overleving gedurende 50 dagen. Aluminium wordt opgenomen in de *Asellus*, maar de concentratie varieert sterk. In de eerste 20 dagen stijgt de concentratie tot ongeveer 1600 – 2400 µg/gram drooggewicht, hierna daalt de concentratie snel tot 200 – 400 µg/gram drooggewicht op dag 30. De concentratie neemt daarna weer sterk toe tot dag 45 – 50. *Asellus* is dus behoorlijk resistent tegen de aanwezigheid van aluminium in het water (Elangovan et al., 1999).

2.5.3.2 Ammonium

In oppervlaktewater komt *Asellus* voor bij vrij hoge concentraties ammonium. Bij een groot aantal tellingen in oppervlaktewater (afkomstig uit de macrofaunametingen van de Nederlandse waterschappen) was *Asellus* aanwezig in het water bij een jaargemiddelde ammoniumconcentratie boven de 1 mg NH₄-N/l. *Asellus* kan dus duidelijk hoge ammoniumconcentraties weerstaan (Evers et al., 2017). De toxiciteit van ammonium is sterk afhankelijk van de vorm waarin het aanwezig is (vrij of totaal ammonium). Het evenwicht hiertussen hangt af van de pH en bufferende stoffen in het water.

2.5.3.3 Cadmium

Cadmium wordt snel opgenomen door *Asellus* als cadmium wordt aangeboden in water (0 – 10 µg/l) of *Elodea* bladeren (2 – 350 µg/gram). De halfwaardetijd voor de daling van de cadmiumconcentratie in *Asellus* is 22 dagen. In deze studie werd het effect op *Asellus* niet getest (van Hattum et al., 1989).

Door langdurige blootstelling aan lage concentraties cadmium (0,005 mg/l) daalt het aantal de vruchtbaarheid van vrouwtjes en zijn er minder zwangere vrouwtjes aanwezig in de populatie. Cadmium stimuleert daarentegen de groei van jonge *Asellus* (de Nicola Giudici et al., 1988). Dit is echter slechts in één studie gevonden en voor de meeste organismen is cadmium sterk toxisch. Kortdurende blootstelling aan hogere concentraties cadmium geeft een LC50-waarde van 80 mg/l voor jonge *Asellus* en >2000 mg/l voor volwassen exemplaren (Green et al., 1986).

2.5.3.4 IJzer

Asellus heeft weinig last van de aanwezigheid van ijzer in het water. In overlevingsexperimenten van 52-55 uur, was bij 43 mg/l de overleving nog 100%. Bij een hogere ijzerconcentratie daalt de overleving, maar deze is afhankelijk van de locatie van waar de *Asellus* zijn verzameld. Als het water waaruit de *Asellus* is verzameld een hogere ijzerconcentratie bevatte, zijn deze *Asellus* resistentier tegen ijzer in de experimenten (Maltby et al., 1987).

2.5.3.5 Koper

Kortstondige blootstelling aan drinkwater uit koperen leidingen is toxisch voor jonge, pasgeboren, *Asellus* (0,12 mg koper/l). Het heeft echter geen effect op de volwassen exemplaren (Hasu et al., 2008). Langdurige blootstelling aan lagere concentraties (0,005 mg/l) beïnvloedt met name jonge *Asellus* waarbij de groei wordt geremd, en enigszins de embryonale fase. Koper in deze lage concentraties heeft geen effect op de overleving van zwangere vrouwtjes en op de vruchtbaarheid (de Nicola Giudici et al., 1988; de Nicola Giudici et al., 1987). Ook hier hangt de metaaltoxiciteit sterk af van de pH.

2.6 Kweek van *Asellus* in laboratorium

Dit literatuuronderzoek is uitgevoerd onder andere in voorbereiding op laboratoriumexperimenten met *Asellus*, die binnen dit bedrijfsonderzoek worden uitgevoerd. Daarom is ook gekeken naar wat voor kweeksystemen voor *Asellus* er in de wetenschappelijke literatuur worden gebruikt en hoe overlevingsexperimenten worden uitgevoerd. Hieronder zijn een aantal voorbeelden en algemene kenmerken van *Asellus* kweeksystemen en overlevingsexperimenten gegeven.

2.6.1 Opzet kweekstelsel

In de literatuur worden meerdere manieren gebruikt om *Asellus* in leven te houden en zich eventueel ook voort te laten planten. Meestal worden bakjes of kleine aquaria gebruikt waarin het water automatisch ververst en belucht kan worden (Christensen et al., 2011, 2012; Lau et al., 2013; McCahon and Pascoe, 1988; Redondo-Hasselerharm et al., 2018). De temperatuur is vaak laag, ongeveer 10 – 15°C. De belichting tijdens de kweek wordt over het algemeen afgestemd op de omgeving waar de *Asellus* van afkomstig zijn: voor *Asellus* uit oppervlaktewater wordt de belichting aangepast op het dag-nacht ritme (Lau et al., 2013), *Asellus* afkomstig uit het distributienet worden vaak in het donker gekweekt (Christensen et al., 2011, 2012).

Het voedsel dat *Asellus* krijgt tijdens de kweek in een laboratoriumomgeving varieert, maar vaak worden bladeren toegevoegd. Zoals eerder beschreven lijkt het bladsoort minder van belang, onder andere de volgende bladeren zijn gebruikt: *Elodea canadensis* (waterpest), *Quercus sp.* (eik), *Populus canadensis* (populier), *Alnus glutinosa* (els), *Castanea sp.* (kastanje), *Ulmus sp.* (iep) en *Acer sp.* (esdoorn) (Christensen et al., 2011; Graca et al., 1993a, b; Marcus et al., 1978; McCahon and Pascoe, 1988; Redondo-Hasselerharm et al., 2018). Als de *Asellus* afkomstig zijn uit het drinkwaterdistributienet wordt meestal ook sediment toegevoegd (Christensen et al., 2011). *Asellus* hebben een voorkeur voor bladeren die zijn voorbehandeld om de afbraak van het blad te starten: eerst worden de bladeren aan de lucht gedroogd, vervolgens enkele dagen gespoeld in drinkwater en daarna worden ze gedurende ongeveer 2 weken in drinkwater met oppervlaktewater gelegd. De voorbehandelde bladeren worden vervolgens aan de *Asellus* kweek toegevoegd (Bloor, 2011; McCahon and Pascoe, 1988).

2.6.2 Voedings- en overlevingsexperimenten

Asellus wordt veel gebruikt in groei- en/of overlevingsexperimenten, met name om de toxiciteit van chemische stoffen op het leven in oppervlaktewater te testen. Hieronder zijn een aantal voorbeelden gegeven van verschillende soorten groei- en overlevingsexperimenten:

- Testen van de toxiciteit van microplastics op de overleving en groei van *Asellus*. Hiervoor zijn glasbekers gevuld met 211 gram nat sediment en 300 ml water en microplastics. Per beker zijn 11 *Asellus* (4 – 7 mm groot) toegevoegd, elke conditie is in viervoud ingezet. De beker zijn gedurende het experiment handmatig geschud en belucht. Op dag 0 en 14 zijn populierbladeren toegevoegd als voedselbron en na 28 dagen zijn de *Asellus* geoogst en is de grootte bepaald. Gedurende het experiment zijn elke 3-4 dagen de volgende parameters gemeten: zuurstof, pH, temperatuur, elektrische geleidbaarheid en NH₃ (Redondo-Hasselerharm et al., 2018).
- In groei experimenten zijn 5 *Asellus* (7 – 9 mm groot) gedoseerd aan glasbekers met 50 gram kwartsand, 1 voedingstablet (DECOTAB) en 250 ml drinkwater. De glasbekers werden continu belucht en elke conditie is in tienvoud ingezet. Na 21

dagen is de grootte en het gewicht van de *Asellus* bepaald (Kampfraath et al., 2012).

- Overleving en groei van *Asellus* op sediment afkomstig uit de Rijn en Maas, het sediment is afkomstig van verschillende locaties in de rivier waarbij de mate van verontreiniging varieert. *Asellus* zijn geogst uit oppervlaktewater en gedurende maximaal 3 maanden bewaard voor de start van het experiment. Er is niet vermeld onder welke condities de *Asellus* zijn bewaard. Voor elk experiment is een bekersglas gevuld met 30 ml sediment van verschillende locaties, 40 ml drinkwater en 1 *Asellus* (4 – 5 mm groot) en geïncubeerd bij 17°C in schemerlicht. Het sediment was afkomstig uit de vriezer en elke conditie is in tienvoud getest. Gedurende 28 dagen is de overleving en groei van *Asellus* gemeten (De Lange et al., 2005).
- Lethale en sub-lethale toxiciteitstesten met percolaat afkomstig van een vuilstortplaats. Voor de lethale toxiciteitstesten zijn plastic bekersglazen gevuld met 100 ml water (gedestilleerd water met percolaat) en 10 *Asellus* (2 weken oud). De bekers worden continu belucht en geïncubeerd bij 15°C gedurende 4 dagen. Voor de sub-lethale toxiciteitstesten zijn lagere doses percolaat toegevoegd en is de incubatietijd verhoogd naar 4 maanden. In de sub-lethale testen is de reproductiecapaciteit gemonitord. Dit is gedaan door gedurende 4 maanden dagelijks te controleren of er jonge *Asellus* bij zijn gekomen. Bij de acute toxiciteitstesten is een levend-dood bepaling gebruikt (Bloor et al., 2005).
- Voedingsexperiment naar de voorkeur van *Asellus* voor voedingsstoffen. Hiervoor zijn bekersglazen gevuld met 1 cm kwarts zand, 95 ml water afkomstig uit een sloot en 6 *Asellus*. Per bekersglas is een voedingstablet (DECOTAB) toegevoegd waarvan de samenstelling werd gevarieerd. De bekersglazen zijn geïncubeerd bij 20°C met een licht-donker cyclus en continue beluchting. De experimenten zijn in vijfvoud uitgevoerd. Na 16 dagen is het gewicht van het DECOTAB tablet bepaald om te berekenen hoeveel er van is geconsumeerd. Dit is gebruikt als maat voor de voedselvoorkeur van *Asellus* (Vonk et al., 2016).
- Voor groeiexperimenten is een bakje gevuld met 0,8 liter gefiltreerd oppervlaktewater (4 cm diep) dat continu belucht wordt en 8 *Asellus*. Voor elke conditie zijn 4 bakjes gebruikt. Droog berkenblad was 14 dagen voor de start van het experiment al in het water gelegd zodat rotting opgang komt. Gedurende 30 dagen is elke 2 dagen het water en voedsel ververs. Dagelijks zijn de *Asellussen* gecontroleerd op overleving en is het aantal levende en dode *Asellussen* geteld. Bij de start en het eind zijn natgewicht en lengte van de *Asellus* bepaald (Lau et al., 2013).

2.7 Eerder experimenteel onderzoek door KIWA/KWR

In de jaren '90 van de vorige eeuw zijn veel studies gedaan naar groei en overleving van *Asellus*, onder andere op sediment (Hijnen et al., 1992; Koenraadt, 1998; Oppenheimer, 1997; Voorbraak, 1999). In de volgende paragrafen worden de belangrijkste bevindingen uit deze onderzoeken behandeld.

2.7.1 Groei en overleving van *Asellus* onder laboratoriumcondities

Bij KWR zijn in de jaren '90 een groot aantal groei- en overlevingsexperimenten uitgevoerd met *Asellussen* afkomstig uit drinkwater en oppervlaktewater. In het algemeen vond er wel groei plaats op bladmateriaal, al was deze lager dan wat in de literatuur is beschreven. Er vond geen groei plaats op sediment afkomstig uit distributienetten van grondwaterlocaties. Hieronder zijn deze onderzoeken uitgebreider beschreven. Nadeel van deze onderzoeken is dat ze zijn uitgevoerd met kleine aantallen *Asellussen* waardoor statische significante conclusies niet altijd mogelijk zijn.

2.7.1.1 Groei op biofilm

Asellus kan groeien bij 15°C in aanwezigheid van een stukje polyester met daarop een biofilm. Deze experimenten zijn uitgevoerd in petrischaaltjes waaraan een *Asellus* van 3-4 mm en een polyesterstukje werden toegevoegd. Het polyester werd tweewekelijks vervangen (Mayringer, 1996). *Asellus* overleefde gemiddeld 21 - 26 dagen (10 - 30% sterfte na 21 dagen, vergeleken met 18 dagen en 40% sterfte in afwezigheid van de biofilm op polyester) en groeide beperkt. De sterkste relatieve groei trad op in de eerste 7 dagen (0,9 - 5% lengtegroei per dag), de daarop volgende twee weken was de relatieve groei beperkt (0 - 0,7% lengtegroei per dag) De hoeveelheid biofilm leek niet van belang voor de groeisnelheid en overlevingskans (Mayringer, 1996).

2.7.1.2 Groei op drinkwatersediment

In vervolggexperimenten is onderzoek gedaan aan groei van *Asellus* afkomstig uit oppervlaktewater op drinkwatersediment (Oppenheimer, 1997). Het drinkwatersediment is geoogst via spuiacties in de steden Tholen en Nieuwegein, beide grondwaterlocaties. Hiervoor is in tienvoud toegevoegd aan plastic potten van 250 ml: een *Asellus*, 1-2 ml sediment (30 µm of 100 µm fractie), een laagje gegloeid zand en 100 ml steriel leidingwater. Incubatie was bij 16°C, zonder deksel op de potten, in het donker gedurende 6 weken. Elke week is de lengte van de *Asellus* bepaald en zijn de *Asellus* overgezet in een nieuwe pot. Overleving was het hoogst op de 100 µm sediment fractie (7 vs 3 levende exemplaren na 6 weken). De grootste sterfte trad op na week 4, wanneer sediment van een andere locatie werd toegevoegd (week 1-4: Tholen, week 5-6: Nieuwegein). De groei van *Asellus* was erg laag, gemiddeld minder dan 0,4% natgewicht per dag (berekend uit de gemeten lengtegroei), terwijl in de literatuur relatieve groeisnelheden van 1,38% natgewicht per dag (*Asellus* uit oppervlaktewater met slib uit sloot) en 0,69% natgewicht per dag (*Asellus* in alleen water) zijn gevonden (Marcus et al., 1978). Door de kleine opzet van het experiment met een beperkt aantal *Asellussen* is onduidelijk of de groei inderdaad zo beperkt is, of dat er sprake is geweest van toeval, en wat mogelijke verklaringen zijn hiervoor.

Een herhaling van dit experiment, met *Asellus* uit drinkwater en sediment afkomstig van verschillende locaties (Kraggenburg, Tholen, Nieuwegein) dat is toegevoegd in verschillende hoeveelheden, liet een grotere sterfte zien bij de 100 µm sedimentfractie vergeleken met de 30 µm fractie. De sterfte trad weer voornamelijk op in week 5, wanneer 10 ml sediment uit Nieuwegein werd toegevoegd (in dit experiment zijn geen andere volumes sediment getest). Er wordt vermeld dat de *Asellus* moeite hebben met bewegen door deze grote hoeveelheid sediment. Relatieve groeisnelheden liggen op 0,68% (30 µm sediment) en 0,67% (100 µm sediment) natgewicht per dag, de variatie is echter groot (Oppenheimer, 1997).

Vervolgens zijn ook groeiproeven uitgevoerd in drinkwater met *Asellus* en kleinere volumes sediment afkomstig uit het drinkwaterdistributienet (Koenraadt, 1998). Hierbij is steeds een *Asellus* toegevoegd aan een plastic bakje met 150 ml drinkwater, 30 ml uitgegloeid zand en 0 - 8 ml sediment uit drinkwaterleidingen (wat weer bestond uit 50% bezonken sediment en 50% drinkwater). Elke conditie is in 20-voud uitgevoerd. Wekelijks werden lengte en breedte van de *Asellus* gemeten. Overleving was het grootst op 8 ml sediment (60% na 7 weken) en het laagste bij afwezigheid van sediment (0 ml sediment; 0% overleving na 4 weken). Na de eerste 4 weken, waarin afsterving in het algemeen het hoogst was, was de gemiddelde relatieve groeisnelheid met 8 ml sediment lager dan bij 2 ml sediment (8 ml: 2,28% natgewicht per dag; 2 ml: 4,27%; 0,5 ml: 0,84%). In deze studie werd gesuggereerd dat de *Asellus* veel energie kwijt zou zijn met het lopen door een (te) dikke laag sediment en dat dit de groei zou kunnen

remmen. De kleinste hoeveelheid sediment (0,5 ml) resulteerde in de laagste relatieve groeisnelheid (0,84% natgewicht per dag). De hoeveelheid sediment lijkt de groeisnelheid dus te beïnvloeden. Deze getallen komen redelijk overeen met de relatieve groeisnelheden uit de literatuur: 5,8% natgewicht per dag op *Elodea* (waterpest) (Marcus et al., 1978) en 3,6% natgewicht per dag op eikenbladeren (Graça et al., 1993), al zijn in de laatstgenoemde studies wel *Asellus* uit oppervlaktewater gebruikt.

In een vervolproject zijn in glazen kristalleerschaltjes groei- en overlevingsexperimenten uitgevoerd met *Asellus*, sediment en drinkwater afkomstig van Zuidwolde (Drenthe) en IJsselsteyn (Limburg). Per schaalje is één *Asellus* (lengte: ongeveer 3 mm), 150 ml drinkwater en sediment (30 – 500 µm fractie, 50% bezonken sediment en 50% drinkwater) in verschillende sedimentvolumes (0 – 4 ml) toegevoegd. Het experiment werd uitgevoerd bij 16°C en in het donker gedurende 20 weken. De lengte van de *Asellus* werd wekelijks bepaald, waarna water en sediment werden vervangen. In de overleving is duidelijk het verschil tussen de twee locaties zichtbaar. De overlevingspercentages waren het hoogst voor Zuidwolde. In het algemeen geldt dat er meer *Asellus* overleefden met een groter sedimentvolume. In IJsselsteyn nam de sterfte sterker toe na week 15 voor alle sedimentvolumes; bij Zuidwolde was bij dosering van 0,25 en 0,5 ml sediment al na 14 en 15 weken geen *Asellus* meer in leven. In de meeste behandelingen was de relatieve groeisnelheid hoger bij dosering van een groter sedimentvolume: 0,66 – 0,96% per dag voor Zuidwolde en 0,4 – 1,07% per dag voor IJsselsteyn. Op basis van dit onderzoek lijkt de afkomst van zowel *Asellus* als het sediment wel de overleving maar in mindere mate de groeisnelheid van de *Asellus* te kunnen beïnvloeden (Voorbraak, 1999).

2.7.1.3 Groei op bladmateriaal

Asellus afkomstig uit oppervlaktewater zijn gedurende 4 weken in een petrischaaltje met bladmateriaal geïncubeerd in het donker. De gemiddelde overleving is 57% (wel en niet voorbehandeld eikenblad) en 29-86% (respectievelijk niet voorbehandeld en wel voorbehandeld populierenblad). Op eikenblad was de relatieve groeisnelheid 3,6% natgewicht per dag, op populier 1,7% natgewicht per dag. Dit is lager dan in de hierboven beschreven literatuur is genoemd. Deze experimenten zijn uitgevoerd met *Asellus* afkomstig uit het distributienet en oppervlaktewater en verschillende soorten plantmateriaal. Bij start waren de *Asellus* 2,5 – 4,5 mm groot (omgerekend: 0,1 – 0,7 mg natgewicht). Aan een petrischaal met *Asellus* zijn verschillende soorten geconditioneerd plantmateriaal toegevoegd: bladeren van plataan, eik en populier, en de waterplant grof hoornblad. Bij 15°C groeiden de *Asellus* met 0,3 – 1,5% lengtegroei per dag (gelijk aan 1 – 4,5% lichaamsgewicht per dag), berekend als het gemiddelde over 17 dagen. Het type plantmateriaal lijkt niet belangrijk te zijn voor de mate van groei, maar doordat er lage aantallen *Asellus* zijn gebruikt is het lastig is om hier een duidelijk patroon in te kunnen zien (Baars, 1997).

2.8 Conclusies voor vervollexperimenten

Asellus is in het verleden vrij veel bestudeerd en wordt nog steeds gebruikt in studies om inzicht te krijgen in het effect van het milieu en daarin aanwezige stoffen op macroinvertebraten. Bij KWR was nog geen standaardprotocol voor kweek van *Asellus* of voor de uitvoering van groei- en/of overlevingsexperimenten. In de meeste studies wordt *Asellus* in leven gehouden in een bak met water, voorbehandeld bladmateriaal en slib (oppervlaktewater) of sediment (distributienet), al dan niet met verversing van het water. De temperatuur en licht-donker cyclus wordt meestal aangepast aan het milieu waaruit de *Asellus* afkomstig zijn. Er is dus vrij veel variatie in de *Asellus*-

kweeksystemen die in de literatuur worden beschreven, maar in de meeste systemen overleeft *Asellus* en vindt soms ook voortplanting plaats.

Voor de groei- en overlevingsexperimenten die binnen dit onderzoek zullen worden uitgevoerd, wordt aangeraden om de *Asellus* in leven te houden en, indien mogelijk, op te kweken in afgedekte bakken met water, sediment en voorbehandeld bladmateriaal. In eerder onderzoek bij KWR, kon *Asellus* langere tijd overleven en groeien op esdoornblad (van Bel et al., 2017); daarom zullen deze bladeren ook worden gebruikt in de vervollexperimenten.

Uit de hierboven geciteerde groei- en overlevingsexperimenten blijkt dat *Asellus* kan groeien op drinkwatersediment, waarbij groei en overleving afhankelijk lijken te zijn van zowel hoeveelheid als herkomst (kwaliteit) van het sediment. In de meeste experimenten zijn na 3-4 weken verschillen in lengte(groei) te zien tussen behandelingen. Bij gebruik van kleine aantallen *Asellus* kan de variatie binnen behandelingen groter zijn dan de verschillen tussen behandelingen. Daarom zal eerst een poweranalyse worden uitgevoerd om uit te rekenen hoeveel *Asellus* er bij een bepaalde effectgrootte nodig zouden moeten zijn om significante verschillen te kunnen meten tussen behandelingen. Om naast groei ook overleving te kunnen bepalen dient de doorlooptijd van het experiment langer te zijn. Verschillen in overleving zijn immers alleen meetbaar wanneer er genoeg individuen overleden zijn.

3 Methode ontwikkeling *Asellus* kweek

3.1 Verzamelen van *Asellus*

3.1.1 Spuien in distributiegebied Evides

Op 2 juli 2018 zijn door Evides meerdere spuiacties uitgevoerd om *Asellus* te verzamelen om hiermee de *Asellus* kweek op te zetten. Hiervoor is op 4 locaties met de maximale snelheid (>1,5 m/s) gespuid waarbij zowel de klep van de brandkraan als de klep in de spuikop geheel open zijn gezet. De locaties zijn gekozen op basis van historische gegevens waaruit blijkt dat de kans groot is dat er veel levende *Asellussen* aanwezig zijn en verzameld kunnen worden. De spuiplannen voor de volgende locaties zijn gegeven in Bijlage I (Figuur 7 - Figuur 10):

- Jan van Beaumondestraat 4, Tholen
- Vroonland 25, Sint-Annaland
- Noordstraat 1, Sint-Annaland
- Noordstraat 42, Poortvliet

Op elke locatie is een standaard spuiactie uitgevoerd (van Lieverloo et al., 2004a) waarbij het volgende is bemonsterd:

- 20 liter drinkwater (kraantje op de spuikop), bemonsterd voor start spuien
- 20 liter spuiwater, bemonsterd tijdens spuien
- 90% uitgang van de spuikop: 500 µm planktonnet. Hiermee worden deeltjes en invertebraten >500 µm verzameld.
- 10% uitgang van de spuikop: 500 µm, 100 µm, 30 µm planktonnet. Hiermee worden deeltjes en invertebraten verzameld van 30 - 100 µm, 100 - 500 µm en >500 µm.

Elke sedimentfractie is in een eigen pot bewaard en naar KWR vervoerd op kamertemperatuur in het donker. Aan het 500 µm sediment waarin zich de *Asellus* bevond is ongeveer 300 ml drinkwater toegevoegd zodat de *Asellus* niet droog kwam te staan tijdens transport.

Uit het 500 µm sediment zijn alle levende *Asellus* voorzichtig geïsoleerd d.m.v. een pincet en in glazen petrischaaltjes met 100 µm en 30 µm sediment en spuiwater bewaard in het donker bij kamertemperatuur (Bijlage II, Figuur 11 - Figuur 14). De volgende dag zijn ze aan de kweekbakken (paragraaf 3.2) toegevoegd. Eventuele *Asellus*-exemplaren in de 100-500 µm en 30-100 µm sedimentfracties zijn verwijderd en gebruikt voor de *Asellus* kweek, daarna zijn de sedimentfracties gemengd en in porties ingevroren bij -80°C voor gebruik in de *Asellus* kweek.

De aantallen en grootte van de *Asellus* die gevonden zijn bij de spuiacties verschillen tussen de spuiacties (Tabel 3).

Tabel 3. Aantallen levende *Asellus* gevonden bij de spuiacties. De lengte van de *Asellussen* is geschat en niet gemeten, hierbij is de volgende classificering gebruikt: klein: <4 mm; vrij groot: 5-7 mm; groot: > 7 mm.

| Spuilocatie | Levende <i>Asellus</i> | Opmerkingen |
|-----------------------------------|------------------------|--|
| Noordstraat 42, Poortvliet | 11 | Vrij grote <i>Asellus</i> |
| Jan van Beaumondestraat 4, Tholen | 67 | Grote en kleine <i>Asellus</i> |
| Vroonland 25, Sint-Annaland | 33 | Voornamelijk grote <i>Asellus</i> , ook paar kleine |
| Noordstraat 1, Sint-Annaland | 15 | Veel kleine <i>Asellus</i> , verder grote <i>Asellus</i> |

3.1.2 Aanschaf *Asellus* via particuliere kweek

Voor het testexperiment zijn ongeveer 50 levende *Asellus* van dezelfde grootte nodig, hiervan is de helft afkomstig uit het distributienet en de andere helft is gekocht bij een particuliere kweek in Duitsland. *Asellussen* die niet zijn gebruikt voor de experimenten zijn in een aparte kweekbak gehouden (paragraaf 3.2.2).

3.2 Opzet *Asellus* kweek

Er zijn twee kweekmethoden getest, een kweek met (paragraaf 3.2.1) en een kweek zonder (paragraaf 3.2.2) continue doorstroming. Uit het literatuuronderzoek (hoofdstuk 2) werd duidelijk dat de meeste *Asellus* kweken continu doorstroomd worden. Daarom is dit eerst geprobeerd. Aangezien dit niet werkte, is daarna een kweek zonder continue doorstroming geprobeerd.

3.2.1 Kweek met continue doorstroming

In totaal zijn er 4 kweekbakken opgezet met ongeveer 30 *Asellussen* per bak, afkomstig van de spuiactie op 5 juli 2018 (Tabel 4). Hiervoor zijn *Asellussen* afkomstig uit verschillende spuiacties soms met elkaar gemengd. Aangezien het sediment dat als voedsel wordt gegeven ook een mengsel is van sediment van de verschillende spuilocaties, is de verwachting dat het combineren van *Asellussen* van verschillende locaties geen effect zal hebben. Overal waar 'drinkwater' wordt genoemd betreft het water van KWR, afkomstig van Tull en 't Waal (Vitens),

Tabel 4. Verdeling van *Asellus* over kweekbakken. Aangegeven is hoeveel *Asellus* per locatie aan een kweekbak zijn toegevoegd bij de start.

| Levende <i>Asellus</i> per kweekbak | Noordstraat 42, Poortvliet | Jan van Beaumondestraat 4, Tholen | Vroonland 25, Sint-Annaland | Noordstraat 1, Sint-Annaland |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Bak 1 | 11 | 22 | | |
| Bak 2 | | | 33 | |
| Bak 3 | | 15 | | 15 |
| Bak 4 | | 30 | | |

De kunststof kweekbakken zijn 36 x 27 cm groot, met een waterlaag van ongeveer 5 cm (ongeveer 4,5 liter; Figuur 1, Figuur 2). Aan elke kweekbak zijn bij de start 4 ml

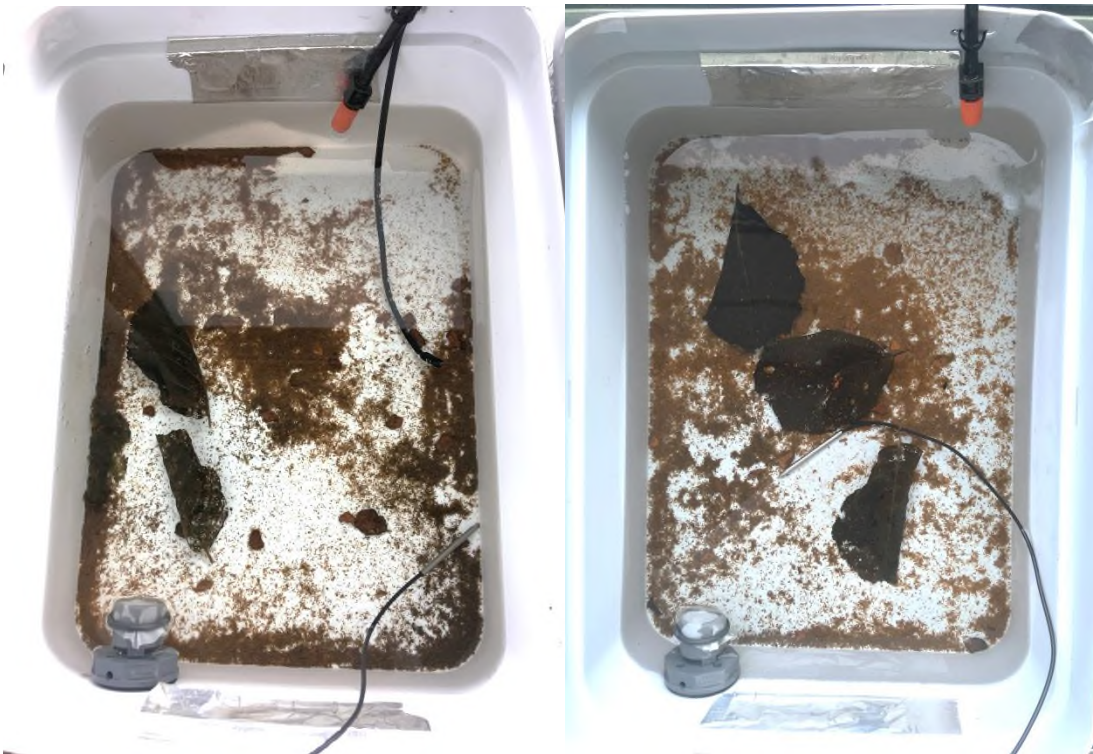
sediment van zowel de 100 µm-fractie als de 30 µm-fractie en twee voorbehandelde elzenbladeren (*Alnus glutinosa*) toegevoegd. De bladeren zijn bij 37°C in een stoof gedroogd. Vervolgens zijn de bladeren voorbehandeld door deze gedurende 3 dagen in drinkwater te weken waarbij het water tweemaal per dag werd verversd. Na dag drie is het drinkwater nogmaals verversd met drinkwater en is 5-10% oppervlaktewater (Lekkanaal) toegevoegd. Deze wijze van voorbehandeling is bedoeld om afbraak van het blad en schimmeligroei hierop te bevorderen, zodat de bladeren een betere voedselbron vormen voor de *Asellussen*. Na twee weken, vlak voor toediening aan de kweekbakken, zijn de bladeren afgespoeld met drinkwater. Ongeveer elke 3 weken is er 4 ml sediment toegevoegd. Nieuwe, voorbehandelde, bladeren werden toegevoegd wanneer de oude bladeren bijna waren verteerd. Oud blad en sediment werden niet verwijderd.

Het water werd continu verversd met drinkwater met 40 – 80 ml per minuut. Gedurende de eerste maand is het zuurstofgehalte in de kweekbakken ongeveer 2x per week bepaald. Door de continue verversing was deze vrij constant tussen de 6,6 en 8,4 mg zuurstof/l. Onder alle kweekbakken is een verwarmingsmat gelegd om de watertemperatuur op ongeveer 20 – 22°C te houden. Bij deze temperatuur zou voortplanting snel moeten plaats vinden. In de bakken was het donker door afdekking met de deksel en aluminiumfolie.

In elke bak hing een thermometer; het waterslangetje voor verversing van het water hing boven het waterniveau om te voorkomen dat *Asellus* in het slangetje kon komen. De overloop was afgesloten met planktongas met openingen kleiner dan 100 µm. Op deze manier konden de *Asellussen* niet ontsnappen maar werd het water wel continu verversd.



Figuur 1. Opstelling van *Asellus* kweekbakken



Figuur 2. Voorbeeld van twee *Asellus* kweekbakken. Bovenin is het waterslangetje te zien, onderin de overflow afgesloten met planktonnet en op de bodem ligt de thermometer om de watertemperatuur te monitoren en in de linker kweekbak is nog een thermometer aanwezig (rechtsbovenin) waarmee de verwarmingsmatjes onder de kweekbakken worden gereguleerd.

De *Asellussen* waren met name aan de onderkant van de bladeren te vinden, en af en toe ook op de bodem en de wanden van de bakken. Dode exemplaren werden bij de wekelijkse inspectie verwijderd.

Deze pilotopstelling heeft ongeveer 2 maanden geduurd; in deze periode vond geen reproductie plaats en het aantal waterpissebedden nam af in de loop der tijd. De resterende levende *Asellussen* zijn gebruikt om een nieuwe kweek, zonder doorstroom (hieronder beschreven), op te zetten. De *Asellussen* zijn aangevuld met nieuwe waterpissebedden uit spuiacties.

3.2.2 Kweek zonder doorstroming

De nieuwe opstelling bestond uit dezelfde plastic bakken als in de doorstroomopstelling, maar zonder doorstroming. Om deze reden zijn de thermometers en warmhoudmatjes ook verwijderd: zonder doorstroming is de temperatuur ongeveer 18 - 19°C. Aan elke bak zijn meerdere voorbehandelde esdoornbladeren toegevoegd, en hetzelfde sediment als bij de doorstroomopstelling. Elke 2-3 weken werd er nieuw blad en sediment toegevoegd, waarbij het oude sediment, bladeren en dode *Asellus*-exemplaren niet werden verwijderd. In principe werd het water hierbij niet ververs, alleen incidenteel om verliezen door bijvoorbeeld verdamping aan te vullen.

Onder deze omstandigheden groeien de individuele *Asellussen* en de populatie neemt ook sterk toe. Van de bakken die na verloop van tijd te vol werden, zijn één of enkele bladeren overgezet naar een nieuwe plastic bak met sediment. Aangezien de *Asellus*

zich voornamelijk op bladeren bevinden, wordt zo een groot deel van de populatie overgebracht naar de nieuwe bak om verder te groeien.

Asellussen die tijdens latere spuiacties zijn bemonsterd, zijn toegevoegd aan al bestaande of nieuwe kweekbakken, net als *Asellus* verkregen via een particuliere kweek in Duitsland. De *Asellus* uit particuliere kweek zijn in eerste instantie gescheiden gehouden van de originele populatie. Na enkele maanden, waarbij de originele *Asellus* individuen zeer waarschijnlijk zijn overleden en de kweek alleen nog maar uit nageslacht bestaat die in de laboratoriumkweek zijn geboren, zijn de populaties samengevoegd.

3.2.3 Conclusie

Op grond van de veel betere groei en overleving van *Asellus* in de tweede kweekopstelling (zonder doorstroming), is voor de vervollexperimenten gekozen voor deze opstelling. Vermoed wordt dat de afwezigheid van de doorstroming en dus continue verversing van het water, en mogelijk de iets lagere temperatuur de belangrijkste factoren zijn in de overleving en reproductie van *Asellus* in de kweekopstelling.

4 Methode ontwikkeling groei- en overlevingsexperiment

4.1 Materiaal en methoden

4.1.1 *Asellus*

Voor het groei- en overlevingsexperiment zijn *Asellussen* gebruikt die bij een particuliere kweek in Duitsland zijn gekocht of afkomstig zijn uit het distributienet van Evides.

4.1.2 Sediment

Het sediment voor het groei- en overlevingsexperiment is verzameld zoals beschreven in paragraaf 3.1.1.

Het volume van het sediment, zonder bovenstaand water, is bepaald en 1:1 verdund met drinkwater. Dit is homogeen gemengd en opgeslagen bij -80°C tot gebruik in het experiment.

4.1.3 Water

Het water in de groei- en overlevingsexperimenten is elke week ververs.

4.1.4 Bladmateriaal

Op één moment zijn een groot aantal elzen- en esdoornbladeren geoogst en gedroogd bij kamertemperatuur. Na drogen zijn de bladeren droog opgeslagen en 2 weken voor toediening aan de kweekbakken of overlevingsexperimenten zijn de bladeren geweekt in drinkwater van KWR (Tull en 't Waal) met 10% oppervlaktewater (Lekkanaal) om het rottingsproces op te starten. Na het weken zijn de bladeren afgespoeld met drinkwater.

4.1.5 Experimentele opzet en metingen

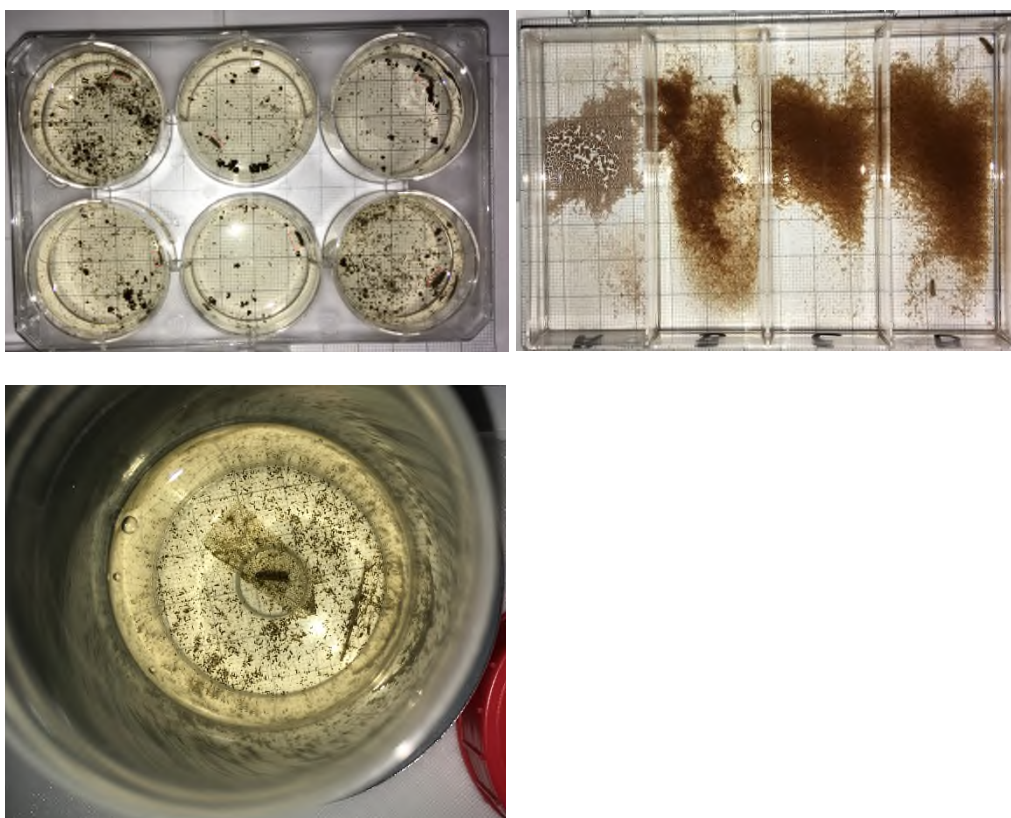
4.1.5.1 Verkennende proef

Om het protocol van groei- en overlevingsexperimenten met *Asellus* te optimaliseren is een verkennende proef uitgevoerd waarin de volgende factoren zijn onderzocht:

1. afkomst *Asellus*: distributienet Evides, particuliere kweek uit Duitsland
2. dieet: sediment afkomstig uit distributienet Evides (een mengsel van sediment van verschillende spuilocaties uit paragraaf 3.1.1, ingevroren geweest en niet ververs tijdens de duur van het experiment); esdoornblad (nieuw blad toegevoegd als het oude blad was opgegeten).
3. experimentele eenheid: 6-wells plaat, 4-wells plaat, monsterpotje met of zonder (rode) deksel (Figuur 3)

Tabel 5. Experimentele eenheden en onderzochte voeding in de verkennende proef voor groei en overleving van *Asellus*. Gegeven is de hoeveelheid water, sediment of blad die per well is gedoseerd. Per well of monsterpotje was 1 *Asellus* aanwezig.

| | 6-wells plaat | 4-wells plaat | Monsterpotje |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Water | 10 ml | 10 ml | 50 ml |
| Sediment | 0,5 ml | 1 ml | 5 ml |
| Voorbehandeld esdoornblad | 2 cm ² | 2 cm ² | 2 cm ² |

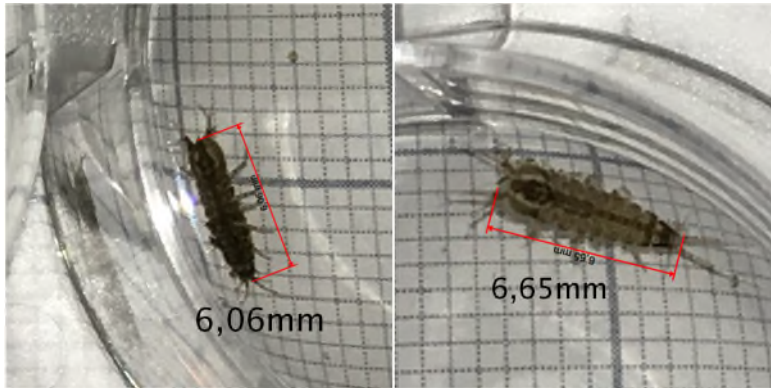


Figuur 3. Geteste experimentele eenheden: 6-wells plaat, 4-wells plaat en potje met of zonder rode deksel.

In de verkennende proef zijn de overleving en de groei van de *Asellussen* gevolgd gedurende 8 weken. Per conditie zijn 6 *Asellussen* gebruikt (3 uit eigen kweek en 3 uit Duitsland) om een indicatie te krijgen van de effectgrootte van bovengenoemde factoren. De lengte van de *Asellus* is tweewekelijks bepaald door foto's te maken van de *Asellus* in de experimentele eenheden. Verder is wekelijks gecontroleerd of de *Asellussen* dood of levend waren.

Voor de lengtebepaling is na het overzetten van de *Asellus* naar een nieuwe 6-wells met water, maar zonder sediment of blad, op gestandaardiseerde manier een foto gemaakt van de 6-well. Met behulp van het programma Nuance Power PDF Advanced is de lengte bepaald van de *Asellus*. Als de *Asellus* niet plat op de bodem staat maar schuin in het water ligt, het lichaam gebogen heeft of zich in de rand van de 6-wellsplaat bevindt, kan de gemeten lengte door perspectief en/of breking van het water kleiner zijn dan de

werkelijke lengte. In opeenvolgende metingen kan het hierdoor lijken dat de *Asellus* krimpt. Omdat *Asellus* een exoskelet heeft, is krimpen niet mogelijk en zijn afnames in lengte dus een gevolg van artefacten van de gebruikte methode. In Figuur 4 zijn twee voorbeelden van lengtemetingen gegeven, hierbij is alleen het lichaam gemeten zonder bijvoorbeeld de pootjes of antennes.

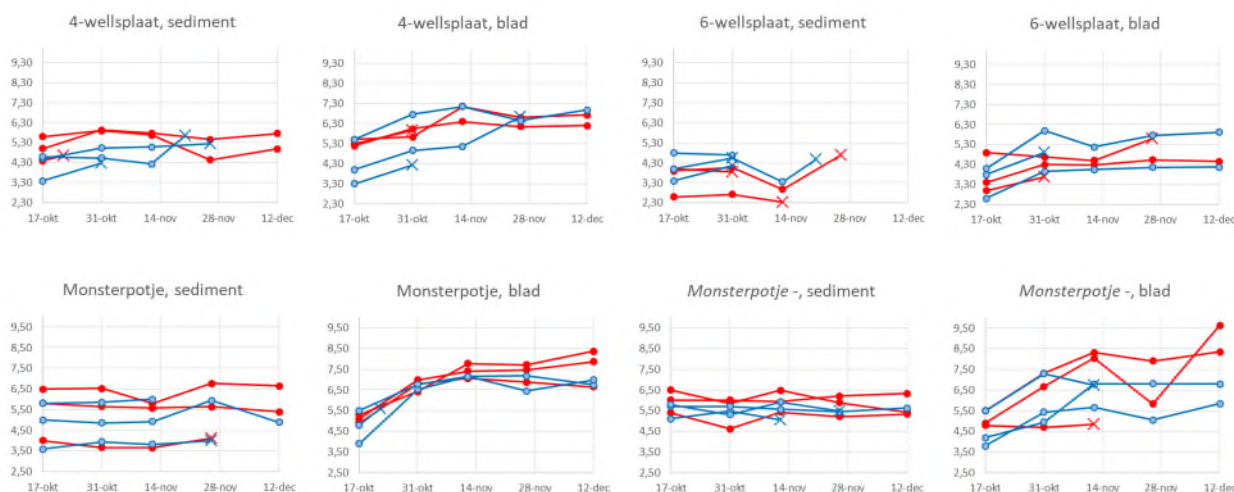


Figuur 4. Lengtemeting van *Asellus* met het programma Nuance Power PDF Advanced.

4.2 Resultaten en discussie

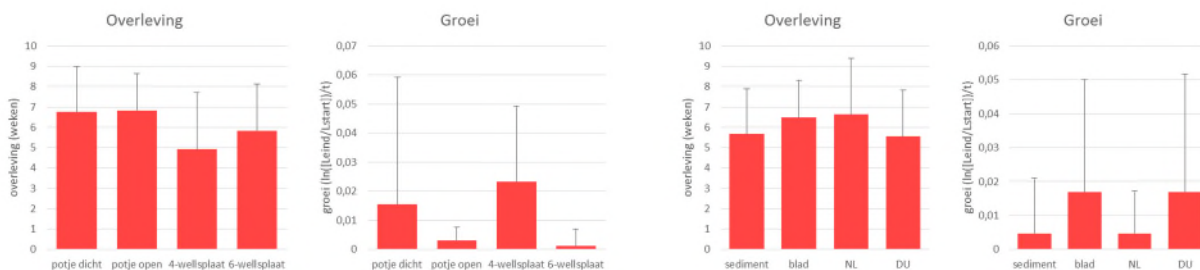
In de verkennende proef lijkt er verschil in zowel groei als overleving tussen verschillende behandelingen (blad, sediment; Figuur 5). Gezien de kleine effectgrootte en de lage aantallen individuen zijn deze verschillen niet altijd even duidelijk of significant. Er lijkt geen verschil in overleving en groei tussen de *Asellussen* afkomstig uit het distributienet van Evides en de *Asellussen* uit Duitsland, ongeacht de behandeling (voedingsbron, experimentele eenheid).

De resultaten laten zien dat *Asellus* groeit als er bladmateriaal aanwezig is, maar niet als het dieet alleen uit sediment bestaat (Figuur 5). De maximale lengte die wordt bereikt tijdens het experiment is ongeveer 8-9 mm, maar er zit soms vrij veel spreiding in de lengteverdeling bij de start van het experiment. Dit maakt het lastig om effecten op de groei te beoordelen.



Figuur 5. Lengte van *Asellus* in de tijd onder verschillende behandelingen (verticale as: lengte in mm). Voedselbron: sediment of esdoornblad. Experimentele eenheid: 4- en 6-wellsplaat, monsterpotje met en zonder deksel. Rood: *Asellus* afkomstig uit kweek in Duitsland; blauw: *Asellus* afkomstig uit distributienet Evides en gekweekt in het laboratorium KWR.

In zowel de 4-wells- als 6-wells-platen is de gemiddelde overleving korter dan in de monsterpotjes (Figuur 6), maar door het beperkte aantal geteste *Asellus* is de standaarddeviatie hoog. Er lijkt geen verschil te zijn tussen monsterpotjes met open of gesloten deksel. Het mogelijke verschil tussen de monsterpotjes en 4- en 6-wells platen zou kunnen worden veroorzaakt door de grotere hoeveelheid sediment in de monsterpotjes (0,5 vs 5 ml), hoewel het door de grote standaarddeviatie de vraag blijft in hoeverre dit daadwerkelijk een verschil is.



Figuur 6. Overleving (in aantal weken) onder verschillende behandelingen. Gegeven is het gemiddelde met standaarddeviatie (foutbalken).

4.3 Aanbevelingen

- Gezien de te verwachten grote variatie binnen één behandeling zijn er veel replica's nodig. Dit kan berekend worden met een poweranalyse.
- De herkomst van de *Asellus* lijkt de resultaten niet te beïnvloeden Omdat de opbrengst van (CO₂-)spuiacties vaak te laag is kunnen beter *Asellussen* uit Duitsland worden gebruikt.
- Voor een betere beoordeling van de lengtegroei is het aan te raden om met een meer uniforme grootteverdeling en met kleinere *Asellussen* (ongeveer 3 mm) te starten.

- Hoewel de overleving vergelijkbaar of misschien beter is in de monsterpotjes, is de tijd benodigd voor beoordeling van effect van water en sediment of blad op overleving en lengtemeting per *Aseillus* vele malen langer. Daarom wordt aanbevolen 6-wells platen te gebruiken.
- Gezien het mogelijke effect van het sedimentaanbod, en omdat het blad regelmatig verversed wordt, wordt aanbevolen om ook het sediment regelmatig te verversen, gelijktijdig met het blad.

Deze aanbevelingen zijn gebruikt om het protocol voor vervollexperimenten (beschreven in een ander rapport) aan te passen.

5 Referenties

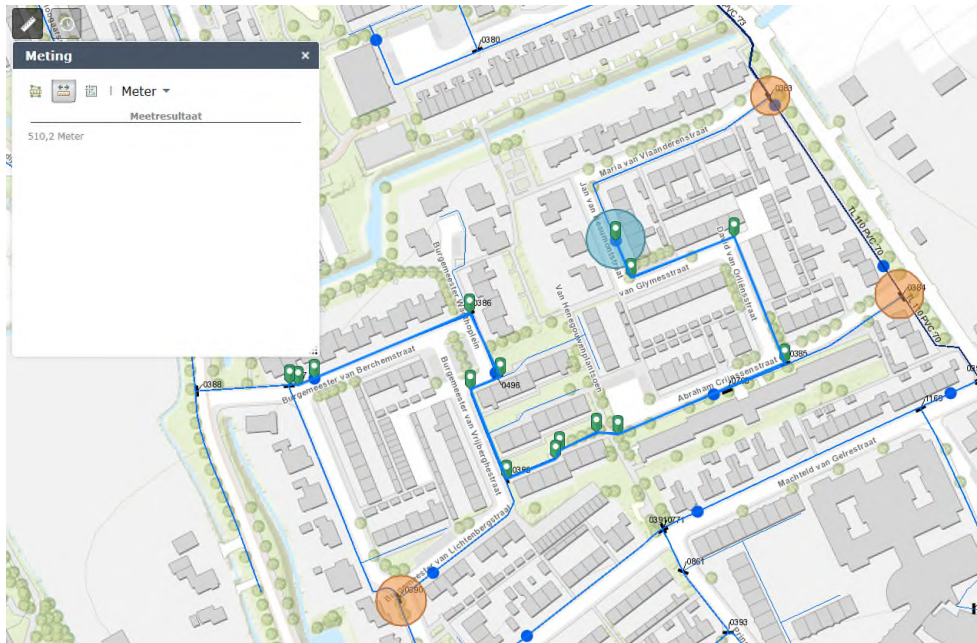
- Baars, H.C.A., 1997. Populaties van waterpissebedden (Crustacea; Isopoda) in drinkwaterleidingen. Kiwa.
- Bloor, M.C., 2010. Animal standardisation for mixed species ecotoxicological studies: Establishing a laboratory breeding programme for *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Zoologica Baetica* 21, 179-190.
- Bloor, M.C., 2011. Dietary Preference of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* during a Laboratory Breeding Programme for Ecotoxicological Studies. *International Journal of Zoology* 2011.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., Krivtsov, V., 2005. Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environ Int* 31, 269-273.
- Braginskiy, L., Shcherban, E., 1978. Acute toxicity of heavy metals to aquatic invertebrates at different temperatures. *Hydrobiological journal* 14, 86-92.
- Brett, M., Müller-Navarra, D., 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshw Biol* 38, 483-499.
- Brown, B., 1976. Observations on the tolerance of the isopod *Asellus aquaticus* Rac to copper and lead. *Water Res* 10, 555-559.
- Chen, J.P., Nagayama, F., Chang, M.C., 1991. Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57, 2426.
- Christensen, S.C., Arvin, E., Nissen, E., Albrechtsen, H.J., 2013. *Asellus aquaticus* as a potential carrier of *Escherichia coli* and other coliform bacteria into drinking water distribution systems. *Int J Environ Res Public Health* 10, 845-855.
- Christensen, S.C., Nissen, E., Arvin, E., Albrechtsen, H.J., 2011. Distribution of *Asellus aquaticus* and microinvertebrates in a non-chlorinated drinking water supply system--effects of pipe material and sedimentation. *Water Res* 45, 3215-3224.
- Christensen, S.C., Nissen, E., Arvin, E., Albrechtsen, H.J., 2012. Influence of *Asellus aquaticus* on *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* and naturally occurring heterotrophic bacteria in drinking water. *Water Res* 46, 5279-5286.
- De Lange, H.J., De Haas, E.M., Maas, H., Peeters, E.T.H.M., 2005. Contaminated sediments and bioassay responses of three macroinvertebrates, the midge larva *Chironomus riparius*, the water louse *Asellus aquaticus* and the mayfly nymph *Ephoron virgo*. *Chemosphere* 61, 1700-1709.
- de Nicola Giudici, M., Migliore, L., Gambardella, C., Marotta, A., 1988. Effect of chronic exposure to cadmium and copper on *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda). *Hydrobiologia* 157, 265-269.
- de Nicola Giudici, M., Migliore, L., Guarino, S.M., 1987. Sensitivity of *Asellus aquaticus* (L.) and *ProAsellus coxalis* Dollf. (Crustacea, Isopoda) to Copper. *Hydrobiologia* 146, 63-69.
- Elangovan, R., Ballance, S., White, K.N., McCrohan, C.R., Powell, J.J., 1999. Accumulation of aluminium by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* in neutral water. *Environ Pollut* 106, 257-263.
- Evers, N., Schipper, M., Barten, I., Scheepens, M., 2017. Hoe ver moet de waterkwaliteit verbeteren om de ecologische KRW-doelen te kunnen halen? H2O-online 3 juli 2017.
- Fraser, J., Parkin, D., Verspoor, E., 1978. Tolerance to lead in the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. *Water Res* 12, 637-641.
- Furmanska, M., 1979. Studies of the effect of copper, zinc and iron on the biotic components of aquatic ecosystems. *Polskie Archwm Hydrobiol* 26, 213-220.
- Gauthier, V., Gérard, B., Portal, J.-M., Block, J.-C., Gatel, D., 1999. Organic matter as loose deposits in a drinking water distribution system. *Water Res* 33, 1014-1026.

- Graca, M.A., Maltby, L., Calow, P., 1993a. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* : II. Effects on growth, reproduction and physiology. *Oecologia* 96, 304-309.
- Graca, M.A., Maltby, L., Calow, P., 1993b. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* I: feeding strategies. *Oecologia* 93, 139-144.
- Graça, M.A.S., Maltby, L., Calow, P., 1993. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Oecologia* 96, 304-309.
- Green, D.W.J., Williams, K.A., Pascoe, D., 1986. The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L). *Arch Environ Contam Toxicol* 15, 465-471.
- Gunkel, G., Michels, U., Scheideler, M., Rippl, K., 2010. Vorkommen und Bedeutung von Kleintieren in Trinkwasser-Verteilungssystemen – Massnahmen zu deren Regulierung, Fachbericht Wasserversorgung, pp. 716-724.
- Gunkel, G., Scheideler, M., 2011. Wasserasseln in Trinkwasser-Verteilungssystemen - Eintrag, Vorkommen, Bewertung und Bekämpfung der Wasserasseln, gwf-Wasser Abwasser, pp. 308-388.
- Halder, S.K., Maity, C., Jana, A., Pati, B.R., Mondal, K.C., 2012. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. *BioControl* 57, 441-449.
- Hasu, T., Jokela, J., Valtonen, E.T., 2008. Effects of growth factors and water source on laboratory cultures of a northern *Asellus aquaticus* (Isopoda) population. *Aquat Ecol* 42, 141-150.
- Hijnen, W., Reijnen, G., Bos, R.H.M., Veenendaal, G., van der Kooij, D., 1992. Lagere *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater van pompstation Zuidwolde door verbeterde ontgassing en vernieuwen van het filtergrind. *H2O* 25.
- Kampfraath, A.A., Hunting, E.R., Mulder, C., Breure, A.M., Gessner, M.O., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2012. DECOTAB: a multipurpose standard substrate to assess effects of litter quality on microbial decomposition and invertebrate consumption. *Freshwater Science* 31, 1156-1162.
- Koenraad, S., 1998. De groeisnelheid van *Asellus aquaticus* op sediment uit drinkwaterleidingen. Ofwel: het succes van de waterpissebed. Kiwa N.V., Nieuwegein.
- Lau, D., Goedkoop, W., Vrede, T., 2013. Cross-ecosystem differences in lipid composition and growth limitation of a benthic generalist consumer. *Limnol Oceanogr* 58, 1149-1164.
- Lau, D.C.P., Vrede, T., Pickova, J., Goedkoop, W., 2012. Fatty acid composition of consumers in boreal lakes – variation across species, space and time. *Freshw Biol* 57, 24-38.
- Learbuch, K.L.G., van Bel, N., 2018. Temperatuurafhankelijke groei van *Aeromonas* in drinkwater. KWR, Nieuwegein, p. 33.
- Maltby, L., Snart, J.O.H., Calow, P., 1987. Acute toxicity tests on the freshwater isopod, *Asellus aquaticus* using $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, with special reference to techniques and the possibility of intraspecific variation. *Environ Pollut* 43, 271-279.
- Marcus, J., Sutcliffe, D., Willoughby, L., 1978. Feeding and growth of *Asellus aquaticus* (Isopoda) on food items from the littoral of Windermere, including green leaves of *Elodea canadensis*. *Freshwater Biology* 8, 505-519.
- Martin, T.R., Holdich, D.M., 1986. The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to fresh-water asellids and gammarids). *Water Res* 20, 1137-1147.
- Mayringer, P., 1996. Methoden voor volgen van groei en vermeerdering van waterpissebedden op biofilm. Kiwa.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988. Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere* 17, 2471-2480.
- Økland, K.A., 1978. Life history and growth of *Asellus aquaticus* (L.) in relation to environment in a eutrophic lake in Norway. *Hydrobiologia* 59, 243-259.

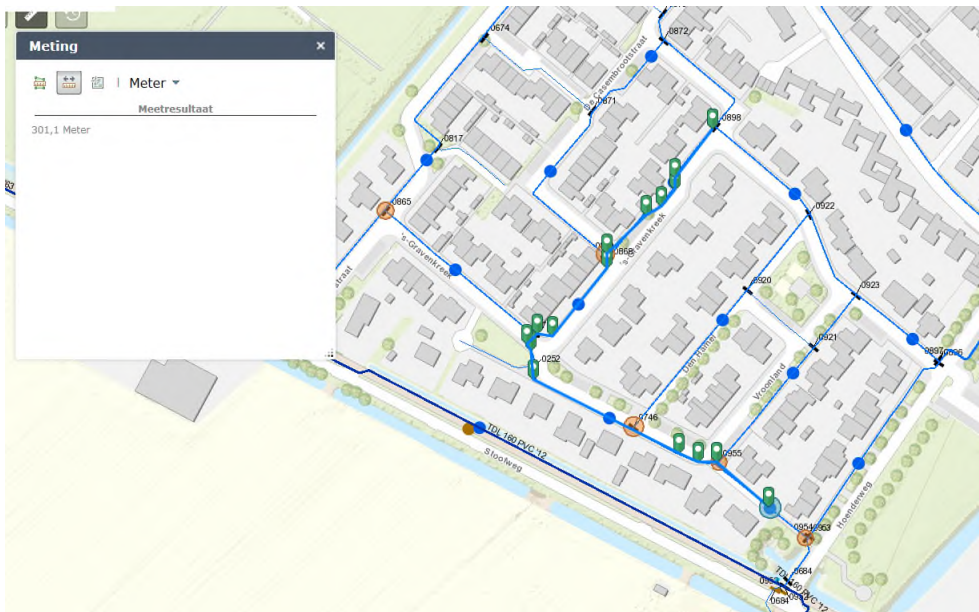
- Oleszkiewicz, A., Geringer, d., Oedenberg, M., Chapman, J., 2001. Experience in controlling *Asellus aquaticus* in water distribution systems. *Water Science and Technology: Water Supply* 1, 217.
- Oppenheimer, M., 1997. Groei en vermeerdering van *Asellus aquaticus* L. op sediment en bladmateriaal. Kiwa N.V.
- Redondo-Hasselerharm, P.E., Falahudin, D., Peeters, E.T.H.M., Koelmans, A.A., 2018. Microplastic Effect Thresholds for Freshwater Benthic Macroinvertebrates. *Environ Sci Technol* 52, 2278-2286.
- Rossi, L., Vitagliano-Tadini, G., 1978. Role of Adult Faeces in the Nutrition of Larvae of *Asellus aquaticus* (Isopoda). *Oikos* 30, 109-113.
- Steel, E.A., 1961. Some observations on the life history of *Asellus aquaticus* (L.) and *Asellus meridianus* Racovitza (Crustacea: Isopoda). *Journal of Zoology* 137, 71-87.
- Tolba, M.R., Holdich, D.M., 1981. The effect of water quality on the size and fecundity of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Aquatic Toxicology* 1, 101-112.
- van Bel, N., 2018. Groei van *Aeromonas* op sediment en ongewervelde dieren uit het distributienet van de productielocaties Kralingen, Braakman en Berenplaat van Evides. KWR, Nieuwegein, p. 72.
- van Bel, N., Hup, K., Kolkman, A., Brouwer, A.J., Hijnen, W.A.M., 2017. Verband tussen *Aeromonas* nagroei en de aanwezigheid van waterpissebedden. KWR, Nieuwegein, p. 44.
- van Bel, N., Wullings, B.A., Hijnen, W.A.M., 2016. Isolatie en identificatie van *Aeromonas* stammen uit vijf DPWE voorzieningsgebieden en hun groeikarakteristieken. KWR, Nieuwegein, p. 27.
- van der Wielen, P.W.J.J., van Lieverloo, H., 2016. Landelijke inventarisatie ongewervelde dieren 2009-2013. KWR, Nieuwegein, p. 62.
- van Hattum, B., de Voogt, P., van den Bosch, L., van Straalen, N.M., Joosse, E.N., Govers, H., 1989. Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) from aqueous and dietary sources. *Environ Pollut* 62, 129-151.
- van Lieverloo, H., van Buuren, R., veenendaal, G., van der Kooij, D., 1997a. How to control invertebrates in distribution systems: By starvatin or by flushing?, *Proceedings AWWA Water Quality Technology Conference, Denver*.
- van Lieverloo, H., van der Kooij, D., 1996. Waterpissebedden: natuurlijke maar ongewenste bewoners van systemen voor distributie van drinkwater. *H2O* 29, 773-774.
- van Lieverloo, H., van der Kooij, D., Hoogenboezem, W., 2002. Invertebrates and Protozoa (Free-living) in Drinking Water Distribution Systems, in: Bitton, G. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 1718-1733.
- van Lieverloo, H., veenendaal, G., van der Kooij, D., 1997b. Dierlijke organismen in systemen voor distributie van drinkwater. Kiwa N.V.
- van Lieverloo, J.H., Bosboom, D.W., Bakker, G.L., Brouwer, A.J., Voogt, R., De Roos, J.E., 2004a. Sampling and quantifying invertebrates from drinking water distribution mains. *Water Res* 38, 1101-1112.
- van Lieverloo, J.H., Van Buuren, R., Veenendaal, G., van der Kooij, D., 1998. Controlling invertebrates in distribution systems with zero or low disinfectant residual. *Water Supply* 16, 199-204.
- van Lieverloo, J.H.M., Bosboom, D.W., Bakker, G.L., Brouwer, A.J., Voogt, R., De Roos, J.E.M., 2004b. Sampling and quantifying invertebrates from drinking water distribution mains. *Water Res* 38, 1101-1112.
- van Lieverloo, J.H.M., Hoogenboezem, W., Veenendaal, G., van der Kooij, D., 2012. Variability of invertebrate abundance in drinking water distribution systems in the Netherlands in relation to biostability and sediment volumes. *Water Res* 46, 4918-4932.
- Vonk, J.A., van Kuijk, B.F., van Beusekom, M., Hunting, E.R., Kraak, M.H., 2016. The significance of linoleic acid in food sources for detritivorous benthic invertebrates. *Sci Rep* 6, 35785.

- Voorbraak, B., 1999. De groeisnelheid van *Asellus aquaticus* L. bij lage concentratie drinkwatersediment. Kiwa N.V., Nieuwegein.
- Wang, Y., Brune, A., Zimmer, M., 2007. Bacterial symbionts in the hepatopancreas of isopods: diversity and environmental transmission. *FEMS Microbiology Ecology* 61, 141-152.
- Zimmer, M., Bartholmé, S., 2003. Bacterial endosymbionts in *Asellus aquaticus* (Isopoda) and *Gammarus pulex* (Amphipoda) and their contribution to digestion. *Limnology and Oceanography* 48, 2208-2213.

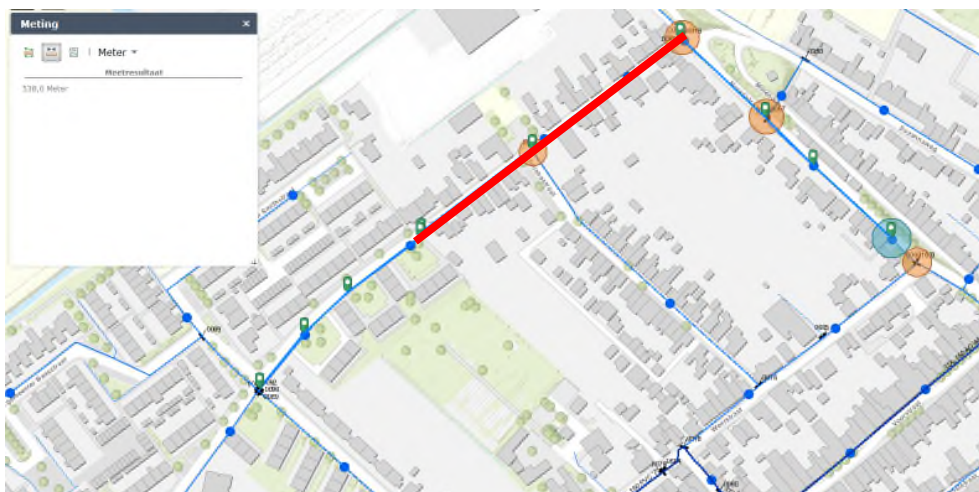
Bijlage I Spuiplannen van 5 juli 2018



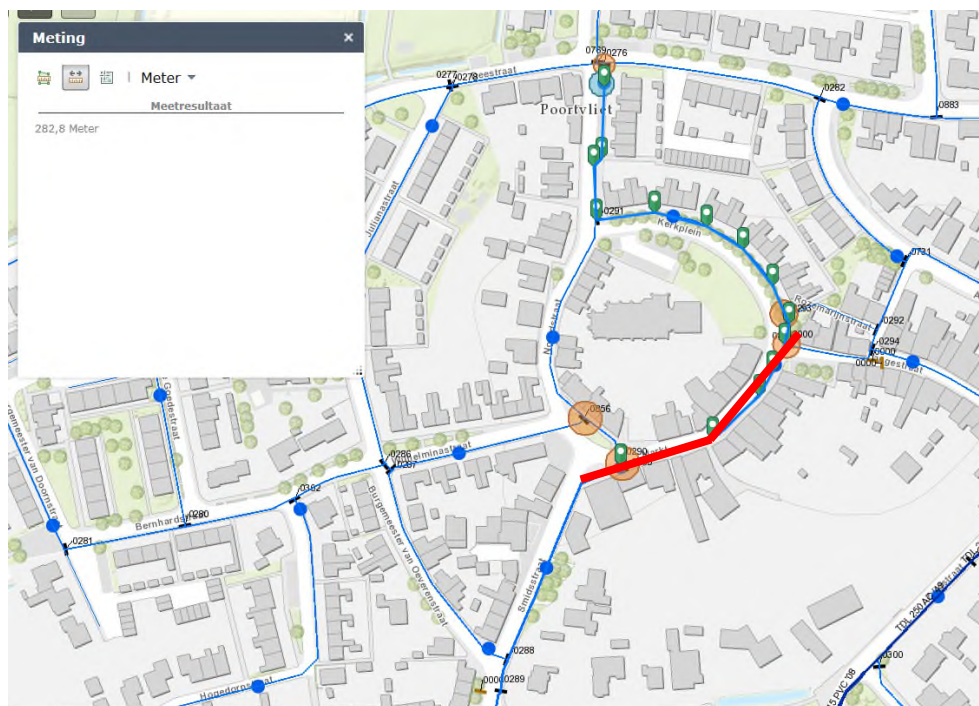
Figuur 7. Spuiplan voor Jan van Beaumondestraat 4, Tholen. Er is gespuid op HYDR 0451 TLN (blauwe rondje), de oranje afsluiters zijn dicht gezet (0383 TLN, 0384 TLN, 0390 TLN). Leidingmateriaal: 110 PVC.



Figuur 8. Spuiplan voor Vroonland 25, Sint-Annaland. Er is gespuid op HYDR 0596 ANL (blauwe rondje), de oranje afsluiters zijn dicht gezet (0953 ANL, 0955 ANL, 0746 ANL, 0865 ANL, 0869 ANL). Leidingmateriaal: 110 PVC.



Figuur 9. Spuiplan voor Noordstraat 1, Sint-Annaland. Er is gespuid op HYDR 0085 ANL (blauwe rondje), de oranje afsluiters zijn dicht gezet (1003 ANL, 0067 ANL, 0065 ANL, 0075 ANL). Leidingmateriaal: 110 PVC (eerste stuk), 80 gietijzer (rode lijn), 100 asbestcement (laatste stuk).



Figuur 10. Spuiplan voor Noordstraat 42, Poortvliet. Er is gespuid op HYDR 0262 PV (blauwe rondje), de oranje afsluiters zijn dicht gezet (0276 PV, 0293 PV, 0809 PV, 0290 PV, 0856 PV). Leidingmateriaal: 110 PVC (eerste deel), 125 gietijzer (rode lijn), 160 PVC (niet meegeteld in de 282,8 meter in figuur).

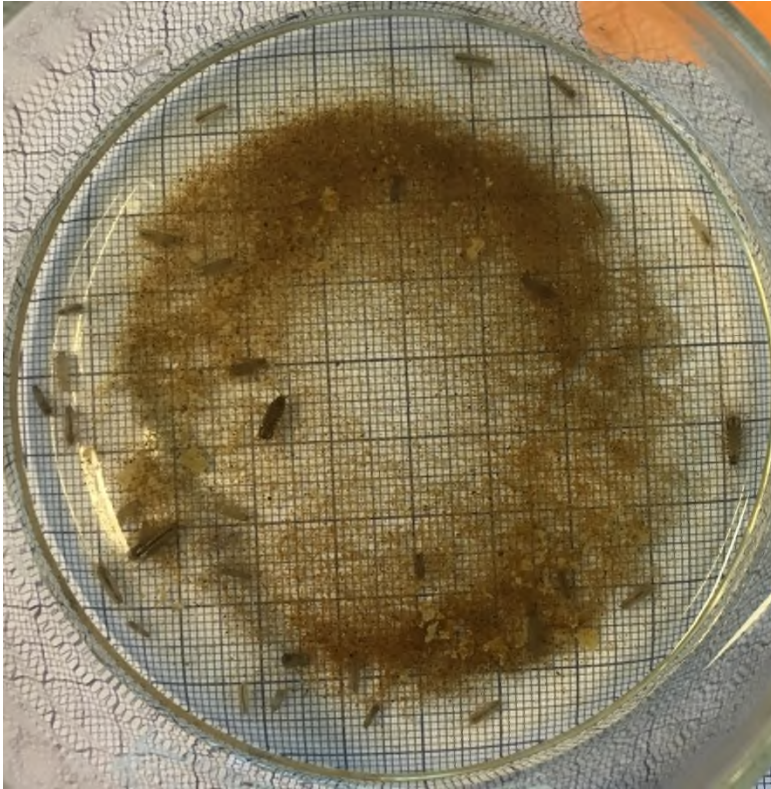
Bijlage II *Asellus* foto's van spuiactie van 5 juli 2018



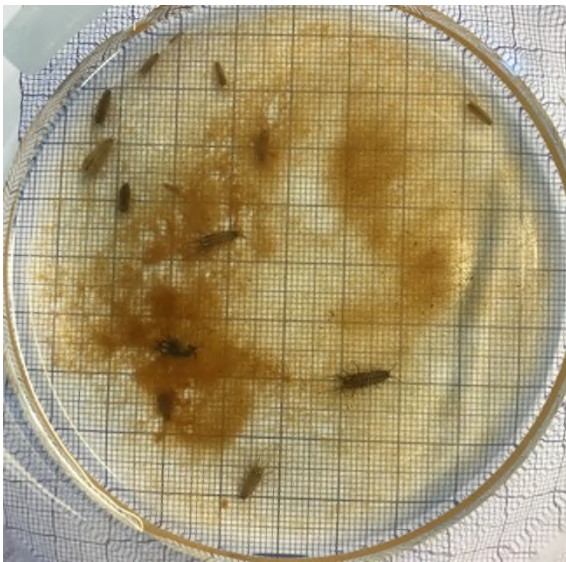
Figuur 11. *Asellus* in 500 µm sediment van Poortvliet. De *Asellussen* zijn met witte pijltjes aangegeven.



Figuur 12. *Asellus* in 500 µm sediment van Sint-Annaland, Noordstraat. De *Asellussen* zijn met witte pijltjes aangegeven.



Figuur 13. *Asellus* geïsoleerd uit 500 μm sediment in glazen petrischaal met 100 μm en 30 μm sediment van Sint-Annaland, Vroonland.



Figuur 14. *Asellus* geïsoleerd uit 500 μm sediment in glazen petrischaal met 100 μm en 30 μm sediment uit Tholen.