

A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size, with some being significantly larger than others, and they are interconnected in a complex, non-linear fashion.

Bedrijfstakonderzoek
BTO 2022.010 | Februari 2022

Overleving en groei van waterpissebedden op biofilm

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Overleving en groei van waterpissebedden op biofilm

BTO 2022.010 | Februari 2022

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

Opdrachtnummer

402045-215

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO – Bedrijfsonderzoek (Evides, Oasen en PWN)

Auteur

dr. ir. Nikki van Bel

Kwaliteitsborger

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

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Aeromonas, biofilm, *Asellus*, biologische stabiliteit, BTO

Jaar van publicatie
2022

Meer informatie
Nikki van Bel, PhD
T +31 30 606 9516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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

KWR

Februari 2022 ©

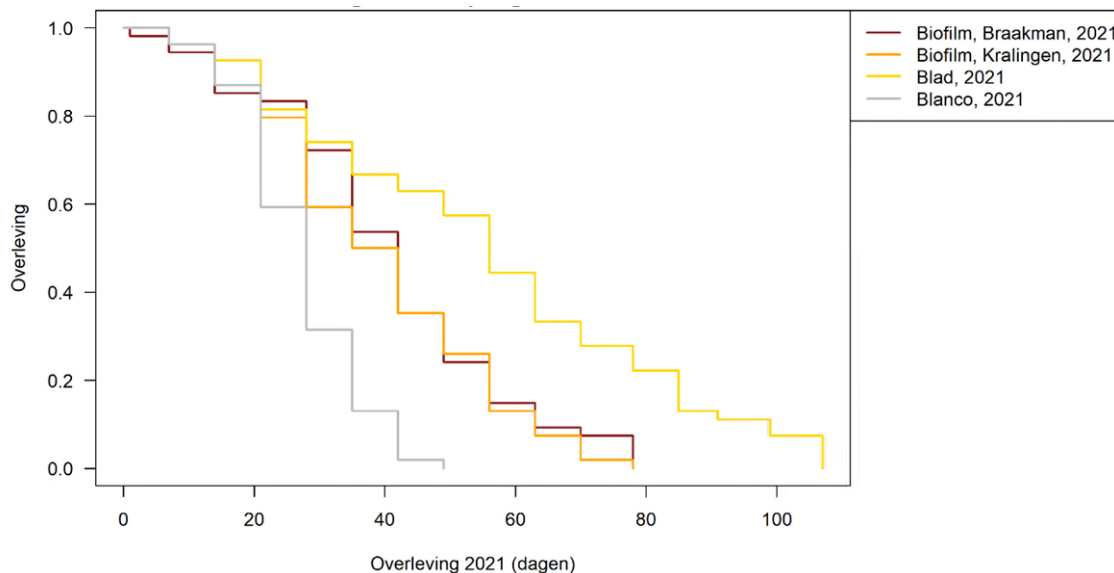
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Waterpissebedden groeien in distributienet op sediment en mogelijk op biofilm

Auteur dr. ir. Nikki van Bel.

Waterpissebedden (*Asellus aquaticus*) gebruiken sediment en biofilm als voedingsbron voor overleving, het is echter nog niet duidelijk welke van de twee het belangrijkste is in het distributienet. Dit blijkt uit laboratoriumonderzoek waarin de overleving van *Asellus* op verschillende voedingsbronnen is getest, waaronder gekweekte biofilm en biofilm op een uitgenomen leiding. Overleving is gelijk op biofilm die gekweekt was in drinkwater van ps. Braakman of ps. Kralingen (Evides). Bij gebruik van een natuurlijke biofilm was de overleving slechter en vergelijkbaar met wanneer geen voedingsbron werd toegevoegd. Vorming en instandhouding van zowel sediment als biofilm in het distributienet wordt beïnvloed door de biologische stabiliteit van het water. Distributie van drinkwater met een lage concentratie nutriënten kan (op de lange termijn) de hoeveelheid sediment en biofilm, de voedingsbronnen van waterpissebedden, verminderen. De hoeveelheid waterpissebedden in het distributienet lijkt gerelateerd te zijn aan aantallen *Aeromonas*-bacteriën, een bedrijfstechnische parameter in het drinkwaterbesluit, die in sommige distributiegebieden regelmatig de norm overschrijdt. Kennis over de belangrijkste voedingsbronnen van waterpissebedden in het distributienet kan helpen om preventieve maatregelen te nemen en zo het aantal waterpissebedden, en mogelijk ook het *Aeromonas*-aantal, te verlagen.



Fractie overleving van waterpissebedden (*Asellus aquaticus*) gedurende 16 weken met gekweekte biofilm of bladmateriaal als voedselbron.

Belang: bepalen voedingsbron waterpissebedden in distributienet om *Aeromonas* te bestrijden

Aeromonas bacteriën zijn als bedrijfstechnische parameter in het Drinkwaterbesluit opgenomen en dienen als indicator voor de biologische stabiliteit van drinkwater. Groei van *Aeromonas* wordt onder andere beïnvloed door de aanwezigheid van dierlijke organismen, waaronder waterpissebedden. De

aantallen waterpissebedden verschillen sterk tussen distributiegebieden. Zo komen in het Evides-distributiegebied van pompstation Kralingen veel waterpissebedden voor, maar in het gebied van pompstation Braakman nauwelijks tot geen. Dit komt overeen met de *Aeromonas*-aantallen (hoog in distributiegebied van Kralingen, laag in Braakman).

Dit verschil in aantallen waterpissebedden suggereert dat de voedselkwaliteit of andere (nog onbekende) factoren zodanig verschillen tussen de distributiegebieden dat dit de overleving van waterpissebedden direct of indirect beïnvloedt. Waterpissebedden hebben in het drinkwaterdistributienet drie potentiële voedselbronnen: drinkwater, sediment en biofilm. Uit groei- en overlevingsexperimenten met waterpissebedden blijkt dat ze niet goed kunnen overleven op drinkwater, maar wel op sediment van bepaalde locaties. Waterpissebedden zijn 'biofilmgrazers' en kunnen mogelijk de biofilm op leidingen van het distributienet als voedingsbron gebruiken. Het is echter nog niet bekend of en in welke mate dat in het distributienet ook daadwerkelijk gebeurt.

Doel van dit onderzoek is om beter inzicht te krijgen in de belangrijkste voedselbron(nen) voor waterpissebedden in het drinkwaterdistributienet. Hiermee kunnen potentieel preventieve maatregelen ontwikkeld worden om te proberen de hoeveelheid voedsel en zo het aantal waterpissebedden in het distributienet terug te dringen. De hypothese is dat door een lager aantal waterpissebedden de verspreiding van *Aeromonas* in drinkwater ook daalt en zo bedrijfstechnische normoverschrijdingen kunnen worden voorkomen.

Aanpak: groei en overleving waterpissebedden op biofilm als voedselbron

Overleving van waterpissebedden op verschillende voedingsbronnen is in twee experimenten getest. Waterpissebedden zijn in kleine bakjes geplaatst met 1) een biofilm gekweekt op PE-plaatjes in drinkwater van ps. Braakman of ps. Kralingen, 2) een biofilm gekweekt op PE in drinkwater van ps. Kralingen of een natuurlijke biofilm op een uitgenomen PVC-U leiding. Gedurende 6 - 16 weken is de groei en overleving van waterpissebedden gemeten.

De overleving werd vergeleken met de chemische en microbiologische samenstelling van de biofilms om mogelijke verbanden tussen samenstelling en overleving te leggen.

Resultaten: waterpissebedden overleven op gekweekte biofilm

Overleving van waterpissebedden op een biofilm gekweekt in drinkwater van ps. Kralingen of ps. Braakman is vergelijkbaar met elkaar, en de overleving is langer dan wanneer er geen voedselbron aanwezig is. Op de natuurlijke biofilm is de overleving laag en gelijk aan overleving zonder een voedingsbron.

De concentratie organisch koolstof (TOC, koolhydraten, eiwitten) verschilt niet significant tussen de geteste biofilms, net als de metalen. Ook is de metalenconcentratie laag en lijkt het onwaarschijnlijk dat deze de overleving van waterpissebedden sterk kunnen beïnvloeden.

De biomassa van de natuurlijke biofilm is significant lager dan die van de gekweekte biofilm. De slechtere overleving van waterpissebedden op de natuurlijke biofilm lijkt daarom vooral veroorzaakt te worden door de lagere hoeveelheid biomassa, en dus hoeveelheid voedsel.

Toepassing: sediment en biofilm voedingsbron voor waterpissebedden in distributienet

Vergelijking van overleving van waterpissebedden op alle voedingsniches in het distributienet (water, biofilm, sediment) laat zien dat waterpissebedden kunnen overleven op sediment en biofilm (dit onderzoek). Welke van de twee echter de belangrijkste voedingsbron is in het distributienet, kan op basis van dit onderzoek niet worden geconcludeerd.

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Overleving en groei van waterpissebedden op biofilm* (BTO-2022.010).

Dit onderzoek is een direct vervolg op 'Groei en overleving van waterpissebedden op organische stof en water uit het distributienet van Kralingen en Braakman' (BTO 2020.040) en op 'Literatuurstudie groei en overleving van waterpissebedden in het milieu, op water en sediment uit het distributiegebied' (BTO 2018.105).

Inhoud

Rapport	2
<i>Managementsamenvatting</i>	3
Inhoud	6
Voorwoord	8
1 Aanleiding	9
1.1 Inleiding oude bedrijfsonderzoek	9
1.2 Doel	10
2 Materiaal en methoden	11
2.1 Groei- en overlevingsexperiment	11
2.1.1 <i>Asellus</i>	11
2.1.2 Water	11
2.1.3 Bladmateriaal	11
2.1.4 Gekweekte biofilm op PE-plaatjes	12
2.1.5 Natuurlijke biofilm	13
2.1.6 Experimentele opzet groei- en overlevingsexperiment	15
2.2 Microbiologische en chemische analyses water en biofilm	17
2.2.1 Monsternamen biofilm	18
2.2.2 ATP	18
2.2.3 Flow cytometrie (FCM)	18
2.2.4 TOC	18
2.2.5 Eiwitten	18
2.2.6 Koolhydraten	18
2.2.7 ICP-MS	19
2.3 Statistische analyses groei- en overleving <i>Asellus</i>	19
2.3.1 Overleving	19
2.3.2 Groei	21
3 Resultaten	22
3.1 Verschil in ATP vorming op drie PE soorten	22
3.2 Groei- en overleving van <i>Asellus</i> op biofilm	22
3.2.1 Overleving	22
3.2.2 Groei	25
3.3 Samenstelling biofilm	26
4 Discussie	31
4.1 Overleving <i>Asellus</i> op verschillende voedselbronnen	31
4.2 Overleving <i>Asellus</i> in distributienet	36

4.3	Rol van biomassa en andere stoffen in overleving van <i>Asellus</i>	36
5	Conclusies en aanbevelingen	38
6	Referenties	39
I	Bijlage. Cox Proportional Hazards Modellen	40
II	Groecurven individuele <i>Asellussen</i>	53

Voorwoord

In dit rapport worden de resultaten beschreven van groei- en overlevingsexperimenten van waterpissebedden op biofilm. Dit bedrijfsonderzoek is een directe opvolger van twee voorgaande onderzoeken waarin de groei- en overleving van waterpissebedden op water, sediment en concentraat is onderzocht (1). In dit rapport worden de resultaten van groei en overleving op biofilm besproken en kort vergeleken met de resultaten van de twee voorgaande onderzoeken.

1 Aanleiding

1.1 Inleiding oude bedrijfsonderzoek

Aeromonas bacteriën zijn in het Drinkwaterbesluit opgenomen als bedrijfstechnische indicator voor de biologische stabiliteit van drinkwater. Bij aantallen hoger dan 1000 kolonievormende eenheden (kve) per 100 mL moet het betreffende drinkwaterbedrijf actie ondernemen om de biologische stabiliteit van het water te verbeteren en zo deze aantallen te verlagen. In meerdere distributiegebieden met voornamelijk oppervlaktewater als bron, maar ook in distributiegebieden met grondwater als bron, wordt in de warme periode deze norm overschreden.

Groei van *Aeromonas* wordt door verschillende factoren beïnvloed, waaronder een hoge watertemperatuur (2), aanwezigheid van dierlijke organismen, waaronder waterpissebedden (o.a. *Asellus aquaticus*) (3), soort en gehalte voedingsstoffen (4, 5) en de verblijftijd (6). Laboratoriumexperimenten laten zien dat *Aeromonas* kan groeien in aanwezigheid van verschillende dierlijke organismen (3) en waterpissebedden lijken een belangrijke rol te spelen bij de toename van het *Aeromonas*-aantal in drinkwater (eigen onderzoek van Evides). Wat precies de rol is van waterpissebedden, en mogelijk andere ongewervelde dieren, is nog niet bekend. Mogelijk groeit *Aeromonas* op of in (het darmstelsel) van de waterpissebedden waarna deze bacteriën vrijkomen in het water. Een andere mogelijkheid is dat ze groeien op stoffen die vrijkomen uit waterpissebedden (7). Waterpissebedden vormen het overgrote deel van de biomassa dierlijke organismen in het distributienet (8), wat de mogelijke invloed van waterpissebedden op *Aeromonas* vergroot.

De aantallen waterpissebedden verschillen sterk tussen distributiegebieden. Deze distributiegebieden kunnen verschillende of juist dezelfde ruw waterbronnen hebben. Zo komen in het Evides-distributiegebied van ps. Kralingen veel waterpissebedden voor, maar in ps. Braakman nauwelijks tot geen. Beide gebruiken het ruwe water uit de Biesbosch, maar de zuivering verschilt. Ook de *Aeromonas*-aantallen zijn hoger in het distributiegebied van Kralingen dan in Braakman. Het verschil in aantallen waterpissebedden tussen Braakman en Kralingen suggereert dat de voedselkwaliteit zodanig verschilt tussen de distributiegebieden dat dit de overleving van waterpissebedden direct of indirect beïnvloedt. Een andere, of aanvullende, optie is dat andere (nog onbekende) factoren de kolonisatie van het distributienet met waterpissebedden beïnvloeden. Bijvoorbeeld de configuratie van het distributienet (aantallen bochten, moffen, etc) of andere (lokale) factoren.

Waterpissebedden hebben in het drinkwaterdistributienet drie potentiële voedselbronnen: drinkwater, sediment en biofilm. Uit groei- en overlevingsexperimenten met waterpissebedden blijkt dat ze niet goed kunnen overleven op drinkwater, maar wel op sediment (1). De overleving verschilt echter per type sediment. Waterpissebedden overleven even lang op drinkwater als drinkwater waaraan sediment uit het distributiegebied van ps. Kralingen is toegevoegd, terwijl sediment uit het distributiegebied van ps. Braakman een goede voedselbron blijkt te zijn waar waterpissebedden significant langer op overleven. Van waterpissebedden is bekend dat het 'biofilmgrazers' (9-12) zijn en mogelijk ook de biofilm op leidingen van het distributienet als voedingsbron kunnen gebruiken. Het is echter nog niet bekend of dat in het distributienet ook gebeurt.

Meer kennis over de voedselbron van waterpissebedden in het distributienet, en eventuele mogelijkheden om dit te manipuleren, kan leiden tot preventieve maatregelen om de verspreiding van waterpissebedden te beperken en zo mogelijk ook de verspreiding van *Aeromonas* in het drinkwater, en de normoverschrijdingen, te verminderen. Als er echter ook andere factoren zijn die de verspreiding van *Aeromonas* in (grote) mate beïnvloeden, kan de invloed van het manipuleren van de voedselbron kleiner zijn.

1.2 Doel

Doel van dit onderzoek is om beter inzicht te krijgen in de belangrijkste voedselbron(nen) voor waterpissebedden in het drinkwaterdistributienet. Hiermee kunnen potentieel preventieve maatregelen ontwikkeld worden om het aantal waterpissebedden in het distributienet terug te dringen. De hypothese is dat door een lager aantal waterpissebedden de verspreiding van *Aeromonas* in drinkwater ook daalt en zo normoverschrijdingen kunnen worden voorkomen.

2 Materiaal en methoden

Er zijn drie overlevingsexperimenten met *Asellus* uitgevoerd om te bepalen of waterpissebedden kunnen groeien en/of overleven op een: 1) biofilm gekweekt in drinkwater van ps. Braakman of ps. Kralingen (Evides), 2) biofilm gekweekt in drinkwater van ps. Kralingen of een natuurlijke biofilm op een PVC-U leiding uitgenomen uit het distributienet van ps. Kralingen, 3) stukje PVC of PE-materiaal zonder biofilm. Door deze resultaten te vergelijken met een microbiologische en chemische karakterisering van de biofilm, kan inzicht worden verkregen in of en hoe de samenstelling van de biofilm relateert aan mogelijke verschillen in groei en overleving.

2.1 Groei- en overlevingsexperiment

2.1.1 *Asellus*

In een eerder onderzoek is een kweekstelsel voor waterpissebedden opgezet (1, 13). Deze kweek is na het eerdere bedrijfsonderzoek in stand gehouden en opgeschaald om voldoende waterpissebedden beschikbaar te hebben voor de hier beschreven experimenten.

Waterpissebedden zijn uit de kweekbakken geoogst en overgebracht naar een klein bakje met schoon drinkwater om aanhangend water en sediment kwijt te raken. Voor de overlevingsexperimenten zijn de *Asellus* dezelfde dag nog overgezet naar de 6-wellsplaat of mini-petrischaal waarin het experiment wordt uitgevoerd. Voor het toxiciteitsexperiment zijn de waterpissebedden eerst twee dagen in het schone drinkwater bewaard, waarna ze alsnog naar een mini-petrischaal zijn overgezet.

Voor de start van de overlevingsexperimenten zijn kleine *Asellus* geselecteerd, ongeveer 1,5 – 3,5 mm. Door met kleine *Asellus* te starten is er nog voldoende ruimte om door te groeien naar een maximale lengte van ongeveer 10 mm en bij kleinere, en dus jongere, *Asellus* is een mogelijk toxisch effect van toegevoegde stoffen of materiaal beter te zien (14-17).

In het eerste groei- en overlevingsexperiment zijn per conditie 54 *Asellussen* gebruikt. Dit is gebaseerd op een statistische onderbouwing waarmee eventuele significante verschillen voor groei en overleving met voldoende waarschijnlijkheid (95%) kunnen worden aangetoond. Deze statistische onderbouwing staat beschreven in een eerder rapport (1). In het tweede overlevingsexperiment en het toxiciteitsexperiment is een kleiner aantal waterpissebedden gebruikt, respectievelijk 25 en 30 per conditie. Er is voor dit lagere aantal gekozen omdat het aanvullende experimenten zijn waarop in eerste instantie niet was gerekend en er daardoor op het moment van starten onvoldoende materiaal (PE-stukjes met of zonder biofilm) beschikbaar was.

2.1.2 Water

De groei- en overlevingsexperimenten zijn uitgevoerd met drinkwater van KWR (Vitens, ps. Tull en 't Waal). Het water in de overlevingsexperimenten is wekelijks verversd met drinkwater dat dezelfde dag is bemonsterd.

2.1.3 Bladmateriaal

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

afgespoeld met drinkwater om de overtollige slijm laag te verwijderen voordat ze aan de kweekbakken of overlevingsexperimenten zijn toegevoegd.

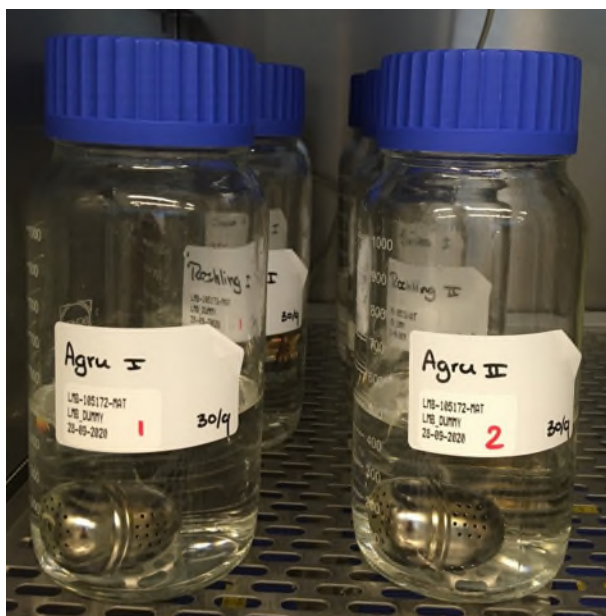
Het bladmateriaal in het groei- en overlevingsexperiment is wekelijks ververst.

2.1.4 Gekweekte biofilm op PE-plaatjes

In dit onderzoek is biofilm die op PE-plaatjes is gevormd de voedingsbron voor waterpissebedden. Omdat de biofilm productie potentie (BPP) van PE-materiaal sterk kan variëren tussen leveranciers en batches, is PE-plaatmateriaal van drie leveranciers getest: Agru (PE100), Röchling (PE-HD) en Simona (PE-HD) in een BPP-materialentest volgens LMB-006, conform NEN-EN 16421:2014 H4 methode 1. Normaal duurt deze test 16 weken, voor dit onderzoek is de biofilm echter gekweekt gedurende 8 in plaats van 16 weken. Op basis van deze testen is gekozen voor PE-materiaal (Agru, zie paragraaf 3.1) waarop de meeste biofilm werd gevormd.

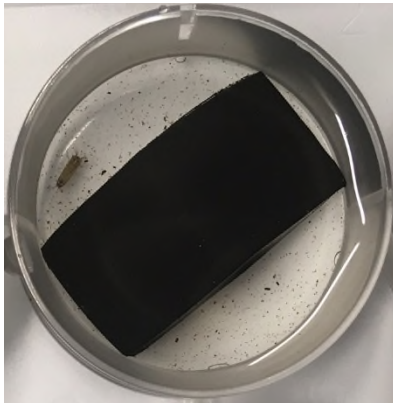
Voor de BPP-test en het overlevingsexperiment is het PE-materiaal gezandstraald om het effectieve oppervlakte te vergroten en zo meer biofilm te kunnen kweken. Hierdoor wordt het materiaal ook stroever zodat de waterpissebedden beter houvast hebben op het PE-materiaal. Na zandstralen zijn de PE-plaatjes op maat gesneden (1,6 x 3,5 x 0,1 cm) en schoongespoeld met drinkwater voor de start van de biofilmkweek. Wekelijks is van drie of vijf stukjes de oppervlakte en ATP-concentratie van de biofilm bepaald. De oppervlakte is bepaald op basis van de afmetingen van de stukjes, hierbij is niet het effect van zandstralen meegenomen. Het daadwerkelijke oppervlakte zal dus hoger zijn dan wat op basis van de maten van het plaatje wordt berekend.

Het soortelijk gewicht van PE-materiaal is lager dan dat van water waardoor PE in water drijft. Dit is ongewenst in zowel de BPP-test als in het overlevingsexperiment. In de BPP-test is dit opgelost door de PE-plaatjes eerst te buigen en vervolgens per zes stuks in een thee-ei van RVS te doen (Figuur 1). Doordat alle plaatjes net wat anders zijn gebogen, komen de plaatjes niet helemaal tegen elkaar aan en blijkt uit testen dat op alle plaatjes evenveel biofilm wordt gevormd. De thee-eieren met PE-plaatjes zijn zwaar genoeg om niet te gaan drijven.



Figuur 1. BPP-test met PE-plaatjes in een thee-ei.

In het eerste overlevingsexperiment is het drijven van PE opgelost door het plaatje in een boogvorm vast te klemmen in de 6-wellsplaat (Figuur 2). Elke *Asellus* krijgt wekelijks een nieuw PE-plaatje met biofilm.



Figuur 2. Eén well van een 6-wells plaat met *Asellus* en een gebogen PE-plaatje.

Van het Agru PE-materiaal zijn ongeveer 2500 PE-plaatjes gesneden en hierop is gedurende 8 weken in drinkwater van Braakman (monsterpunt: PBRA80UITG) en Kralingen (monsterpunt: PKRL80HD01) (af pompstation) een biofilm gekweekt. Het drinkwater is wekelijks door Aqualab Zuid bemonsterd in melkbussen en binnen 24 tot 48 uur gebruikt. De verwachting is dat eventueel nog aanwezige restanten chloordioxide in het uitgaande water weggereageerd zijn tijdens de 24-48 uur opslag voor toediening aan de *Asellussen*.

De melkbussen zijn door KWR aangeleverd aan Aqualab Zuid en na elk gebruik als volgt schoongemaakt:

- Uitgebreid vaatwasprogramma met milli-Q water
- Autoclaveren gedurende 15 minuten bij 121°C
- Na gebruik drogen bij 50°C (overnacht)

2.1.5 Natuurlijke biofilm

Op 18 maart 2021 heeft Evides in het distributiegebied van Kralingen een 160 mm PVC-leiding uitgenomen (Figuur 3). Na uitname is deze leiding gevuld met drinkwater van Kralingen en opgeslagen bij 4°C. Voor gebruik in het overlevingsexperiment is de leiding in ringen van ongeveer 15 mm gesneden met een pijpsnijder en stanleymes. Vervolgens is de leiding gehalveerd en is de onderste helft in 4 min of meer gelijke stukjes geknipt (Figuur 4). Door de dikte van de leidingwand (3,3 mm) gecombineerd met de eis om de biofilm zo min mogelijk te verstoren, was het niet mogelijk om alle stukjes precies even groot te maken (Figuur 4). De bovenste helft van de leiding is niet gebruikt, omdat uit de praktijk blijkt dat de onderkant van een leiding meer biofilm bevat dan de bovenkant. De stukjes zijn tot gebruik bewaard bij 4°C in drinkwater van Kralingen dat wekelijks is ververst.

Bij de start van het experiment is er alleen (natuurlijke) biofilm aanwezig aan de binnenkant van de leiding. Tijdens het bewaren van de leidingstukjes in drinkwater bij 4°C kan echter ook in beperkte mate biofilm aan de buitenkant van de leiding worden gevormd. Wekelijks is van drie of vijf stukjes de oppervlakte en ATP-concentratie van de biofilm bepaald.



Figuur 3. Uitgenomen leiding van Evides (links) en close-up van de biofilm op de onderkant van de leiding (rechts).

Van de stukjes waarop aanvullende chemische of microbiologische analyses zijn uitgevoerd, is ook het oppervlakte bepaald. In het overlevingsexperiment is niet bijgehouden welke *Asellus* een 'groot' stukje heeft gekregen en welke een 'klein' stukje. Aangezien de verdeling van de stukjes willekeurig is, is er vanuit gegaan dat dit geen groot effect op de resultaten zal hebben (maar mogelijk wel op de variatie tussen replica's). Daarnaast waren de stukjes te groot voor een well van een 6-wells plaat en is besloten om de experimenten in kleine petrischaaltjes uit te voeren (zie hoofdstuk 2.1.6).



Figuur 4. Leidingstukjes van de uitgenomen leiding van Evides. Te zien is dat de stukjes erg dik zijn en dat de grootte tussen de plaatjes verschilt.

2.1.6 Experimentele opzet groei- en overlevingsexperiment

In Tabel 1 zijn van de drie uitgevoerde experimenten de kenmerken samengevat. Hieronder worden deze uitgebreider beschreven.

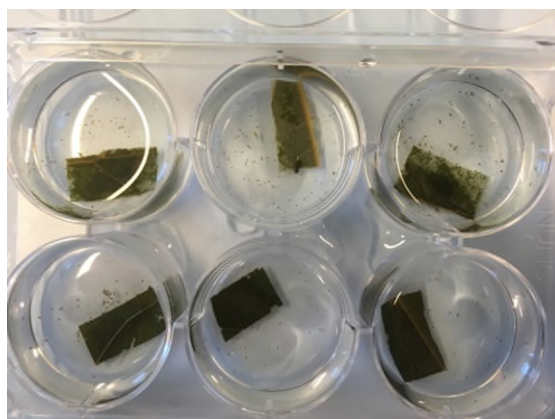
Tabel 1. Kenmerken uitgevoerde overlevingsexperimenten

Experiment	1	2	3
Doel experiment	Groei- en overleving	Overleving	Toxiciteit
Start	11 januari 2021	24 maart 2021	14 oktober 2021
Experimentele opzet	6-wells plaat	Mini-petrischaaltjes	Mini-petrischaaltjes
Duur	16 weken	6 weken	6 weken
Voedselbron	Gekweekte biofilm op PE	Biofilm op PVC (natuurlijk) en PE (gekweekt)	PE en PVC-U zonder biofilm
Startlengte <i>Asellus</i>	1,5 – 3,5 mm	3 – 4 mm	2 – 3 mm
Aantal <i>Asellussen</i> per conditie	54	25	30

Het eerste overlevingsexperiment is uitgevoerd in een 6-wells plaat (diameter per well: 3,5 cm, hoogte: 1,74 cm, volume: 16,8 ml) waarbij aan één well de volgende zaken zijn toegevoegd:

- 1 *Asellus*
- 10 ml drinkwater KWR (Vitens, ps. Tull en 't Waal)
- Voeding (één van de hieronder genoemde vier typen):
 - PE-plaatje (zonder biofilm)
 - PE-plaatje met gekweekte biofilm Kralingen
 - PE-plaatje met gekweekte biofilm Braakman
 - Voorbehandeld esdoornblad (1 x 2 cm)

Een voorbeeld van een 6-wells plaat met *Asellus*, water en bladmateriaal is gegeven in Figuur 5.



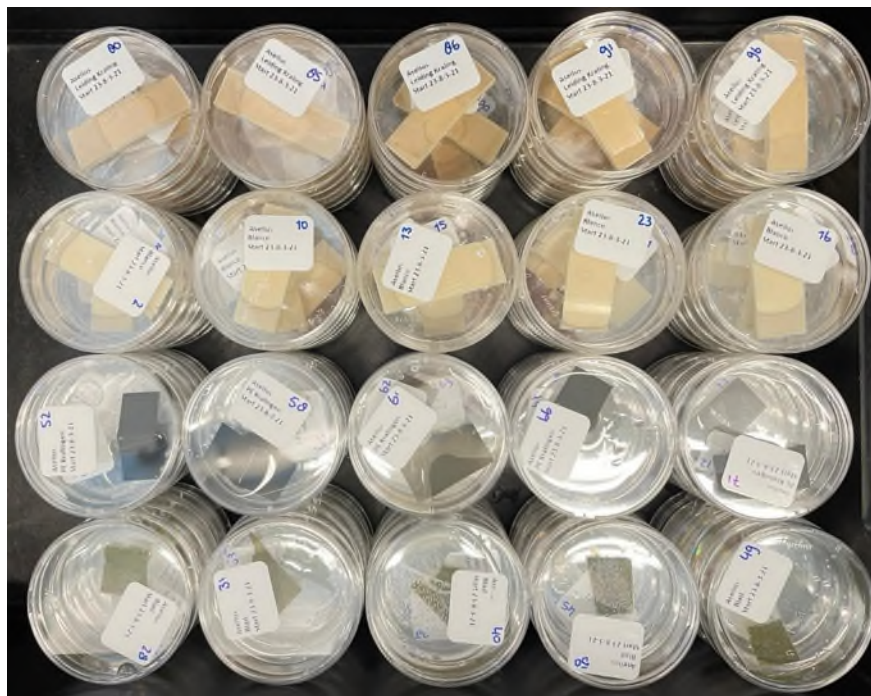
Figuur 5. Experimentele opzet eerste overlevingsexperiment: *Asellus* in een 6-wells plaat met water en bladmateriaal.

Het tweede overlevingsexperiment is uitgevoerd in kleine petrischaaltjes (diameter: 6,0 cm, hoogte: 1,5 cm, volume: 42,4 ml) waarbij de volgende zaken zijn toegevoegd:

- 1 *Asellus*
- 18 ml water
- Voeding (één van de hieronder genoemde vier typen):
 - PE-plaatje (zonder biofilm)
 - PE-plaatje met gekweekte biofilm Kralingen

- PVC-leidingstukje met natuurlijke biofilm uit Kralingen
- Voorbehandeld esdoornblad (1 x 2 cm)

Een voorbeeld van deze petrischaaltjes met *Asellus* is gegeven in Figuur 6.



Figuur 6. Experimentele opzet tweede overlevingsexperiment: *Asellus* in een petrischaaltje met water en bladmateriaal.

Het toxiciteitsexperiment is uitgevoerd in kleine petrischaaltjes (diameter: 6,0 cm, hoogte: 1,5 cm, volume: 42,4 ml) waarbij de volgende zaken zijn toegevoegd:

- 1 *Asellus*
- 18 ml water
- Voeding (één van de hieronder genoemde vier typen):
 - PVC-U leidingstukje (zonder biofilm)
 - PE-plaatje (zonder biofilm)

De conditie met water en een kaal PE-plaatje of PVC-leidingstukje en de conditie met water en esdoornblad dienen als respectievelijk negatieve en positieve controle in de overlevingsexperimenten. Esdoornblad is een goede voedingsbron voor *Asellus* en *Asellus* zou hier relatief lang op moeten kunnen leven (13). Indien *Asellus* snel afsterft op esdoornblad, is dit een indicatie van een probleem met de experimentele opzet. Daarnaast wordt, door de conditie met esdoornblad in alle overlevingsexperimenten (inclusief de voorgaande onderzoeken (1)) mee te nemen, ook voor eventuele verschillen tussen de experimenten getest. Deze verschillen kunnen bijvoorbeeld veroorzaakt worden door variatie in waterkwaliteit, experimentele opzet, gebruikt materiaal, levensvatbaarheid gebruikte waterpissebedden, variatie in het bladmateriaal en het voorweken van het blad.

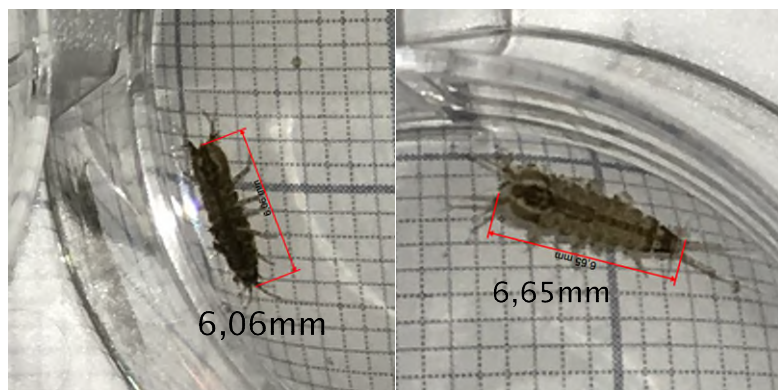
Voor de negatieve controle zijn PE-plaatjes (Röchling) van tevoren twee weken geweekt in drinkwater om eventueel aanwezige weekmakers en andere vluchtige stoffen te verwijderen. Om te voorkomen dat eventueel gevormde biofilm niet wordt toegevoegd aan de waterpissebedden zijn de PE-plaatjes na het weken als volgt behandeld om de biofilm te verwijderen:

- PE-plaatjes van Röchling PE zijn gedurende twee weken in milli-Q water bij 4°C geweekt
- Eventueel gevormde biofilm is verwijderd met SDS (sodium dodecyl sulfaat, 10 g/l)
- SDS is verwijderd door 4 uur te spoelen met leidingwater
- Plaatjes zijn gesteriliseerd bij 121°C in de autoclaaf.

De 6-wells platen met *Asellus* zijn gedurende 16 weken (112 dagen) geïncubeerd op kamertemperatuur in het donker. Elke week zijn de *Asellussen* met een holle pipet voorzichtig overgezet naar nieuwe 6-wells platen of petrischaaltjes met vers water en PE-plaatje, PVC-leidingstukje of bladmateriaal.

Tijdens het overzetten is gecontroleerd of de *Asellus* levend of dood was. Naast de wekelijkse meting is in de eerste week ook op dag 1, 2 en 4 bepaald of de *Asellus* nog in leven was.

In het eerste overlevingsexperiment is in week 0, 2 en 4 de lengte van de *Asellus* bepaald. Hiervoor is eerst het PE-plaatje uit de 6-wells plaat gehaald waarna op gestandaardiseerde manier een foto is gemaakt van de plaat. Na het maken van de foto is de *Asellus* overgezet naar de nieuwe 6-wells plaat met een nieuw PE-plaatje of bladmateriaal. Met behulp van het programma Nuance Power PDF Advanced is de lengte bepaald van de *Asellus*. In Figuur 7 zijn twee voorbeelden van lengtemetingen gegeven, hierbij is alleen het lichaam gemeten zonder bijvoorbeeld de pootjes of antennes. Als de *Asellus* niet plat op de bodem staat maar schuin in het water ligt of zich in de rand van de 6-wellsplaat bevindt, is de gemeten lengte lager dan de voorgaande meting waardoor het lijkt alsof de *Asellus* krimpt. Doordat een *Asellus* een exoskelet heeft, is krimpen echter niet mogelijk en wordt de gesuggereerde krimp van *Asellus* dus veroorzaakt door technische oorzaken tijdens de lengtebepaling. Lengtemetingen zijn niet uitgevoerd voor het tweede overlevingsexperiment of het toxiciteitsexperiment.



Figuur 7. Lengtemeting van *Asellus* met het programma Nuance Power PDF Advanced.

2.2 Microbiologische en chemische analyses water en biofilm

De gekweekte en natuurlijke biofilms zijn met verschillende analyses gekarakteriseerd (Tabel 2). Wekelijks is van de biofilm het ATP-gehalte bepaald als maat voor de hoeveelheid biomassa in de biofilm. Daarnaast is in het eerste groei- en overlevingsexperiment drie keer, en in het tweede overlevingsexperiment twee keer, de biofilm uitgebreider gekarakteriseerd met flow cytometrie (aantal levende en dode cellen), TOC (organisch koolstof), eiwit- en koolhydratengehalte en metalencompositie (ICP-MS).

Tabel 2. Overzicht van analyses uitgevoerd op de biofilm tijdens het eerste en tweede overlevingsexperiment.

Week	Groei- en overlevingsexperiment 1						Overlevingsexperiment 2					
	ATP	FCM	TOC	Eiwit	Koolhydraten	ICP-MS	ATP	FCM	TOC	Eiwit	Koolhydraten	ICP-MS
0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1-7	X						X					
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9-15	X											
16	X	X	X	X	X	X						

2.2.1 Monstername biofilm

De biofilm is via een gestandaardiseerd protocol losgetrild van de PE-plaatjes en PVC-leidingstukjes door vier LES (Lage Energie Sonificatie) behandelingen met ultrasoon geluid uit te voeren gedurende 2 minuten bij een frequentie van 40 kHz. Het water, met daarin de losgetrilde biofilm, is gebruikt om onderstaande analyses op uit te voeren. Na het lostrillen van de biofilm is van het kale plaatje de oppervlakte gemeten.

2.2.2 ATP

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

2.2.3 Flow cytometrie (FCM)

Watermonsters, met daarin de losgetrilde biofilm, zijn geïncubeerd met SYBR-Green en Propidium Iodide (PI). SYBR-green bindt aan het DNA van alle cellen, terwijl PI alleen aan DNA bindt wanneer het celmembraan permeabel is. Hiermee kan onderscheid gemaakt worden tussen het totaal aantal cellen (positief voor SYBR-Green), membraanintacte cellen (zeer waarschijnlijk levende cellen, positief voor SYBR-Green en negatief voor PI) en cellen met een niet-intact membraan (dode cellen, positief voor SYBR-Green en PI).

2.2.4 TOC

Het watermonster, met daarin losgetrilde biofilm, wordt aangezuurd om het anorganisch koolstof te verwijderen waarna de hoeveelheid aanwezige (organisch) koolstof wordt gemeten met behulp van NDIR (niet-dispersieve infrarood detector). Het TOC-gehalte is bepaald volgens LAM-068 en conform ISO 8245 en NEN-EN 1484.

2.2.5 Eiwitten

Eiwitbepalingen zijn uitgevoerd volgens de Coomassie methode, met albumine als referentie. Het eiwitgehalte is bepaald volgens LAM-077.

2.2.6 Koolhydraten

Koolhydraatbepalingen zijn uitgevoerd volgens de Dubois methode met behulp van spectrofotometrie. Glucose is hierbij als referentie gebruikt. De analyse is uitgevoerd volgens LAM-075.

2.2.7 ICP-MS

Met ICP-MS (inductief gekoppelde plasma massaspectrometer) is in water de concentratie van een grote set aan metalen bepaald. Dit is uitgevoerd volgens huisvoorschrift LAM-076. De ICP-MS resultaten van de biofilm zijn gecorrigeerd voor de concentratie metalen in het steriele drinkwater dat is gebruikt voor het lostrillen van de biofilm (hoofdstuk 2.2.1).

2.3 Statistische analyses groei- en overleving *Asellus*

De resultaten van de groei- en overlevingsexperimenten onder verschillende omstandigheden en in verschillende experimenten zijn statistisch getoetst zoals eerder (1) en hieronder beschreven.

2.3.1 Overleving

Voor het testen van overleving is vooral de duur vanaf de start van experiment totdat sterfte optreedt van belang, en daarnaast de kans dat op een bepaald tijdstip sterfte optreedt. Wanneer bij een survival analyse slechts één voorspellende factor onderzocht wordt die slechts een paar mogelijke waardes kan aannemen, kan een non-parametrische, univariabele Kaplan Meier analyse volstaan (18). Omdat in het hier beschreven onderzoek echter sprake is van meerdere factoren die de overleving kunnen beïnvloeden (zoals type water en type voedsel), is een uitgebreider model toegepast, het veel gebruikte parametrische, multivariabele Cox proportional hazards (CPH) model (19). Met de Kaplan Meier analyse en het CPH model wordt de gemiddelde tijd tot een gebeurtenis (overlijden *Asellus*) geschat op basis van het moment van elk van die in de steekproef optredende gebeurtenissen (overlijden). Op elk moment van één of meerdere overlijdens wordt de kans om tot dat moment te overleven geschat op basis van de dan nog overlevende individuen. Met het CPH model kan - net als met andere multivariabele regressiemodellen - het effect van meerdere voorspellers tegelijk onderzocht worden. Bijkomend voordeel van het Cox model boven een Kaplan Meier analyse is bovendien dat er naast de vraag "is er een effect" ook antwoord gegeven wordt op de vraag "hoe groot is het effect" van een bepaalde voorspeller. Het Cox model geeft de grootte van een effect weer met behulp van hazard ratio's (HR), waarbij een HR van 1 aangeeft dat er geen verschil is tussen de effecten van de twee vergeleken factoren. Een HR van 2 geeft bijvoorbeeld aan dat de kans om te overlijden bij behandeling A twee keer zo groot is als bij behandeling B. De hazard is de momentane kans om een event (sterfte) te krijgen, en de hazard ratio is te interpreteren als het relatieve sterfterisico.

In het CPH model wordt aangenomen dat de kans op overlijden evenredig is tijdens het experiment (proportional hazards). Dit betekent dat het relatieve verschil in hazard veroorzaakt door verschillende waardes van een voorspeller gelijk blijft in de tijd. Als bijvoorbeeld de sterftekans door een bepaald type water twee keer zo hoog is als dat van een ander water, dan dient deze verhouding op ieder tijdstip hetzelfde te zijn. Verder zijn er bij een CPH model geen specifieke aannames over de verdeling van de hazard functie of voorspellende variabelen; ze hoeven bijvoorbeeld niet normaal verdeeld te zijn.

De overlevingsresultaten van beide overlevingsexperimenten uit dit rapport zijn ook vergeleken met de groei- en overlevingsexperimenten uit een eerder rapport (1). Hiervoor zijn dezelfde testen gebruikt als hierboven worden beschreven. Bij het uitvoeren van een groot aantal vergelijkingen met een vaste p-waarde per vergelijking (de 'comparisonwise error') wordt de kans dat er in de totale set van gemaakte vergelijkingen tenminste een of meer significante verschillen optreden (de 'experimentwise error') steeds groter. Stel: voor de vergelijking van twee condities met elkaar wordt een 'comparisonwise error' gebruikt van bijvoorbeeld $p = 0,05$. Dit betekent dat in één op de twintig keer een dergelijk verschil onterecht statistisch significant wordt genoemd. In een set van vijf behandelingen kunnen in totaal tien vergelijkingen worden gemaakt. Dan is de kans dat de uitslag van deze tegelijkertijd uitgevoerde vergelijkingen alle tien op de correcte manier wordt geïnterpreteerd gelijk aan $0,95^{10} = 0,60$. De kans dat er echter tenminste één of meer verschillen *onterecht* significant worden verklaard is $1 - 0,95^{10} =$

0,40. Om hiervoor te corrigeren is een verlaging van de comparisonwise error nodig, naar rato van het totaal aantal vergelijkingen dat men wil maken tussen de uitgevoerde behandelingen.

$$p(\text{comparisonwise error}) = \frac{p(\text{experimentwise error})}{\text{aantal vergelijkingen}}$$

$$p(\text{comparisonwise error}) = \frac{p(\text{experimentwise error})}{\text{aantal condities} * \frac{\text{aantal condities} - 1}{2}}$$

In hoofdstuk 4.1 worden de overlevingscurven van 20 verschillende voedingscondities met elkaar vergeleken, wat resulteert in $20 \times (19 / 2) = 190$ vergelijkingen of statistische testen:

$$p(\text{comparisonwise error}) = \frac{0,05}{20 * \frac{20 - 1}{2}} = 0,00026$$

De nieuwe p-waarde waar elke vergelijking tegen getoetst moet worden is dus 0,00026.

Als voorbeeld zijn in Tabel 3 enkele CPH resultaten afkomstig uit Bijlage I.I weergegeven. Als de $\text{Pr}(>|z|)$ uit Tabel 3 wordt getoetst tegen de oude 'comparisonwise error' van 0,05 dan verschillen alle vier condities statistisch significant van de condities waar tegen getest is. Als wordt getest tegen de nieuwe 'comparisonwise error' van 0,00026 zijn alleen de condities '10. HF_KRL_2020' en '12. Filcom_zand_2020' statistisch significant verschillend, maar de andere twee condities ('11. HF_BRA_2020' en '13. Blanco_2021') niet. In hoofdstuk 4.1 wordt daarom deze 'comparisonwise error' gebruikt om de 'experimentwise error' van de totale set aan uitspraken op $p = 0,05$ te houden.

Tabel 3. Onderstaande tabel is afkomstig uit Bijlage I.I en dient alleen als voorbeeld voor het gebruik van 'comparisonwise error' en 'experimentwise error'.

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	$\text{Pr}(> z)$	Lower 0,95	Upper 0,95
10. HF_KRL_2020	0,802	2,229	4,081	4,49E-05	1,517	3,276
11. HF_BRA_2020	0,673	1,960	3,436	0,00059	1,335	2,877
12. Filcom_zand_2020	-1,377	0,252	-5,034	4,81E-07	0,148	0,431
13. Blanco_2021	0,501	1,650	2,573	0,01007	1,127	2,417

De resultaten van het CPH-model moeten als volgt worden gelezen:

- Regressie coëfficiënt: een positieve waarde betekent dat het risico op overlijden hoger is.
- Hazard Ratio: ook wel exponentiële regressie coëfficiënt genoemd. Het risico op overlijden is een factor 'hazard ratio' hoger dan de controlegroep.
- se(coef): Standaardfout van de regressie coëfficiënt
- z: Wald statistic value
- $\text{Pr}(>|z|)$: kans op een nog hogere waarde van z (te vergelijken met de betreffende comparisonwise error)
- lower/upper 0,95: 95% betrouwbaarheidsinterval

2.3.2 Groei

Voor de groei(snelheid) is een non-parametrische variantieanalysetest (Kruskal-Wallis met Dunn's Test) toegepast, aangezien niet is voldaan aan bepaalde aannames die van toepassing zijn bij ANOVA (bijvoorbeeld niet-homogene variantie tussen behandelingen, en geen normale verdeling).

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

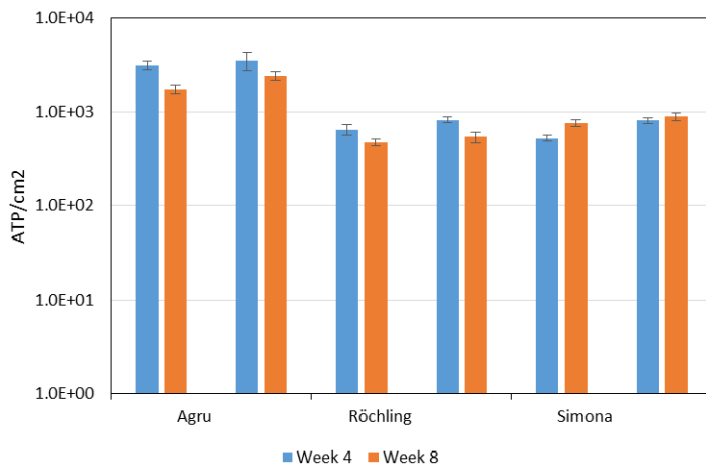
De Kruskal-Wallis test is gevolgd door de post-hoc Dunn's test om verschillen tussen combinaties van verschillende typen water of voedsel te kunnen traceren. In de Dunn's test wordt met de Bonferroni-methode automatisch bij een gekozen 'experimentwise error' de correcte 'comparisonwise error' per vergelijking gehanteerd.

3 Resultaten

3.1 Verschil in ATP vorming op drie PE soorten

De BPP-waarde van drie PE-materialen is bepaald om het PE-materiaal te kiezen waarop het meeste biofilm, op basis van het ATP-gehalte, wordt gevormd. Per meting is van zes plaatjes per PE-materiaal het ATP-gehalte bepaald, om de variatie in biofilmvorming te meten.

PE-materiaal van leverancier Agru vormt verreweg het meeste biofilm na 4 en 8 weken, gevolgd door Röchling en Simona (Figuur 8; T-test $p < 0,05$). De verschillen tussen de plaatjes zijn erg klein wat wijst op een stabiele, reproduceerbare biofilmkweek. Er kan daarom vanuit worden gegaan dat ook de PE-plaatjes met biofilm die tijdens het overlevingsexperiment aan de waterpissebedden worden toegevoegd nauwelijks zullen verschillen in hoeveelheid gevormde biofilm. Om hier zeker van te zijn wordt dit wel wekelijks gecontroleerd door het ATP-gehalte te meten.



Figuur 8. Test van biofilmkweek op drie PE-materialen. Gegeven is het gemiddelde ATP-gehalte van de biofilm, met SD, van zes individueel opgewerkte PE-plaatjes. Per leverancier zijn de resultaten gegeven van twee flessen waarin afzonderlijk van elkaar de biofilm is gekweekt.

3.2 Groei- en overleving van *Asellus* op biofilm

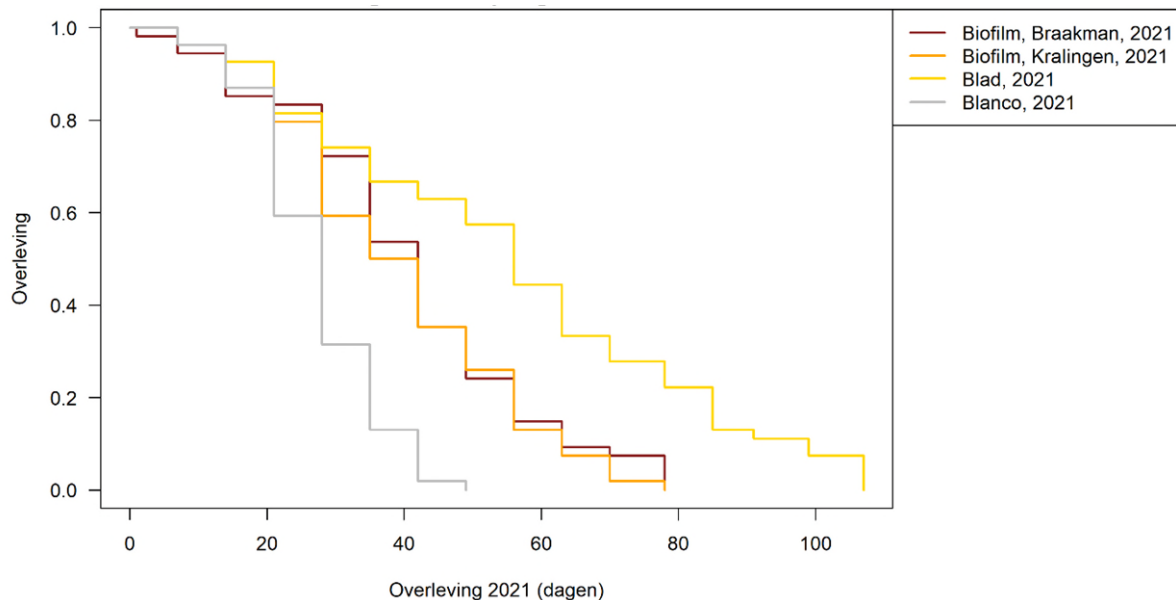
3.2.1 Overleving

Experiment 1: groei en overleving op biofilm gekweekt in drinkwater van Braakman en Kralingen

In Figuur 9 zijn de overlevingscurven van het eerste overlevingsexperiment weergegeven, de resultaten van het bijbehorende Cox Proportional Hazards model staan in Tabel 4. Hierin is de overleving op de drie verschillende voedingscondities (biofilm Kralingen, biofilm Braakman, blad) vergeleken met de blanco (kaal PE-plaatje). De lower en upper 0,95, ook wel het 95% betrouwbaarheidsinterval, geeft aan of de afsterving in die conditie sneller (95% BI voor Hazard Ratio > 1) is dan in de blanco of dat de waterpissebedden langer overleven dan in de blanco en de afsterving dus juist langzamer is (95% BI voor Hazard Ratio < 1).

Hieruit blijkt dat waterpissebedden beter overleven op de condities waarbij een voedingsbron wordt toegevoegd (biofilm of blad) vergeleken met de blanco conditie waarbij een kaal PE-plaatje, zonder biofilm, aan de Aselussen is toegevoegd. Deze verschillen zijn statistisch significant met een p-waarde van 0,05 ('experimentwise error') of

0,0167 ('comparisonwise error', Tabel 4). De waterpissebedden overleven het langst op bladmateriaal, gevolgd door beide biofilmcondities. Er is geen verschil in de overleving tussen de biofilm gekweekt in drinkwater van Kralingen of drinkwater van Braakman. De langere overleving van Asellussen op biofilm laat zien dat de biofilm voedingsstoffen bevat en dat deze ook toegankelijk zijn voor de dieren, de hoeveelheid of soort voedingsstoffen is echter minder goed dan het bladmateriaal waarop de overleving beter is.



Figuur 9. Kaplan Meier curve van het eerste groei- en overlevingsexperiment. Op de y-as de cumulatieve proportie levende Asellus gedurende 16 weken per voedselbron (bladmateriaal, gekweekte biofilm Braakman, gekweekte biofilm Kralingen en kaal PE-plaatje [blanco]).

Tabel 4. Uitkomsten van het Cox Proportional Hazards model van het eerste groei- en overlevingsexperiment van 2021, vergeleken met de blanco (water met kaal PE-plaatje), voor effecten van de geteste voedselbronnen op de sterfte van Asellus. 95% BI: 95% betrouwbaarheidsinterval, <1: langere overleving dan blanco, >1: kortere overleving dan blanco, overlap met 1: geen significant verschil ten opzichte van de blanco. p-waarde experimentwise error: 0,05 en bijbehorende comparisonwise <0,0167.

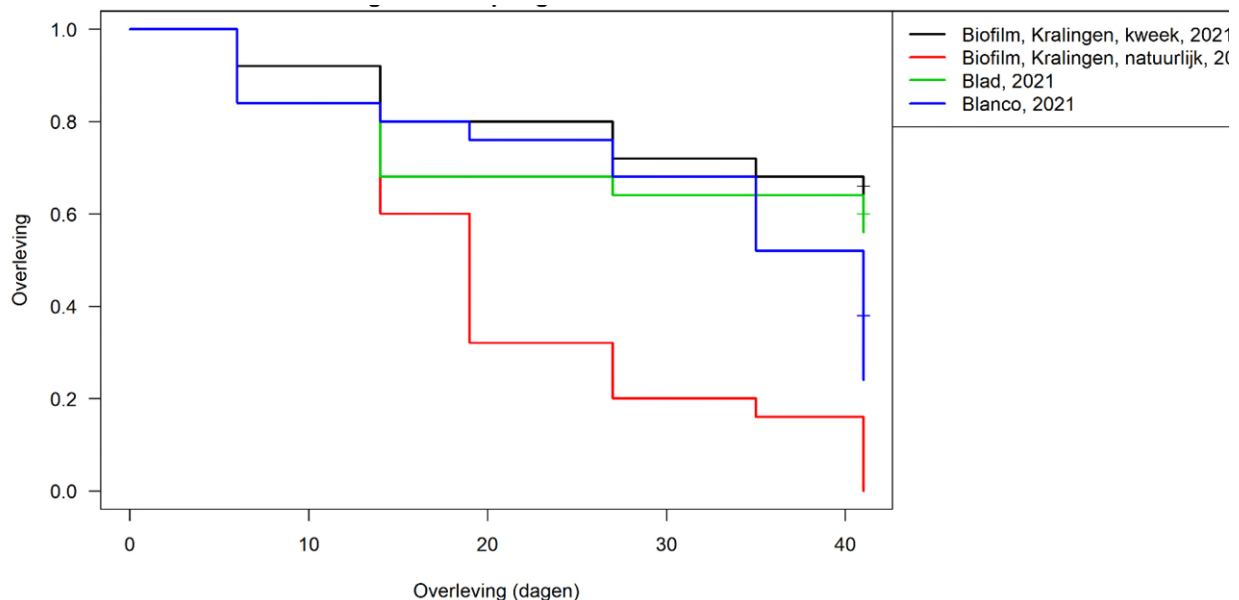
Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
Blad, 2021	-1,619	0,198	-6,995	2,65x10 ¹²	0,126	0,312
Biofilm, Braakman, kweek, 2021	-0,883	0,414	-4,315	1,60x10 ⁵	0,277	0,618
Biofilm, Kralingen, kweek, 2021	-0,802	0,449	-3,940	8,16x10 ⁵	0,301	0,669

Experiment 2: overleving op natuurlijke en gekweekte biofilm

Een gekweekte biofilm, zoals gebruikt is in het eerste groei- en overlevingsexperiment, verschilt van een natuurlijke biofilm zoals die in het drinkwaterdistributiesysteem voorkomt. Zo bevat een natuurlijke biofilm meestal minder biomassa dan een gekweekte biofilm. Een natuurlijke biofilm heeft echter wel een andere samenstelling, onder andere doordat sedimentdeeltjes in de natuurlijke biofilm aanwezig zijn (Figuur 3), die niet aanwezig zijn in een gekweekte biofilm. Om na te gaan of de resultaten van het eerste overlevingsexperiment op een gekweekte biofilm te vertalen zijn naar overleving op een natuurlijke biofilm, is een tweede overlevingsexperiment uitgevoerd met een biofilm opgekweekt in drinkwater van Kralingen en met een biofilm op een uitgenomen PVC-U leiding uit het distributiegebied van Kralingen. Blad is als behandeling toegevoegd ter vergelijking met eerdere experimenten.

In Figuur 10 zijn de overlevingscurven van het tweede overlevingsexperiment weergegeven, de resultaten van het bijbehorende Cox Proportional Hazards model staan in Tabel 5. Hierin is de overleving op de drie verschillende voedingscondities (gekweekte biofilm Kralingen, natuurlijke biofilm Kralingen, blad) vergeleken met de blanco (kaal

PE-plaatje). De waterpissebedden sterven snel af op de natuurlijke Kralingen-biofilm, sneller dan in de blanco of op één van de twee andere voedingsbronnen (gekweekte Kralingen biofilm, blad). De aanwezigheid van het PVC-U leidingstukje met een natuurlijke biofilm zorgt dus voor versnelde afsterving van *Asellus* in het experiment. De blad, gekweekte Kralingen-biofilm en blanco (kaal PE-plaatje) condities verschillen niet significant van elkaar (experimentwise error: $p = 0,05$ met bijbehorende comparisonwise error van $0,0167$). De overleving op een natuurlijke Kralingen-biofilm is wel significant slechter dan op de andere drie voedingsbronnen.



Figuur 10. Kaplan Meier curve van het tweede overlevingsexperiment. Op de y-as de cumulatieve proportie levende *Asellus* gedurende 6 weken per voedselbron (bladmateriaal, natuurlijke biofilm Kralingen, gekweekte biofilm Kralingen en water met een kaal PE-plaatje [blanco]).

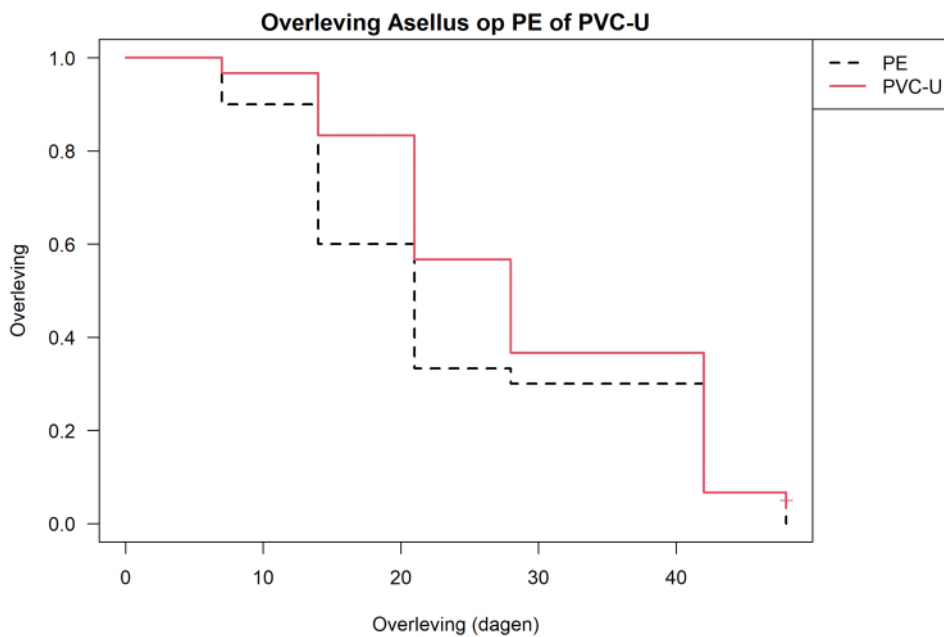
Tabel 5. Uitkomsten van het Cox Proportional Hazards model van het tweede overlevingsexperiment van 2021, vergeleken met de blanco (water met kaal PE-plaatje), voor effecten van de geteste voedselbronnen op de sterfte van *Asellus*. 95% BI: 95% betrouwbaarheidsinterval, <1: langere overleving dan blanco, >1: kortere overleving dan blanco, overlap met 1: geen significant verschil ten opzichte van de blanco. p -waarde experimentwise error: $< 0,05$; met bijbehorende comparisonwise error: $< 0,0167$.

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
Blad, 2021 (2)	-0,565	0,569	-1,489	0,137	0,270	1,196
Biofilm, Kralingen, kweek, 2021 (2)	-0,956	0,384	-2,267	0,023	0,168	0,879
Biofilm, Kralingen, natuurlijk, 2021 (2)	0,769	2,158	2,487	0,013	1,177	3,955

Experiment 3: toxiciteitstest van PE en PVC-U leidingmateriaal

Eén mogelijke reden waarom de waterpissebedden versneld afsterven op het PVC-U materiaal, vergeleken met de blanco en gekweekte biofilm op PE, is dat er uit het PVC-U stoffen lekken die toxisch zijn. Aangezien de PVC-U leiding een dikke wand heeft (3,3 mm vs PE 1 mm) is het mogelijk dat uit het grote snijoppervlak toxische stoffen vrijkomen tijdens het overlevingsexperiment. Om na te gaan of dit inderdaad het geval is, is een kort overlevingsexperiment opgezet met PE en PVC-U leidingmateriaal zonder biofilm.

In Figuur 11 zijn de overlevingscurven van het tweede overlevingsexperiment weergegeven, de resultaten van het bijbehorende Cox Proportional Hazards model staan in Tabel 6. De overleving van de waterpissebedden is vergelijkbaar tussen het PE en PVC-U materiaal en er zijn geen statistisch significante verschillen. Het PVC-U leidingmateriaal is dus niet toxisch voor *Asellus* in deze experimentele opzet. Het snelle afsterven van *Asellus* op PVC-U in het tweede overlevingsexperiment heeft dus een andere oorzaak.



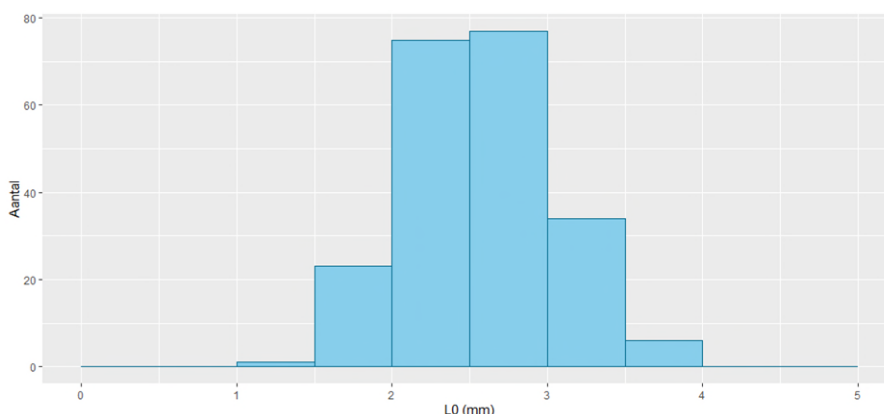
Figuur 11. Kaplan Meier curve van de toxiciteitstest. Op de y-as de cumulatieve proportie levende Asellus gedurende 7 weken per voedselbron (PE of PVC-U leidingmateriaal).

Tabel 6. Uitkomsten van het Cox Proportional Hazards model van het PE-PVC-U toxiciteitsexperiment, vergeleken met PE.

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
PVC-U	-0,256	0,774	-0,981	0,327	0,464	1,292

3.2.2 Groei

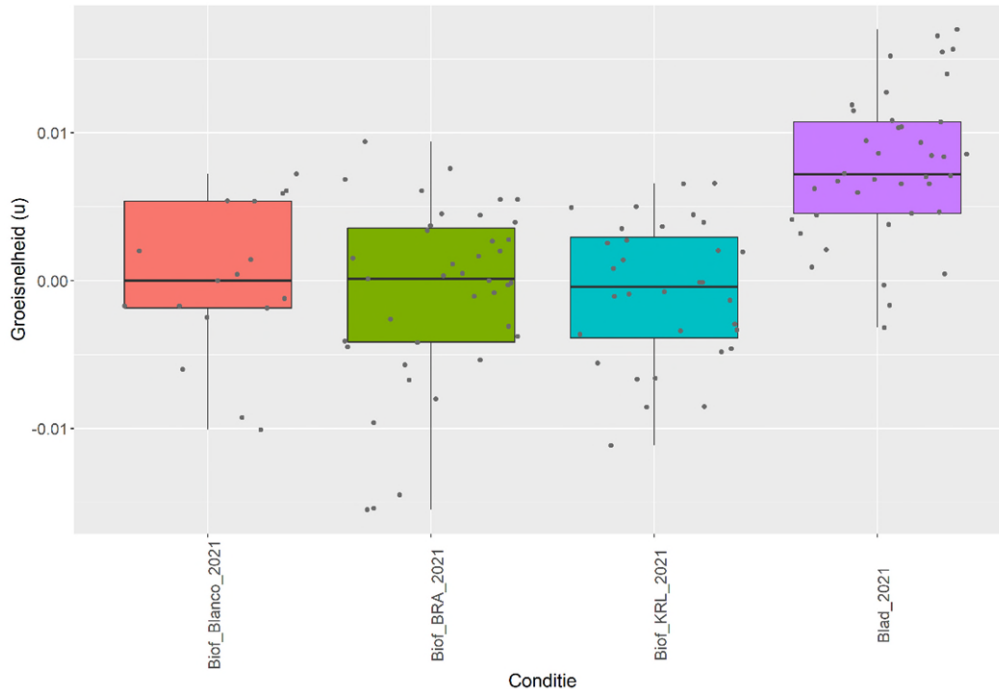
De startlengte van de *Asellussen* (L_0) in het eerste groei- en overlevingsexperiment is 1,5 – 3,5 mm, waarbij de meeste exemplaren 2 – 3 mm zijn (Figuur 12). Door deze kleine startlengte is de kans groter dat in daaropvolgende weken groei zichtbaar wordt, omdat er meer ruimte is voor groei tot een maximale lengte (in het distributienet) van ongeveer 10 mm.



Figuur 12. Startlengte (L_0) van *Asellus* in het eerste groei- en overlevingsexperiment.

In de groeicurven van de individuele *Asellussen* is nauwelijks tot geen groei zichtbaar voor de blanco en biofilmcondities in de eerste vier weken (Bijlage II). Alleen in de blad conditie is er bij de meeste *Asellussen* groei zichtbaar. Van elke individuele *Asellus* is vervolgens de groeisnelheid (μ) in de eerste vier weken bepaald, of tot overlijden als de *Asellus* in de eerste vier weken is overleden (Figuur 13). De groeisnelheid varieert sterk binnen één voedingsconditie. Alleen voor de blad conditie is groei zichtbaar en deze is significant hoger dan de blanco en de

beide biofilmcondities (Kruskal-Wallis met Dunn's en Bonferroni Test, Figuur 7). Er is geen verschil in groeisnelheid tussen de blanco en biofilmcondities, *Asellussen* groeien dus niet op de gekweekte biofilm maar overleven wel langer dan op de blanco.



Figuur 13. Groeisnelheid *Asellus* in het eerste groei- en overlevingsexperiment op verschillende voedselbronnen in de eerste 4 weken. Elk punt geeft de groeisnelheid van één *Asellus* weer.

Tabel 7. Resultaten van Kruskal-Wallis test met posthoc Dunn's Test en Bonferroni. X: statistisch significant verschil bij p -waarde 0,05. -: geen statistisch significant verschil bij p -waarde 0,05.

	Biof_Blanco_2021	Biof_BRA_kwk_2021	Biof_KRL_kwk_2021	Blad_2021
Biof_Blanco_2021				
Biof_BRA_kwk_2021	-			
Biof_KRL_kwk_2021	-	-		
Blad_2021	X	X	X	

3.3 Samenstelling biofilm

De ATP-gehalten in de gekweekte biofilms van Braakman (gemiddeld $4,7 \times 10^3$ pg/cm², Tabel 8) en Kralingen (gemiddeld $4,2 \times 10^3$ pg/cm², Tabel 8) zijn vergelijkbaar met elkaar (Tabel 9). De standaarddeviatie laat zien dat de biofilmkweek redelijk stabiel was gedurende het experiment en dat elke *Asellus* dus nagenoeg evenveel biomassa in de vorm van biofilm heeft gekregen als voedingsbron. Het ATP-gehalte van de natuurlijke biofilm uit Kralingen is bijna een factor 10 lager dan die van de gekweekte biofilm (gemiddeld $5,5 \times 10^2$ pg/cm², Tabel 9). Dit ATP-gehalte komt wel overeen met natuurlijke biofilms op andere leidingen die uit het distributienet zijn uitgenomen (gemiddeld $8,7 \pm 1,9 \times 10^2$ pg/cm², afkomstig uit (20)). Wekelijks heeft een *Asellus* $4,3 \times 10^3$ pg ATP (natuurlijke biofilm Kralingen) of $4,8 - 5,2 \times 10^4$ pg ATP (gekweekte biofilm Kralingen en Braakman) gehad in de vorm van biomassa als voedingsbron.

Tabel 8. Gemiddelde ATP-concentratie (met SD) in de gekweekte en natuurlijke biofilm (n = 16) en de berekende wekelijkse hoeveelheid toegevoegde biomassa.

Biofilm		ATP concentratie (pg/cm ²)	Toegevoegde biomassa per well (pg ATP)
Gekweekt	Braakman	4,7x10 ³ ± 2,8x10 ³	5,2x10 ⁴
Gekweekt	Kralingen	4,2x10 ³ ± 2,5x10 ³	4,8x10 ⁴
Natuurlijk	Kralingen	5,5x10 ² ± 3,0x10 ²	4,3x10 ³

Omdat de ATP-dataset niet-normaal verdeeld is (Shapiro-Wilk test, $p < 0,05$), is een Kruskal-Wallis test gebruikt om na te gaan of de hoeveelheid biomassa (in ATP) verschilt tussen de drie biofilms. Hieruit blijkt dat de hoeveelheid actieve biomassa (in ATP) significant verschilt tussen de gekweekte en de natuurlijke biofilms ($p < 0,05$; Tabel 10). De twee gekweekte biofilms verschillen niet significant van elkaar ($p > 0,05$).

Tabel 9. Resultaten van Kruskal-Wallis test met posthoc Dunn's Test en Bonferroni op de biomassa (in ATP), aantal levende cellen (FCM, levend), totaal aantal cellen (FCM, totaal), TOC, koolhydraten en eiwitten van de verschillende biofilms. X: statistisch significant verschil bij p-waarde 0,05 (experimentwise error) en bijbehorende comparisonwise error (0,0167). -: geen statistisch significant verschil. NA: geen resultaat van de Kruskal-Wallis-test doordat een aantal metingen onder de detectiegrens zijn.

	ATP	FCM, levend	FCM, totaal	TOC	Koolhydraten	Eiwitten
BRA vs KRL_kwk	-	-	-	-	-	-
BRA vs KRL_nat	X	X	-	-	-	NA
KRA_kwk vs KRL_nat	X	-	-	-	-	NA

In week 0, 8 en 16 (gekweekte biofilm) of week 0 en 6 (natuurlijke biofilm) is het aantal cellen in de biofilm bepaald met flow cytometrie. Dit geeft ongeveer hetzelfde beeld als de ATP-analyses (Tabel 10): de twee gekweekte biofilms hebben een vergelijkbaar aantal cellen (levend, gemiddeld: $1,5 - 2,1 \times 10^7$ cellen/cm²) dat ongeveer een factor 10 hoger is dan het aantal levende cellen in de natuurlijke biofilm ($2,2 \times 10^6$ cellen/cm²). Ook hier is de standaarddeviatie klein, wat het beeld van een stabiele en reproduceerbare biofilmkweek versterkt. Er zijn geen resultaten beschikbaar van andere uitgenomen leidingen uit het distributienet om deze resultaten mee te vergelijken, zoals met ATP-metingen wel het geval is.

De flow cytometrie-dataset is niet-normaal verdeeld (Shapiro-Wilk test, $p < 0,05$) en daarom is een Kruskal-Wallis test gebruikt om na te gaan of het aantal cellen in de biofilm verschilt tussen de drie biofilms. Hieruit blijkt dat het aantal levende cellen alleen significant verschilt tussen de gekweekte biofilm van Braakman en de natuurlijke biofilms ($p < 0,05$; Tabel 10).

Tabel 10. Aantal cellen in de biofilm, gemeten met flow cytometrie. Gegeven zijn de individuele metingen en het berekende gemiddelde met SD. *Bij concentraties onder de detectielimiet is deze concentratie gelijk gesteld aan de detectielimiet om het gemiddelde en de SD te kunnen berekenen.

	Gekweekte biofilm, Braakman			Gekweekte biofilm, Kralingen			Natuurlijke biofilm, Kralingen		
	Levend	Dood	Totaal	Levend	Dood	Totaal	Levend	Dood	Totaal
Wk 0	1,30x10 ⁷	1,02x10 ⁶	1,39x10 ⁷	6,50x10 ⁶	1,50x10 ⁵	6,60x10 ⁶	9,40x10 ⁵	1,31x10 ⁶	2,24x10 ⁶
	1,70x10 ⁷	1,16x10 ⁶	1,86x10 ⁷	7,50x10 ⁶	1,60x10 ⁵	7,70x10 ⁶	1,50x10 ⁶	8,38x10 ⁵	2,34x10 ⁶
	1,40x10 ⁷	8,70x10 ⁵	1,51x10 ⁷	8,10x10 ⁶	3,10x10 ⁵	8,50x10 ⁶	7,34x10 ⁵	1,31x10 ⁶	2,04x10 ⁶
							9,73x10 ⁵	1,54x10 ⁶	2,48x10 ⁶
Wk 6							6,89x10 ⁶	<9,70x10 ⁵	6,98x10 ⁶
Wk 8	1,51x10 ⁶	<1,16x10 ⁵	1,51x10 ⁶	1,39x10 ⁶	<1,16x10 ⁵	1,39x10 ⁶			
Wk 16	6,15x10 ⁷	<1,16x10 ⁶	6,15x10 ⁷	5,10x10 ⁷	<1,16x10 ⁶	5,10x10 ⁷			
Gem	2,14x10 ⁷	8,7x10 ⁵ *	2,21x10 ⁷	1,49x10 ⁷	3,8x10 ⁵ *	1,50x10 ⁷	2,21x10 ⁶	1,2x10 ⁶ *	3,22x10 ⁶
SD	2,32x10 ⁷	4,4x10 ⁵ *	2,29x10 ⁷	2,04x10 ⁷	4,4x10 ⁵ *	2,03x10 ⁷	2,63x10 ⁶	2,8x10 ⁵ *	2,11x10 ⁶

Het organisch koolstofgehalte lijkt hoger in de natuurlijke biofilm (0,026 mg C/cm²) dan in de gekweekte biofilms (0,012 mg C/cm², Tabel 11), de verschillen zijn echter niet significant (Tabel 9). Hetzelfde geldt voor de parameters koolhydraten en eiwitten, er zijn verschillen in de gemeten concentratie, maar deze verschillen tussen de drie typen biofilms zijn niet significant. Het koolhydraatgehalte is het hoogste in de gekweekte biofilm van Braakman (0,0016 mg C/cm², Tabel 13), maar verschilt weinig van de Kralingen biofilms (gekweekt: 0,0012 mg C/cm²; natuurlijk: 0,0015 mg C/cm²). Het eiwitgehalte van de verschillende biofilms was een aantal keer onder de detectiegrens, behalve in week 0 en 16 van de gekweekte biofilms (0,0012 – 0,0019 mg C/cm²).

Tabel 11. Concentratie (met gemiddelde en SD) TOC, koolhydraten en eiwitten in de gekweekte en natuurlijke biofilm. *Bij concentraties onder de detectielimiet is deze concentratie gelijk gesteld aan de detectielimiet om het gemiddelde en de SD te kunnen berekenen.

	Gekweekte biofilm, Braakman			Gekweekte biofilm, Kralingen			Natuurlijke biofilm, Kralingen		
	TOC (mg C/cm ²)	Koolhydraten (mg C/cm ²)	Eiwit (mg C/cm ²)	TOC (mg C/cm ²)	Koolhydraten (mg C/cm ²)	Eiwit (mg C/cm ²)	TOC (mg C/cm ²)	Koolhydraten (mg C/cm ²)	Eiwit (mg C/cm ²)
Wk 0	0,0017	0,0022	0,0017	0,0015	0,001	0,0015	0,037	0,0021	<0,001
Wk 6	-	-	-	-	-	-	0,014	0,0008	<0,0005
Wk 8	0,017	0,0011	<0,0006	0,016	0,001	<0,0006	-	-	-
Wk 16	0,017	0,0016	0,0019	0,017	0,0015	0,0012	-	-	-
Gem.	0,012	0,0016	0,0014*	0,012	0,0012	0,001*	0,026	0,0015	0,001*
SD	0,0088	0,0006	0,0007*	0,0087	0,0003	0,000*	0,016	0,0009	0,000*

Met een Kruskal-Wallis test is statistisch getest of de metaalconcentraties verschillen tussen de drie biofilms. In Tabel 12 zijn alle resultaten getoond, van een deel van deze metalen zijn in een eerdere studie LC₅₀-waarden in de literatuur zijn gevonden (13). De concentraties in de biofilm zijn zeer laag en omdat de LC₅₀-waarden zijn bepaald in water en niet in een biofilm of andere vaste voedingsbron, maakt dit vergelijking van de LC₅₀-waarden met de concentratie in biofilms lastig.

Omdat de overleving alleen verschilt tussen de gekweekte en natuurlijke biofilms, is het voornamelijk interessant of er significante verschillen zijn in de samenstelling van de twee gekweekte biofilms vergeleken met de natuurlijke biofilm (laatste twee kolommen in Tabel 12). Hieruit blijkt dat van geen van de stoffen de concentratie in de

gekweekte biofilm van Kralingen of Braakman verschilt van die van de natuurlijke Kralingen-biofilm. Door de lage concentratie in de biofilm lijkt het echter onwaarschijnlijk dat deze metalen overleving beïnvloeden in het experiment. Mogelijk is de rol van de metalen groter in het hele distributienet, waarin *Asellus* kan foerageren en zo meer biofilm kan begrazen en metalen binnen kan krijgen.

Tabel 12. Concentratie metalen in de gekweekte en natuurlijke biofilm, gecorrigeerd voor de metalenconcentratie van het trilwater. Met een Kruskal-Wallis test, gevolgd door post-hoc Dunn's Test, is statistisch getest of de concentratie tussen de drie typen biofilms verschilt. Rood: p-waarde kleiner dan 0,05 (experimentwise error) en bijbehorende comparisonwise error (0,0167). 0 (groen): negatief resultaat na correctie voor trilwater. -: Waarde onder de detectielimiet. NA: Kruskal-Wallis test niet uitgevoerd i.v.m. te weinig datapunten.

	Gekweekte biofilm Braakman (ng/cm ²)			Gekweekte biofilm Kralingen (ng/cm ²)			Natuurlijke biofilm Kralingen (ng/cm ²)		Kruskal-Wallis test		
	wk 0	wk 8	wk 16	wk 0	wk 8	wk 16	wk 0	wk 6	BRA_kwk vs KRL_kwk	BRA_kwk vs KRL_nat	KRA_kwk vs KRL_nat
Aluminium	320	193	152	42	36	54	264	113	0,030	0,709	0,118
Antimoon	0,041	0,041	0,075	0,029	0	0,052	0,039	0,053	0,180	0,764	0,368
Arseen	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Barium	0	0	29	0	14	12	26	20	0,864	0,252	0,194
Beryllium	-	-	-	0,000	-	-	0,000	0,000	NA	NA	NA
Bismut	0,220	0,058	0,406	0,070	0,012	2,610	-	0,097	0,705	0,894	0,894
Boor	0	150	104	0	109	98	116	72	0,615	0,940	0,600
Cadmium	0,035	0,058	0,046	0,035	0,058	0,104	0,470	0,087	0,500	0,070	0,227
Calcium	0	9809	8080	0	8689	4565	27863	6543	0,615	0,500	0,261
Cerium	0,044	0,206	0,032	0	0,171	0,032	0,881	0,395	0,502	0,134	0,036
Cesium	-	0	0	0,009	0	0,020	0,020	0	0,192	0,371	0,744
Chloride	-	267	0	-	0	0	2127	0	0,429	0,752	0,268
Chroom	2,3	1,1	1,0	0,928	-	0,812	4,3	2,3	0,205	0,205	0,021
Dysprosium	0,000	0,000	-	0,000	-	-	0,052	0,029	1,000	0,077	0,149
Erbium	-	-	-	0,000	-	-	0,026	0,010	NA	NA	NA
Europium	-	-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,010	1,000	0,121	0,038
Fosfor	121	2064	173	68	585	126	70	0	0,505	0,074	0,233
Gadolinium	0,000	0,000	-	0,000	-	-	0,104	0,049	1,000	0,077	0,149
Gallium	0,049	0,061	0,049	0,003	0,026	0,026	0,163	0,070	0,129	0,258	0,013
Germanium	0	0,012	0,012	-	0,000	0,035	0,104	0,058	0,830	0,058	0,126
Hafnium	-	-	0,000	-	-	0,000	0,000	0,010	NA	NA	NA
Holmium	-	-	-	-	-	-	0,000	0,000	NA	NA	NA
IJzer	435	580	464	162	104	452	966	422	0,134	0,941	0,205
Indium	-	-	-	0,000	-	-	-	-	NA	NA	NA
Iridium	0,035	0,116	0,012	0,046	0,139	0,000	0,104	-	0,850	0,593	0,688
Kalium	0	3186	0	0	350	0	0	0	0,827	0,380	0,495
Kobalt	0,070	0,139	0,197	0,035	0,104	0,128	2,2	0,892	0,405	0,157	0,031
Koper	87	87	19	42	26	12	230	85	0,241	0,500	0,085
Lanthanium	0,020	0,009	0,032	0,009	-0,003	0,055	0,437	0,211	0,737	0,099	0,051
Lithium	0	0,232	0	0	0,116	0	0,261	0,000	0,849	0,550	0,442

Lood	9,7	6,1	1,5	3,3	2,2	2,2	18	10	0,615	0,115	0,043
Lutonium	-	-	-	0,000	-	-	-	-	NA	NA	NA
Magnesium	0	402	152	0	390	0	2770	176	0,608	0,321	0,147
Mangaan	1,9	2,5	2,0	0,790	0,767	2,5	42	19	0,502	0,134	0,036
Molybdeen	0,925	0,740	0,879	2,0	0,774	0,287	1,7	0,686	0,868	0,941	0,941
Natrium	0	11108	8899	0	10238	6776	28465	7538	0,615	0,500	0,261
Neodymium	0,023	0,012	0,000	0,012	0,000	0,012	0,339	0,194	0,731	0,091	0,046
Nikkel	3,5	3,5	1,6	1,4	1,2	1,8	5,1	1,4	0,180	0,764	0,368
Niobium	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Osmium	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Palladium	-	0,052	0,122	-	0,064	0,319	0,144	0,063	0,285	0,593	0,593
Platina	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Praseodymium	-	-	-	0,000	-	-	0,078	0,049	NA	NA	NA
Renium	-	-	-	0,000	-	-	-	-	NA	NA	NA
Rubidium	0	0,054	0	0	0	0	0,303	0,006	0,445	0,172	0,040
Ruthenium	-	-	-	-	-	0,000	-	-	NA	NA	NA
Samarium	0,035	0,000	0,012	0,012	0,000	0,000	0,078	0,029	0,390	0,249	0,055
Scandium	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Seleen	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Strontium	0	12	17	0	12	12	26	9,7	0,731	0,645	0,442
Tantalium	-	0	0,033	-	-0,001	0,033	0	0,018	0,680	0,680	1,000
Telluur	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Terbium	-	-	-	-	-	-	0,000	0,000	NA	NA	NA
Thallium	-	0,000	-	0,000	0,000	0,023	0,026	-	0,683	0,134	0,153
Thorium	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
Thulium	-	-	-	0,000	-	-	-	-	NA	NA	NA
Tin	0,206	0,136	0,090	0,032	0,020	0,148	0,124	0,036	0,182	0,371	0,766
Titanium	452	179	272	266	80	82	690	145	0,134	0,941	0,205
Uranium	0	0,062	0	0	0,028	0,062	0,036	0,013	0,606	0,591	0,939
Vanadium	30	10	11	13	3,6	5,7	41	5,9	0,243	0,941	0,264
Wolfram	0,229	0,136	0,078	0,113	0,055	0,113	0,307	0,036	0,402	0,708	0,708
Ytterbium	0,000	-	-	0,000	-	-	0,026	0,010	NA	NA	NA
Yttrium	0,004	0,039	0,028	0,004	0,016	0,028	0,427	0,188	0,613	0,113	0,042
Zilver	0,290	0,116	0,000	0,174	-	0,023	0,000	0,000	0,861	0,161	0,150
Zink	8,3	6,4	5,4	5,4	3,8	4,6	58	13	0,180	0,230	0,016
Zirkonium	0,189	0,444	0,595	0,154	0,281	0,293	1,8	0,972	0,405	0,157	0,031

4 Discussie

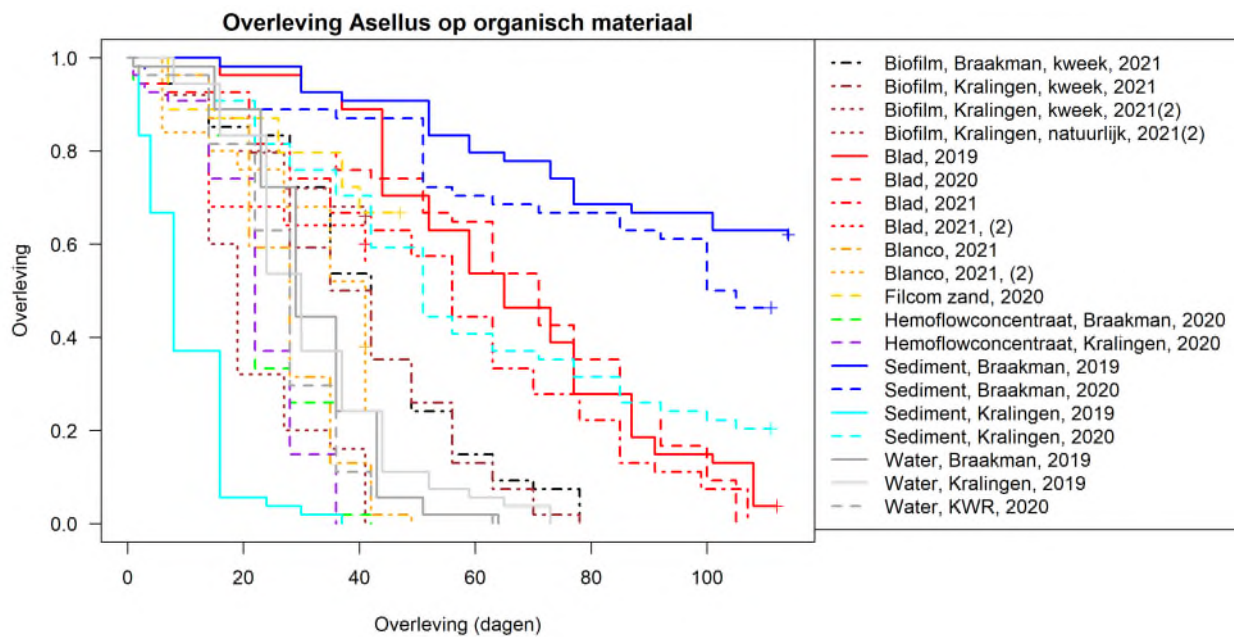
4.1 Overleving *Asellus* op verschillende voedselbronnen

In het huidige en voorgaande (1) onderzoek zijn er in totaal vier overlevingsexperimenten met *Asellussen* en verschillende voedingsbronnen uitgevoerd:

- 2019: blad, water Braakman, water Kralingen, sediment Braakman, sediment Kralingen (1)
- 2020: blad, water KWR, sediment Braakman, sediment Kralingen, Filcom zand, hemoflowconcentraat Braakman, hemoflowconcentraat Kralingen (1)
- 2021: blad, kaal PE-plaatje (blanco), gekweekte biofilm Kralingen, gekweekte biofilm Braakman (dit rapport)
- 2021 (2): blad, kaal PE-plaatje (blanco), gekweekte biofilm Kralingen, natuurlijke biofilm Kralingen (dit rapport)

De resultaten van deze vier overlevingsexperimenten zijn gecombineerd in Figuur 14 en een samenvatting van de resultaten van het CPH model zijn gegeven in Tabel 13. Op deze manier kunnen de resultaten van verschillende experimenten met elkaar vergeleken worden en kan worden nagegaan of de controles (positieve controle: blad, negatieve controle: water of blanco [kaal PE-plaatje]) een vergelijkbare overleving geven tussen de experimenten. Hierbij moet er wel rekening mee worden gehouden dat experiment 2021(2) een iets andere opzet (kleine petrischaaltjes) had dan de eerdere drie experimenten (6-wells plaat). Ook varieert de duur van het experiment (6 – 16 weken). Voor het bespreken van de resultaten is voor de duidelijkheid steeds een subset van de overlevingscurven in een aparte grafiek weergegeven.

Om een uitspraak te doen over de statistische significantie van de vergelijking worden de resultaten van het CPH-model uit Tabel 13 gebruikt. In Tabel 13 zijn de resultaten gegeven van de statistische testen die zijn uitgevoerd om de overleving op alle voedingsbronnen met elkaar te vergelijken. Zoals beschreven in hoofdstuk 2.3.1 word hierbij gebruikt gemaakt van een 'comparisonwise error' van $p = 0,00026$ om de kans op toevallige statistische verschillen, door het grote aantal uitgevoerde statistische testen op de dataset te verkleinen. Hierdoor kunnen de resultaten in Tabel 13 verschillen van de CPH-resultaten in Tabel 4 en Tabel 5, waarbij slechts een beperkt aantal statistische testen is uitgevoerd en de 'comparisonwise error' dus hoger ligt.



Figuur 14. Kaplan Meier curve van alle groei- en overlevingsexperimenten uit 2019, 2020 en 2021. Op de y-as de cumulatieve proportie levende Asellus gedurende de duur van het experiment.

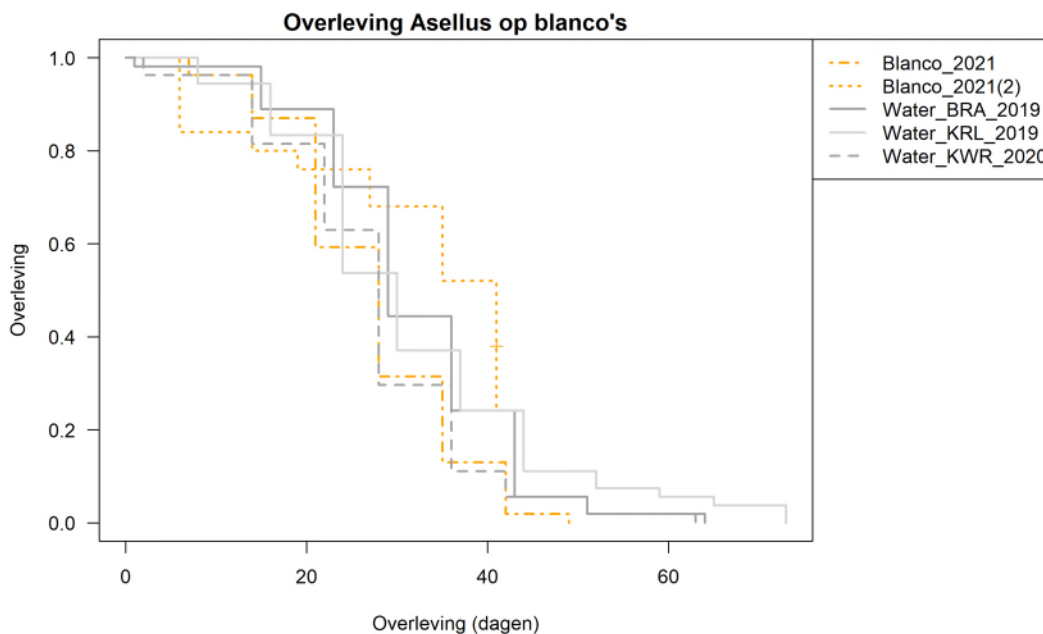
Tabel 13. Uitkomsten van het Cox Proportional Hazards model van alle groei- en overlevingsexperimenten uit 2019, 2020 en 2021. X: significant verschillend bij $p < 0,05$ (experimental wise error) en bijbehorende 'comparison wise error' ($p < 0,000292$). - niet significant verschillend. In bijlage I zijn de resultaten van alle CPH modellen weergegeven.

	1. Water_KRL_2019	2. Water_BRA_2019	6. Water_KWR_2020	3. Blad_2019	7. Blad_2020	14. Blad_2021	18. Blad_2021(2)	4. Sed_KRL_2019	8. Sed_KRL_2020	5. Sed_BRA_2019	9. Sed_BRA_2020	12. Filcom_zand_2020	10. HF_KRL_2020	11. HF_BRA_2020	13. Blanco_2021	17. Blanco_2021(2)	16. Biof_KRL_kwk_2021	19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	20. Biof_KRL_nat_2021(2)	
2. Water_BRA_2019	-	-																		
6. Water_KWR_2020	-	-																		
3. Blad_2019	X	X	X																	
7. Blad_2020	X	X	X	-																
14. Blad_2021	X	X	X	-	-															
18. Blad_2021(2)	-	-	-	-	-	-														
4. Sed_KRL_2019	X	X	X	X	X	X	X													
8. Sed_KRL_2020	X	X	X	-	-	-	-	X												
5. Sed_BRA_2019	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
9. Sed_BRA_2020	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-										
12. Filcom_zand_2020	X	X	X	-	-	-	-	X	-	X	X									
10. HF_KRL_2020	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
11. HF_BRA_2020	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-							
13. Blanco_2021	-	-	-	X	X	X	-	X	X	X	X	X	-	-						
17. Blanco_2021(2)	-	-	-	X	X	X	-	X	X	X	X	X	-	-	-					
16. Biof_KRL_kwk_2021	-	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X			
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	X	-	X	X	X	-	X			
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	X	X		
15. Biof_BRA_2021	-	-	X	X	X	-	-	X	X	X	X	-	X	X	X	-	-	-	X	X

Negatieve controles: water en plaatje zonder biofilm

In alle experimenten zijn één of twee negatieve controles meegenomen. Dit zijn de condities waarin alleen water of een kaal PE-plaatje is toegevoegd en er dus geen voedingsstoffen aanwezig zijn voor de *Asellussen*. Alle negatieve controles zijn weergegeven in Figuur 15 en de resultaten van het CPH model zijn gegeven in Tabel 13.

De overleving van *Asellussen* op water van KWR, Braakman en Kralingen is vergelijkbaar met elkaar ($p > 0,05$, Tabel 13) en ook de overleving van *Asellus* op een kaal PE-plaatje (blanco in Figuur 15) komt hiermee overeen. Ondanks dat er vier opeenvolgende experimenten zijn uitgevoerd, waarbij er kleine verschillen zijn in de opzet en elke keer nieuwe *Asellussen* uit de kweek worden gebruikt, is de afsterving van *Asellus* vergelijkbaar. Dit toont aan dat ondanks deze kleine verschillen de reproduceerbaarheid van het overlevingsexperiment goed is.

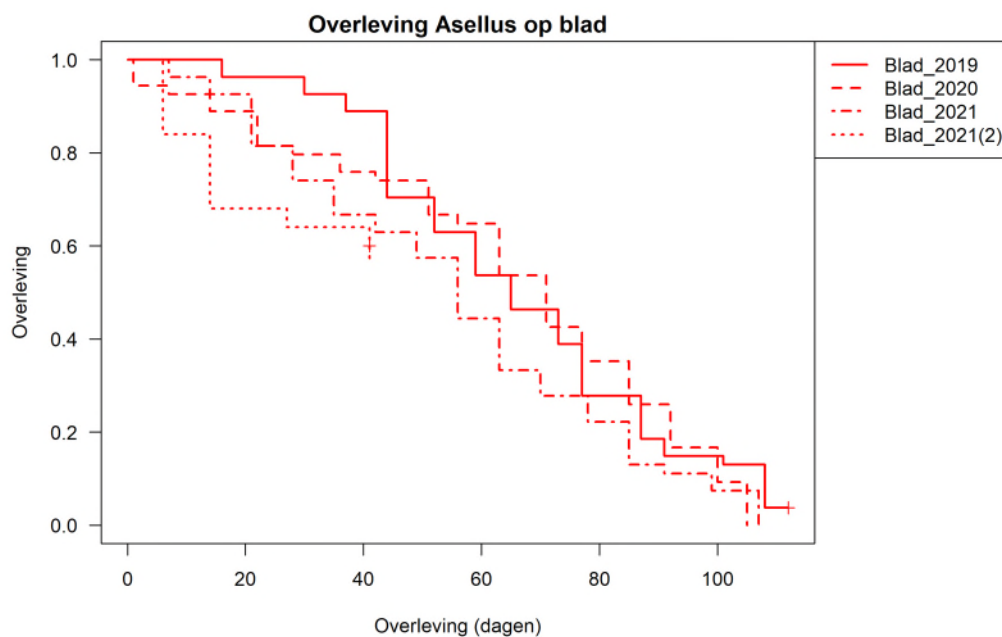


Figuur 15. Kaplan Meier curve van de negatieve controles uit de groei- en overlevingsexperimenten uit 2019, 2020 en 2021. Op de y-as de cumulatieve proportie levende *Asellus* gedurende de duur van het experiment. In de figuur is dezelfde kleurcodering gebruikt als in Figuur 15.

Positieve controle: blad

In alle experimenten is als positieve controle een stukje esdoornblad meegenomen als voedingsbron. Aangenomen wordt dat bladmateriaal een goede voedingsbron is voor *Asellus* en dat overleving hierop relatief lang zal zijn. Alle positieve controles zijn weergegeven in Figuur 16 en de resultaten van het CPH model zijn gegeven in Tabel 13.

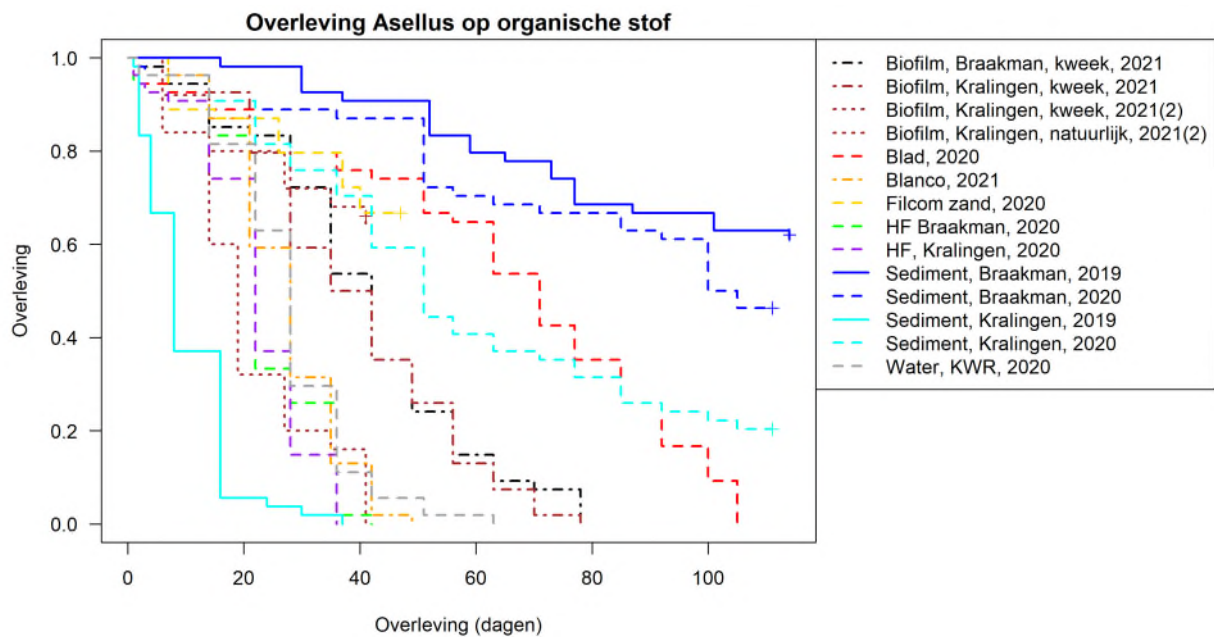
De overleving van *Asellussen* op bladmateriaal is vergelijkbaar tussen alle experimenten ($p > 0,05$, Tabel 13). Net als bij de negatieve controles is de overleving dus vergelijkbaar tussen de experimenten ondanks de kleine verschillen in experimentele opzet. Dit bevestigt dat de resultaten van de overlevingsexperimenten goed reproduceerbaar zijn.



Figuur 16. Kaplan Meier curve van de positieve controles uit de groei- en overlevingsexperimenten uit 2019, 2020 en 2021. Op de y-as de cumulatieve proportie levende *Asellus* gedurende de duur van het experiment. In de figuur is dezelfde kleurcodering gebruikt als in Figuur 15.

Overleving op biofilm, sediment en hemoflowconcentraat

In vier opeenvolgende overlevingsexperimenten zijn verschillende soorten organisch stof onderzocht die in het drinkwaterdistributienet mogelijk als voedingsbron kunnen dienen voor waterpissebedden. In Figuur 17 is de overleving van *Asellus* op alle verschillende voedselbronnen weergegeven, maar is van de positieve (blad) en negatieve (water, blanco) controle slechts één overlevingscurve getoond. Dit is gedaan om het figuur overzichtelijker te maken en omdat de verschillende positieve en negatieve controles statistisch niet van elkaar verschillen. Vanwege de artefacten die zijn opgetreden bij het overlevingsexperiment op sediment van Kralingen in 2019 (Sed_KRL_2019, zie (1)) wordt deze conditie buiten beschouwing gelaten in de discussie hieronder.



Figuur 17. Kaplan Meier curve van alle groei- en overlevingsexperimenten uit 2019, 2020 en 2021, maar met slechts één blad en één blanco condities om het figuur beter overzichtelijk te maken. Op de y-as de cumulatieve proportie levende *Asellus* gedurende de duur van het experiment. In de figuur is dezelfde kleurcodering gebruikt als in Figuur 14.

In het distributienet zijn drie mogelijke bronnen van organisch stof voor waterpissebedden:

- water, met de daarin opgeloste stoffen
- (biofilm op) sediment, inclusief alle bestanddelen van sediment, zoals levende en dode invertebraten, fecale pellets en inerte deeltjes (roest, bitumen, etc)
- biofilm op de buiswand, inclusief eventueel ingevangen sediment en andere deeltjes

Alle drie de voedingsbronnen zijn getest in de overlevingsexperimenten.

Vanuit de survival curves (Figuur 17) lijkt het dat overleving het slechtst is op de natuurlijke biofilm van Kralingen en de beide hemoflowconcentraten. Uit de CPH-resultaten (Tabel 13) blijkt dat de verschillen tussen de hemoflowconcentraten en de bijbehorende negatieve controle (Water_KWR_2020) niet significant verschillend zijn. Ook de overleving op de natuurlijke biofilm van Kralingen verschilt niet significant van de bijbehorende negatieve controle (Blanco_2021(2)). De verschillen tussen de hemoflowconcentraten, de natuurlijke biofilm van Kralingen en alle andere condities (blad, sediment, gekweekte biofilm) zijn juist wel significant. Hemoflowconcentraat en de natuurlijke biofilm uit Kralingen leveren dus geen of ruim onvoldoende voedingsstoffen voor *Asellus* om te overleven wat tot een snelle afsterving leidt.

Asellussen overleven statistisch significant langer op een gekweekte biofilm dan op de bijbehorende negatieve controle (Blanco_2021). Overleving is echter wel significant korter dan op sediment van Braakman uit 2019 en 2020 en Kralingen-sediment uit 2020. De slechtere overleving kan meerdere redenen hebben: zo kan de biofilm inderdaad minder geschikt zijn als voedselbron vergeleken met sediment, maar het is ook mogelijk dat biofilm wel geschikt is als voedingsbron maar dat er te weinig is toegediend in het experiment voor *Asellus* om te kunnen overleven.

Samengevat overleven *Asellussen* in de experimenten het langst op sediment, met name sediment afkomstig uit Braakman, maar kan het ook overleven op biofilm. Deze langere overleving op sediment is statistisch significant ten opzichte van alle andere geteste condities (water, blanco plaatje, blad, hemoflowconcentraat en biofilm).

4.2 Overleving *Asellus* in distributienet

Uit de wetenschappelijke literatuur is bekend dat waterpissebedden grazers zijn, waarbij ze voedingsstoffen van oppervlakten schrapen (13). Dit is bijvoorbeeld aangetoond voor bladmateriaal waarvan de schimmel/biofilm-laag wordt opgegeten, maar mogelijk ook het blad zelf (11, 21, 22). Aangenomen wordt dat in het distributienet *Asellussen* zich ook als grazers gedragen en sediment op de bodem van de leiding en de buiswandbiofilm als voedselbron gebruiken. Dit komt overeen met de resultaten uit de overlevingsproeven waarin de beste overleving (uitgezonderd bladmateriaal als de positieve controle) op sediment en gekweekte biofilm wordt gemeten. Bevestiging van sediment als voedingsbron voor *Asellus* in het distributienet, blijkt uit fecale pellets uit het distributienet waarin materiaal wordt gevonden dat in het distributienet wordt gebruikt of aanwezig is, waaronder ijzer, mangaan, bitumen en asbest (23). Een aandachtspunt hierbij blijft dat biofilm op de buiswand kwalitatief mogelijk ook voldoende is als voedingsbron, maar dat de toegediende hoeveelheid in de experimenten niet voldoende was. Dit lijkt ondersteund te worden doordat *Asellus* langer overleeft op (gekweekte) biofilm, met meer biomassa, vergeleken een behandeling zonder voedselbron. *Asellus* kan in het distributienet ook grotere afstanden afleggen, en heeft zo meer biofilm beschikbaar, dan onder de hier gehanteerde experimentele condities.

Ook de configuratie van het distributienet speelt zeer waarschijnlijk een rol in de aantallen *Asellus*. Zo is uit eigen onderzoek van Evides bekend dat in het distributiegebied van Braakman minder bochten, afsluiters, moffen, etc aanwezig zijn dan in het distributiegebied van Kralingen (pers. comm. Evides). Dit kan mogelijk (mede) verklaren waarom er in het distributiegebied van Kralingen, ondanks de slechtere sedimentkwaliteit, veel *Asellussen* aanwezig zijn. Door alle bovengenoemde factoren zijn er waarschijnlijk meer 'schuilplekken' voor *Asellus* beschikbaar in het distributiegebied van Kralingen, met vermoedelijk een gunstiger ecosysteem, dan in het distributiegebied van Braakman. Uitsluiting van enkele afsluiters liet in het verleden inderdaad zien dat hier erg veel *Asellussen* aanwezig zijn (pers. comm. Hein van Lieverloo).

4.3 Rol van biomassa en andere stoffen in overleving van *Asellus*

Om te testen of de resultaten met een gekweekte biofilm representatief zijn voor overleving op een natuurlijke biofilm, is eenmalig een test met een natuurlijke biofilm op een uitgenomen PVC-U leiding uit het drinkwaterdistributienet uitgevoerd. De slechte overleving op deze natuurlijke biofilm, vergelijkbaar met de blanco, kan echter niet goed verklaard worden. De hypothese dat er stoffen uit PVC-U lekken die toxisch zijn voor *Asellus*, is niet bevestigd in het korte toxiciteitsexperiment. Een andere optie is dat de hoeveelheid biomassa in de natuurlijke biofilm ongeveer een factor 10 lager is dan in de gekweekte biofilm en dat deze daardoor, gecombineerd met het iets kleinere oppervlak van het plaatje, te weinig voedingsstoffen (biomassa gekweekte biofilm: $4,8 - 5,2 \times 10^4$ pg ATP vs biomassa natuurlijke biofilm: $4,3 \times 10^3$ pg ATP) bevat en daarmee de snelle afsterving veroorzaakt.

Uit de wetenschappelijke literatuur is niet op te maken of dit voldoende biomassa is voor overleving, groei en voortplanting. Van waterpissebedden in het distributienet kan echter worden vermoed dat ze grote afstanden kunnen afleggen, daarbij de biofilm van de buiswand of sediment afschrapend. De PE of PVC-U plaatjes die in dit experiment zijn toegevoegd zijn daarom zeer waarschijnlijk vele malen kleiner dan de hoeveelheid biofilm die waterpissebedden in de praktijk kunnen bereiken en eten.

In ander onderzoek is van meerdere leidingen, van verschillende materialen en uit verschillende distributiegebieden, de biomassa in de biofilm bepaald (20). Hieruit blijkt dat de hoeveelheid biomassa in de biofilm min of meer vergelijkbaar is tussen de leiding die in dit onderzoek is uitgenomen ($5,5 \times 10^2 \pm 9,0 \times 10^1$ pg ATP/cm²) en de eerder geteste leidingen ($8,7 \times 10^2 \pm 1,9 \times 10^2$ pg ATP/cm²). De geteste Kralingen-leiding met natuurlijke biofilm is op dat aspect dus redelijk representatief voor de biofilm in andere distributienetten.

In het voorgaande onderzoek is onder andere sediment gebruikt als voedingsbron in de overlevingsexperimenten (1). Hierbij is ook de hoeveelheid biomassa (in ATP) van het sediment bepaald. Met deze gegevens is berekend hoeveel biomassa aan het experiment wordt toegevoegd door het toevoegen van sediment. Deze hoeveelheden staan in Tabel 14 vermeld naast de hoeveelheid biomassa op de biofilmstukjes. De hoeveelheid biomassa in het sediment van Braakman (21,6 ng ATP, Tabel 14) is lager dan die van de gekweekte biofilm (47,5 – 52,2 ng ATP, Tabel 14), terwijl de overleving op het Braakman-sediment beter is dan die op de gekweekte biofilm (Tabel 13, Figuur 17). De hoeveelheid toegevoegde biomassa is dus niet de enige parameter die de overleving van *Asellus* bepaalt. Andere factoren zoals bijvoorbeeld de vorm waarin de biomassa beschikbaar is (buiswandbiofilm of biofilm op sediment) en de andere aanwezige stoffen in de voedingsbron zijn ook bepalend voor overleving.

Deze gegevens suggereren dat de biomassa op het sediment beter toegankelijk is voor waterpissebedden dan de biomassa in de buiswandbiofilm en/of dat in het sediment andere aanvullende stoffen aanwezig zijn die in het biofilm niet of in andere concentraties aanwezig zijn. Welke stoffen dit zijn, kan op basis van deze experimenten niet worden vastgesteld.

Tabel 14. Hoeveelheid biomassa (in ATP) toegevoegd aan het *Asellus* overlevingsexperiment.

Voedingsbron	Locatie	Toegevoegde biomassa (ng ATP)
Sediment	Kralingen	10,0
	Braakman	21,6
Gekweekte biofilm	Kralingen	47,5
	Braakman	52,2
Natuurlijke biofilm	Kralingen	4,3

5 Conclusies en aanbevelingen

Bladmateriaal bevat voldoende voedingsstoffen voor overleving en groei van *Asellus*, gekweekte biofilm bevat voldoende voedingsstoffen voor overleving maar niet voor groei en de natuurlijke biofilm bevat in deze experimentele opzet onvoldoende voedingsstoffen.

Asellussen overleven het beste op een gekweekte biofilm, gevolgd door gelijke (slechte) overleving op de natuurlijke biofilm en de negatieve controle zonder voedselbron (kaal PE-plaatje). *Asellus* groeit in de eerste vier weken alleen op bladmateriaal en deze groei is dan ook significant hoger dan op gekweekte biofilm en de blanco.

De gekweekte biofilms bevatten gemiddeld ongeveer een factor 10 meer biomassa (in ATP-gehalte) dan de natuurlijke biofilm. Ook het aantal cellen is in de gekweekte biofilm ongeveer een factor 10 hoger dan in de natuurlijke biofilm. Slechts enkele verschillen in (metalen)samenstelling van de gekweekte en natuurlijke biofilms zijn significant verschillend, maar deze kunnen niet gerelateerd worden aan verschillen in overleving.

Combinatie van de resultaten van het huidige en de voorgaande overlevingsexperimenten (1) laat zien dat *Asellussen* sediment en biofilm als voedingsbron kunnen gebruiken voor overleving. Overleving is statistisch significant het langst op sediment, met name sediment afkomstig uit Braakman, ten opzichte van alle andere geteste condities (water, kaal PE-plaatje, blad, hemoflowconcentraat en biofilm).

De verschillen in overleving worden onder andere veroorzaakt door de hoeveelheid biomassa (in ATP) van de voedingsbron, daarnaast wordt overleving beïnvloed door andere factoren. Dit kan het verschil in toegankelijkheid van de biomassa zijn (biofilm op buiswand of op sediment) en/of de aanwezigheid en concentratie van andere stoffen, bijvoorbeeld organisch materiaal of metalen in de biofilm of sediment. Welke stoffen dit zijn, kan op basis van dit onderzoek niet worden vastgesteld.

Op basis van dit onderzoek is nog niet duidelijk welke van de twee geschikte voedingsbronnen (sediment en biofilm) het belangrijkste is in het distributienet. Vorming en instandhouding van zowel sediment als biofilm in het distributienet wordt beïnvloed door de biologische stabiliteit van het water. Distributie van drinkwater met een lage concentratie nutriënten kan dus (op de lange termijn) de hoeveelheid sediment en biofilm, de voedingsbronnen van waterpissebedden, verminderen.

Om te proberen een schatting te maken van de relatie tussen aantallen *Asellussen*, sediment en biofilm in verschillende distributienetten, en of dus inderdaad in gebieden met minder biofilm en/of sediment minder *Asellussen* vóórkomen, kunnen berekeningen worden gedaan aan de resultaten van spuiacties en buisuitnamen. Berekening van de hoeveelheid sediment en biofilm per *Asellus* in een gespuide leiding, geeft een ruwe schatting van hoeveel sediment en/of biofilm een *Asellus* nodig heeft voor overleving, groei en voortplanting. Dit kan worden berekend voor verschillende spuilocaties en verschillende distributiegebieden. Hierbij wordt echter geen rekening gehouden met de configuratie van het distributienet en verschillen in sedimentkwaliteit tussen (en mogelijk binnen) distributiegebieden. Uit dit soort berekeningen aan een zo groot mogelijk aantal spuiacties kan mogelijk een, sterk indicatieve, ondergrens in biofilm- en sedimenthoeveelheid worden berekend.

6 Referenties

1. van Bel N, Verschoor AM. 2020. Groei en overleving van waterpissebedden op water en organische stof uit het drinkwaterdistributienet van Kralingen en Braakman. KWR, BTO 2020.040. Nieuwegein.
2. Learbuch KLG, van Bel N. 2018. Temperatuurafhankelijke groei van *Aeromonas* in drinkwater. KWR, BTO 2018.097. Nieuwegein.
3. van Bel N. 2018. Groei van *Aeromonas* op sediment en ongewervelde dieren uit het distributienet van de productielocaties Kralingen, Braakman en Berenplaat van Evides. KWR, BTO 2018.037. Nieuwegein.
4. van Bel N, Wullings BA, Hijnen WAM. 2016. Isolatie en identificatie van *Aeromonas* stammen uit vijf DPWE voorzieningsgebieden en hun groeikarakteristieken. KWR, KWR 2016.073. Nieuwegein.
5. van Bel N, van der Wielen P, Wullings B, van Rijn J, van der Mark E, Ketelaars H, Hijnen W. 2021. *Aeromonas* Species from Nonchlorinated Distribution Systems and Their Competitive Planktonic Growth in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* 87:e02867-02820.
6. Blokker EJM, Beverloo H. 2008. De relatie tussen waterkwaliteit en verblijftijden in de vulleiding Son-Vierlingsbeek. Kiwa Water Research KWR 08.031. Nieuwegein.
7. van Bel N. 2018. Vrijkomen van stoffen uit *Asellus* in drinkwater. KWR, KWR 2018.013. Nieuwegein.
8. van Lieverloo JH, 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 Research* 46:4918-4932.
9. Marcus JH, Sutcliffe DW, Willoughby LG. 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.
10. Graca MA, Maltby L, Calow P. 1993. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* I: feeding strategies. *Oecologia* 93:139-144.
11. Graca MA, Maltby L, Calow P. 1993. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* : II. Effects on growth, reproduction and physiology. *Oecologia* 96:304-309.
12. Aberle N, Hillebrand H, Grey J, Wiltshire KH. 2005. Selectivity and competitive interactions between two benthic invertebrate grazers (*Asellus aquaticus* and *Potamopyrgus antipodarum*): an experimental study using ¹³C- and ¹⁵N-labelled diatoms. *Freshwater Biology* 50:369-379.
13. van Bel N, Verschoor AM. 2019. Literatuurstudie groei en overleving van waterpissebedden in het milieu, op water en sediment uit het distributiegebied. KWR, BTO 2018.105. Nieuwegein.
14. Green DWJ, Williams KA, Pascoe D. 1986. The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 15:465-471.
15. Hasu T, Jokela J, Valtonen ET. 2008. Effects of growth factors and water source on laboratory cultures of a northern *Asellus aquaticus* (Isopoda) population. *Aquatic Ecology* 42:141-150.
16. de Nicola Giudici M, Migliore L, Guarino SM. 1987. Sensitivity of *Asellus aquaticus* (L.) and *Proasellus coxalis* Dollf. (Crustacea, Isopoda) to Copper. *Hydrobiologia* 146:63-69.
17. 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.
18. Kaplan EL, Meier P. 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 53:457-481.
19. Cox DR. 1972. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 34:187-220.
20. Learbuch K, Wullings B. 2018. Indicator voor biofilm in het drinkwater- distributiesysteem. KWR, BTO 2018.011. Nieuwegein.
21. Bloor MC. 2010. Animal standardisation for mixed species ecotoxicological studies: Establishing a laboratory breeding programme for *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Zoologica Baetica* 21:179-190.
22. Rossi L, Vitagliano-Tadini G. 1978. Role of Adult Faeces in the Nutrition of Larvae of *Asellus aquaticus* (Isopoda). *Oikos* 30:109-113.
23. Christensen SC, Nissen E, Arvin E, Albrechtsen HJ. 2011. Distribution of *Asellus aquaticus* and microinvertebrates in a non-chlorinated drinking water supply system - Effects of pipe material and sedimentation. *Water Research* 45:3215-3224.

I Bijlage. Cox Proportional Hazards Modellen

In deze bijlage zijn de resultaten van alle Cox Proportional Hazard modellen gegeven:

- Regressie coëfficiënt: een positieve waarde betekent dat het risico op overlijden hoger is.
- Hazard Ratio: ook wel exponentiële regressie coëfficiënt genoemd. Het risico op overlijden is een factor 'hazard ratio' hoger dan de controlegroep.
- z: Wald statistic value
- $\Pr(>|z|)$: p-waarde
- lower/upper 0,95: 95% betrouwbaarheidsinterval

Indien de verschillende condities met elkaar worden vergeleken, moet rekening gehouden worden met de comparisonwise error, en niet alleen de experimentwise error.

I.1 Cox Proportional Hazards Model versus Water_KRL_2019

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	$\Pr(> z)$	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	0,107	1,113	0,555	0,57877	0,762	1,626
3. Blad_2019	-1,498	0,224	-7,419	1,18E-13	0,151	0,332
4. Sed_KRL_2019	2,004	7,417	9,885	< 2,00E-16	4,985	11,035
5. Sed_BRA_2019	-3,050	0,047	-11,071	< 2,00E-16	0,028	0,081
6. Water_KWR_2020	0,344	1,411	1,778	0,07542	0,965	2,062
7. Blad_2020	-1,432	0,239	-7,114	1,13E-12	0,161	0,354
8. Sed_KRL_2020	-1,617	0,199	-7,532	5,00E-14	0,130	0,302
9. Sed_BRA_2020	-2,562	0,077	-10,471	< 2,00E-16	0,048	0,125
10. HF_KRL_2020	0,802	2,229	4,081	4,49E-05	1,517	3,276
11. HF_BRA_2020	0,673	1,960	3,436	0,00059	1,335	2,877
12. Filcom_zand_2020	-1,377	0,252	-5,034	4,81E-07	0,148	0,431
13. Blanco_2021	0,501	1,650	2,573	0,01007	1,127	2,417
14. Blad_2021	-1,165	0,312	-5,859	4,64E-09	0,211	0,461
15. Biof_BRA_2021	-0,485	0,615	-2,509	0,01209	0,421	0,899
16. Biof_KRL_2021	-0,398	0,672	-2,060	0,03940	0,460	0,981
17. Blanco_2021(2)	-0,055	0,947	-0,204	0,83853	0,559	1,603
18. Blad_2021(2)	-0,603	0,547	-1,813	0,06989	0,285	1,050
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-0,908	0,403	-2,510	0,01207	0,199	0,820
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	0,979	2,661	4,001	6,31E-05	1,647	4,297

I.II Cox Proportional Hazards Model versus Water_BRA_2019

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_KRL_2019	-0,107	0,898	-0,555	0,57877	0,615	1,312
3. Blad_2019	-1,605	0,201	-7,800	0,00000	0,134	0,301
4. Sed_KRL_2019	1,896	6,662	9,418	< 2,00E-16	4,490	9,886
5. Sed_BRA_2019	-3,157	0,043	-11,333	< 2,00E-16	0,025	0,073
6. Water_KWR_2020	0,237	1,267	1,229	0,21899	0,869	1,849
7. Blad_2020	-1,540	0,214	-7,493	0,00000	0,143	0,321
8. Sed_KRL_2020	-1,724	0,178	-7,904	0,00000	0,116	0,273
9. Sed_BRA_2020	-2,670	0,069	-10,757	< 2,00E-16	0,043	0,113
10. HF_KRL_2020	0,694	2,002	3,567	0,00036	1,367	2,932
11. HF_BRA_2020	0,566	1,761	2,914	0,00357	1,203	2,576
12. Filcom_zand_2020	-1,484	0,227	-5,426	0,00000	0,133	0,387
13. Blanco_2021	0,394	1,482	2,038	0,04159	1,015	2,165
14. Blad_2021	-1,272	0,280	-6,280	0,00000	0,188	0,417
15. Biof_BRA_2021	-0,593	0,553	-3,034	0,00241	0,377	0,811
16. Biof_KRL_2021	-0,505	0,603	-2,591	0,00957	0,412	0,884
17. Blanco_2021(2)	-0,162	0,850	-0,606	0,54476	0,503	1,437
18. Blad_2021(2)	-0,710	0,492	-2,141	0,03230	0,257	0,942
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-1,015	0,362	-2,813	0,00491	0,179	0,735
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	0,871	2,390	3,579	0,00035	1,483	3,851

I.III Cox Proportional Hazards Model versus Blad_2019

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	1,605	4,979	7,800	6,18E-15	3,326	7,452
3. Water_KRL_2019	1,498	4,472	7,419	1,18E-13	3,011	6,643
4. Sed_KRL_2019	3,502	33,170	16,066	< 2,00E-16	21,638	50,847
5. Sed_BRA_2019	-1,552	0,212	-5,834	5,4E-09	0,126	0,357
6. Water_KWR_2020	1,842	6,310	8,921	< 2,00E-16	4,210	9,458
7. Blad_2020	0,066	1,068	0,337	0,73602	0,729	1,565
8. Sed_KRL_2020	-0,119	0,888	-0,575	0,56532	0,592	1,332
9. Sed_BRA_2020	-1,064	0,345	-4,541	5,61E-06	0,218	0,546
10. HF_KRL_2020	2,300	9,969	10,866	< 2,00E-16	6,584	15,093
11. HF_BRA_2020	2,171	8,766	10,302	< 2,00E-16	5,800	13,248
12. Filcom_zand_2020	0,121	1,129	0,429	0,66785	0,650	1,960
13. Blanco_2021	1,999	7,381	9,571	< 2,00E-16	4,902	11,114

14. Blad_2021	0,333	1,395	1,710	0,08735	0,952	2,043
15. Biof_BRA_2021	1,012	2,752	5,090	3,58E-07	1,864	4,064
16. Biof_KRL_2021	1,100	3,003	5,500	3,79E-08	2,030	4,444
17. Blanco_2021(2)	1,443	4,234	5,173	2,31E-07	2,451	7,315
18. Blad_2021(2)	0,895	2,447	2,626	0,00864	1,255	4,773
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	0,590	1,804	1,598	0,11002	0,875	3,720
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	2,477	11,899	9,657	< 2,00E-16	7,198	19,670

I.IV Cox Proportional Hazards Model versus Sed_KRL_2019

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	-1,896	0,150	-9,418	< 2,00E-16	0,101	0,223
3. Blad_2019	-3,502	0,030	-16,066	< 2,00E-16	0,020	0,046
4. Water_KRL_2019	-2,004	0,135	-9,885	< 2,00E-16	0,091	0,201
5. Sed_BRA_2019	-5,053	0,006	-17,565	< 2,00E-16	0,004	0,011
6. Water_KWR_2020	-1,659	0,190	-8,298	< 2,00E-16	0,129	0,282
7. Blad_2020	-3,436	0,032	-15,788	< 2,00E-16	0,021	0,049
8. Sed_KRL_2020	-3,621	0,027	-15,781	< 2,00E-16	0,017	0,042
9. Sed_BRA_2020	-4,566	0,010	-17,673	< 2,00E-16	0,006	0,017
10. HF_KRL_2020	-1,202	0,301	-6,078	1,22E-09	0,204	0,443
11. HF_BRA_2020	-1,331	0,264	-6,706	2,01E-11	0,179	0,390
12. Filcom_zand_2020	-3,381	0,034	-11,997	< 2,00E-16	0,020	0,059
13. Blanco_2021	-1,503	0,223	-7,550	4,36E-14	0,151	0,329
14. Blad_2021	-3,169	0,042	-14,763	< 2,00E-16	0,028	0,064
15. Biof_BRA_2021	-2,489	0,083	-12,032	< 2,00E-16	0,055	0,124
16. Biof_KRL_2021	-2,402	0,091	-11,641	< 2,00E-16	0,060	0,136
17. Blanco_2021(2)	-2,059	0,128	-7,525	5,28E-14	0,075	0,218
18. Blad_2021(2)	-2,607	0,074	-7,742	9,80E-15	0,038	0,143
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-2,912	0,054	-7,966	1,64E-15	0,027	0,111
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	-1,025	0,359	-4,181	2,90E-05	0,222	0,580

I.V Cox Proportional Hazards Model versus Sed_BRA_2019

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	3,157	23,498	11,333	< 2,00E-16	13,612	40,564
3. Blad_2019	1,552	4,720	5,834	5,40E-09	2,802	7,948
4. Sed_KRL_2019	5,053	156,546	17,565	< 2,00E-16	89,075	275,122
5. Water_KRL_2019	3,050	21,106	11,071	< 2,00E-16	12,301	36,213

6. Water_KWR_2020	3,394	29,781	12,162	< 2,00E-16	17,235	51,460
7. Blad_2020	1,617	5,040	6,089	1,14E-09	2,995	8,483
8. Sed_KRL_2020	1,433	4,190	5,276	1,32E-07	2,461	7,135
9. Sed_BRA_2020	0,487	1,628	1,676	0,09370	0,921	2,878
10. HF_KRL_2020	3,851	47,047	13,612	< 2,00E-16	27,021	81,915
11. HF_BRA_2020	3,723	41,370	13,187	< 2,00E-16	23,791	71,939
12. Filcom_zand_2020	1,673	5,326	4,938	7,88E-07	2,742	10,344
13. Blanco_2021	3,551	34,834	12,641	< 2,00E-16	20,087	60,409
14. Blad_2021	1,885	6,584	7,078	1,47E-12	3,907	11,095
15. Biof_BRA_2021	2,564	12,989	9,400	< 2,00E-16	7,610	22,169
16. Biof_KRL_2021	2,651	14,174	9,683	< 2,00E-16	8,287	24,242
17. Blanco_2021(2)	2,995	19,981	8,904	< 2,00E-16	10,335	38,629
18. Blad_2021(2)	2,447	11,550	6,287	3,23E-10	5,387	24,763
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	2,142	8,514	5,170	2,34E-07	3,780	19,177
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	4,028	56,158	12,672	< 2,00E-16	30,119	104,709

I.VI Cox Proportional Hazards Model versus Water_KWR_2020

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	-0,237	0,789	-1,229	0,21899	0,541	1,151
3. Blad_2019	-1,842	0,158	-8,921	< 2,00E-16	0,106	0,238
4. Sed_KRL_2019	1,659	5,257	8,298	< 2,00E-16	3,552	7,779
5. Sed_BRA_2019	-3,394	0,034	-12,162	< 2,00E-16	0,019	0,058
6. Water_KRL_2020	-0,344	0,709	-1,778	0,07542	0,485	1,036
7. Blad_2020	-1,776	0,169	-8,619	< 2,00E-16	0,113	0,253
8. Sed_KRL_2020	-1,961	0,141	-8,965	< 2,00E-16	0,092	0,216
9. Sed_BRA_2020	-2,907	0,055	-11,686	< 2,00E-16	0,034	0,089
10. HF_KRL_2020	0,457	1,580	2,362	0,01816	1,081	2,309
11. HF_BRA_2020	0,329	1,389	1,700	0,08914	0,951	2,029
12. Filcom_zand_2020	-1,721	0,179	-6,271	3,58E-10	0,104	0,306
13. Blanco_2021	0,157	1,170	0,813	0,41641	0,802	1,707
14. Blad_2021	-1,509	0,221	-7,427	1,11E-13	0,148	0,329
15. Biof_BRA_2021	-0,830	0,436	-4,233	0,00002	0,297	0,640
16. Biof_KRL_2021	-0,742	0,476	-3,795	0,00015	0,324	0,698
17. Blanco_2021(2)	-0,399	0,671	-1,490	0,13613	0,397	1,134
18. Blad_2021(2)	-0,947	0,388	-2,853	0,00432	0,202	0,743
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-1,252	0,286	-3,468	0,00052	0,141	0,580
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	0,634	1,886	2,610	0,00905	1,171	3,036

I.VII Cox Proportional Hazards Model versus Blad_2020

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	1,540	4,662	7,493	6,75E-14	3,117	6,974
3. Blad_2019	-0,066	0,936	-0,337	0,73600	0,639	1,372
4. Sed_KRL_2019	3,436	31,061	15,788	< 2,00E-16	20,275	47,584
5. Sed_BRA_2019	-1,617	0,198	-6,089	1,14E-09	0,118	0,334
6. Water_KWR_2020	1,776	5,909	8,619	< 2,00E-16	3,945	8,850
7. Water_KRL_2019	1,432	4,188	7,114	1,13E-12	2,822	6,214
8. Sed_KRL_2020	-0,185	0,831	-0,896	0,37010	0,555	1,245
9. Sed_BRA_2020	-1,130	0,323	-4,837	1,32E-06	0,204	0,511
10. HF_KRL_2020	2,234	9,335	10,571	< 2,00E-16	6,169	14,125
11. HF_BRA_2020	2,105	8,208	10,003	< 2,00E-16	5,434	12,399
12. Filcom_zand_2020	0,055	1,057	0,196	0,84470	0,608	1,835
13. Blanco_2021	1,933	6,912	9,268	< 2,00E-16	4,592	10,403
14. Blad_2021	0,267	1,306	1,385	0,16600	0,895	1,907
15. Biof_BRA_2021	0,947	2,577	4,783	1,73E-06	1,749	3,798
16. Biof_KRL_2021	1,034	2,812	5,193	2,07E-07	1,904	4,155
17. Blanco_2021(2)	1,377	3,965	4,940	7,82E-07	2,295	6,848
18. Blad_2021(2)	0,829	2,292	2,434	0,01490	1,175	4,468
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	0,524	1,689	1,421	0,15540	0,820	3,483
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	2,411	11,142	9,409	< 2,00E-16	6,743	18,411

I.VIII Cox Proportional Hazards Model versus Blad_2020

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	1,724	5,608	7,904	2,70E-15	3,657	8,600
3. Blad_2019	0,119	1,126	0,575	0,56532	0,751	1,690
4. Sed_KRL_2019	3,621	37,361	15,781	< 2,00E-16	23,830	58,575
5. Sed_BRA_2019	-1,433	0,239	-5,276	1,32E-07	0,140	0,406
6. Water_KWR_2020	1,961	7,108	8,965	< 2,00E-16	4,629	10,912
7. Blad_2020	0,185	1,203	0,896	0,37014	0,803	1,801
8. Water_KRL_2019	1,617	5,037	7,532	5,00E-14	3,307	7,672
9. Sed_BRA_2020	-0,945	0,389	-3,923	8,74E-05	0,242	0,623
10. HF_KRL_2020	2,418	11,228	10,823	< 2,00E-16	7,246	17,399
11. HF_BRA_2020	2,290	9,873	10,285	< 2,00E-16	6,382	15,275
12. Filcom_zand_2020	0,240	1,271	0,824	0,40984	0,719	2,249
13. Blanco_2021	2,118	8,314	9,587	< 2,00E-16	5,392	12,818

14. Blad_2021	0,452	1,571	2,191	0,02849	1,049	2,354
15. Biof_BRA_2021	1,131	3,100	5,341	9,22E-08	2,047	4,695
16. Biof_KRL_2021	1,219	3,383	5,724	1,04E-08	2,229	5,134
17. Blanco_2021(2)	1,562	4,769	5,421	5,93E-08	2,711	8,388
18. Blad_2021(2)	1,014	2,756	2,911	0,00361	1,393	5,456
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	0,709	2,032	1,885	0,05947	0,972	4,248
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	2,595	13,403	9,745	< 2,00E-16	7,952	22,589

I.IX Cox Proportional Hazards Model versus Sed_BRA_2020

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	2,670	14,435	10,757	< 2,00E-16	8,875	23,477
3. Blad_2019	1,064	2,899	4,541	5,61E-06	1,831	4,590
4. Sed_KRL_2019	4,566	96,165	17,673	< 2,00E-16	57,955	159,566
5. Sed_BRA_2019	-0,487	0,614	-1,676	0,09374	0,348	1,086
6. Water_KWR_2020	2,907	18,294	11,686	< 2,00E-16	11,236	29,787
7. Blad_2020	1,130	3,096	4,837	1,32E-06	1,958	4,894
8. Sed_KRL_2020	0,945	2,574	3,923	8,74E-05	1,605	4,128
9. Water_KRL_2019	2,562	12,965	10,471	< 2,00E-16	8,026	20,945
10. HF_KRL_2020	3,364	28,901	13,292	< 2,00E-16	17,600	47,459
11. HF_BRA_2020	3,235	25,413	12,821	< 2,00E-16	15,498	41,673
12. Filcom_zand_2020	1,185	3,272	3,773	0,00016	1,768	6,056
13. Blanco_2021	3,063	21,399	12,216	< 2,00E-16	13,090	34,982
14. Blad_2021	1,397	4,044	5,958	2,55E-09	2,554	6,404
15. Biof_BRA_2021	2,077	7,979	8,592	< 2,00E-16	4,968	12,814
16. Biof_KRL_2021	2,164	8,707	8,910	< 2,00E-16	5,409	14,016
17. Blanco_2021(2)	2,508	12,274	8,046	8,53E-16	6,664	22,608
18. Blad_2021(2)	1,959	7,095	5,324	1,01E-07	3,449	14,594
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	1,655	5,230	4,194	2,74E-05	2,414	11,332
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	3,541	34,497	12,143	< 2,00E-16	19,479	61,094

I.X Cox Proportional Hazards Model versus HF_KRL_2020

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	-0,694	0,499	-3,567	0,00036	0,341	0,731
3. Blad_2019	-2,299	0,100	-10,866	< 2,00E-16	0,066	0,152
4. Sed_KRL_2019	1,202	3,327	6,078	1,22E-09	2,258	4,903
5. Sed_BRA_2019	-3,851	0,021	-13,612	< 2,00E-16	0,012	0,037

6. Water_KWR_2020	-0,457	0,633	-2,362	0,01816	0,433	0,925
7. Blad_2020	-2,234	0,107	-10,571	< 2,00E-16	0,071	0,162
8. Sed_KRL_2020	-2,418	0,089	-10,823	< 2,00E-16	0,057	0,138
9. Sed_BRA_2020	-3,364	0,035	-13,292	< 2,00E-16	0,021	0,057
10. Water_KRL_2019	-0,802	0,449	-4,081	4,49E-05	0,305	0,659
11. HF_BRA_2020	-0,129	0,879	-0,667	0,504467	0,603	1,283
12. Filcom_zand_2020	-2,179	0,113	-7,867	3,63E-15	0,066	0,195
13. Blanco_2021	-0,301	0,740	-1,554	0,12007	0,507	1,082
14. Blad_2021	-1,967	0,140	-9,441	< 2,00E-16	0,093	0,211
15. Biof_BRA_2021	-1,287	0,276	-6,427	1,30E-10	0,186	0,409
16. Biof_KRL_2021	-1,200	0,301	-6,005	1,91E-09	0,204	0,446
17. Blanco_2021(2)	-0,856	0,425	-3,187	0,00144	0,251	0,719
18. Blad_2021(2)	-1,405	0,245	-4,220	2,45E-05	0,128	0,471
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-1,709	0,181	-4,724	2,31E-06	0,089	0,368
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	0,177	1,194	0,729	0,46600	0,742	1,921

I.XI Cox Proportional Hazards Model versus HF_BRA_2020

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	-0,566	0,568	-2,914	0,00357	0,388	0,831
3. Blad_2019	-2,171	0,114	-10,302	< 2,00E-16	0,075	0,172
4. Sed_KRL_2019	1,331	3,784	6,706	2,01E-11	2,565	5,583
5. Sed_BRA_2019	-3,723	0,024	-13,187	< 2,00E-16	0,014	0,042
6. Water_KWR_2020	-0,329	0,720	-1,700	0,08914	0,493	1,052
7. Blad_2020	-2,105	0,122	-10,003	< 2,00E-16	0,081	0,184
8. Sed_KRL_2020	-2,290	0,101	-10,285	< 2,00E-16	0,065	0,157
9. Sed_BRA_2020	-3,235	0,039	-12,821	< 2,00E-16	0,024	0,065
10. HF_KRL_2020	0,129	1,137	0,667	0,50447	0,780	1,659
11. Water_KRL_2019	-0,673	0,510	-3,436	0,00059	0,348	0,749
12. Filcom_zand_2020	-2,050	0,129	-7,422	1,15E-13	0,075	0,221
13. Blanco_2021	-0,172	0,842	-0,890	0,37369	0,576	1,230
14. Blad_2021	-1,838	0,159	-8,860	< 2,00E-16	0,106	0,239
15. Biof_BRA_2021	-1,158	0,314	-5,809	6,30E-09	0,212	0,464
16. Biof_KRL_2021	-1,071	0,343	-5,382	7,38E-08	0,232	0,506
17. Blanco_2021(2)	-0,728	0,483	-2,714	0,00665	0,286	0,817
18. Blad_2021(2)	-1,276	0,279	-3,839	0,00012	0,146	0,536
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-1,581	0,206	-4,374	0,00001	0,101	0,418
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	0,306	1,357	1,259	0,20798	0,844	2,184

I.XII Cox Proportional Hazards Model versus Filcom_zand_2020

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	1,484	4,412	5,426	5,78E-08	2,581	7,542
3. Blad_2019	-0,121	0,886	-0,429	0,66785	0,510	1,539
4. Sed_KRL_2019	3,381	29,393	11,997	< 2,00E-16	16,919	51,063
5. Sed_BRA_2019	-1,673	0,188	-4,938	7,88E-07	0,097	0,365
6. Water_KWR_2020	1,721	5,592	6,271	3,58E-10	3,265	9,576
7. Blad_2020	-0,055	0,946	-0,196	0,84466	0,545	1,644
8. Sed_KRL_2020	-0,240	0,787	-0,824	0,40984	0,445	1,392
9. Sed_BRA_2020	-1,185	0,306	-3,773	0,00016	0,165	0,566
10. HF_KRL_2020	2,179	8,834	7,867	3,63E-15	5,134	15,200
11. HF_BRA_2020	2,050	7,768	7,422	1,15E-13	4,521	13,347
12. Water_KRL_2019	1,377	3,963	5,034	4,81E-07	2,318	6,774
13. Blanco_2021	1,878	6,540	6,832	8,38E-12	3,816	11,210
14. Blad_2021	0,212	1,236	0,758	0,44828	0,715	2,138
15. Biof_BRA_2021	0,891	2,439	3,247	0,00117	1,424	4,177
16. Biof_KRL_2021	0,979	2,661	3,567	0,00036	1,554	4,557
17. Blanco_2021(2)	1,322	3,752	3,993	0,00007	1,961	7,179
18. Blad_2021(2)	0,774	2,169	2,013	0,04415	1,020	4,608
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	0,469	1,599	1,144	0,25251	0,716	3,571
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	2,356	10,544	7,539	4,72E-14	5,716	19,452

I.XIII Cox Proportional Hazards Model versus Blanco_2021

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	-0,394	0,675	-2,038	0,04159	0,462	0,985
3. Blad_2019	-1,999	0,135	-9,571	< 2,00E-16	0,090	0,204
4. Sed_KRL_2019	1,503	4,494	7,550	4,36E-14	3,042	6,638
5. Sed_BRA_2019	-3,551	0,029	-12,641	< 2,00E-16	0,017	0,050
6. Water_KWR_2020	-0,157	0,855	-0,813	0,41641	0,586	1,248
7. Blad_2020	-1,933	0,145	-9,268	< 2,00E-16	0,096	0,218
8. Sed_KRL_2020	-2,118	0,120	-9,587	< 2,00E-16	0,078	0,185
9. Sed_BRA_2020	-3,063	0,047	-12,216	< 2,00E-16	0,029	0,076
10. HF_KRL_2020	0,301	1,351	1,554	0,12007	0,925	1,973
11. HF_BRA_2020	0,172	1,188	0,890	0,37369	0,813	1,735
12. Filcom_zand_2020	-1,878	0,153	-6,832	8,38E-12	0,089	0,262
13. Water_KRL_2019	-0,501	0,606	-2,573	0,01007	0,414	0,887
14. Blad_2021	-1,666	0,189	-8,104	5,32E-16	0,126	0,283

15. Biof_BRA_2021	-0,987	0,373	-4,992	5,97E-07	0,253	0,549
16. Biof_KRL_2021	-0,899	0,407	-4,559	0,00001	0,276	0,599
17. Blanco_2021(2)	-0,556	0,574	-2,075	0,03794	0,339	0,970
18. Blad_2021(2)	-1,104	0,332	-3,325	0,00089	0,173	0,636
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-1,409	0,244	-3,902	0,00010	0,120	0,496
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	0,478	1,612	1,968	0,04912	1,002	2,594

I.XIV Cox Proportional Hazards Model versus Blad_2021

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	1,272	3,569	6,280	3,38E-10	2,399	5,309
3. Blad_2019	-0,333	0,717	-1,710	0,08735	0,489	1,050
4. Sed_KRL_2019	3,169	23,777	14,763	< 2,00E-16	15,612	36,213
5. Sed_BRA_2019	-1,885	0,152	-7,078	1,47E-12	0,090	0,256
6. Water_KWR_2020	1,509	4,523	7,427	1,11E-13	3,037	6,737
7. Blad_2020	-0,267	0,766	-1,385	0,16603	0,524	1,117
8. Sed_KRL_2020	-0,452	0,636	-2,191	0,02849	0,425	0,954
9. Sed_BRA_2020	-1,397	0,247	-5,958	2,55E-09	0,156	0,392
10. HF_KRL_2020	1,967	7,146	9,441	< 2,00E-16	4,751	10,749
11. HF_BRA_2020	1,838	6,284	8,860	< 2,00E-16	4,184	9,436
12. Filcom_zand_2020	-0,212	0,809	-0,758	0,44828	0,468	1,399
13. Blanco_2021	1,666	5,291	8,104	5,32E-16	3,536	7,916
14. Water_KRL_2019	1,165	3,206	5,859	4,64E-09	2,171	4,733
15. Biof_BRA_2021	0,679	1,973	3,470	0,00052	1,344	2,896
16. Biof_KRL_2021	0,767	2,153	3,898	9,70E-05	1,464	3,166
17. Blanco_2021(2)	1,110	3,035	4,013	5,98E-05	1,765	5,219
18. Blad_2021(2)	0,562	1,754	1,659	0,09720	0,903	3,408
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	0,257	1,293	0,700	0,48406	0,629	2,657
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	2,144	8,530	8,447	< 2,00E-16	5,187	14,026

I.XV Cox Proportional Hazards Model versus Biof_BRA_2021

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	0,593	1,809	3,034	0,00241	1,234	2,653
3. Blad_2019	-1,012	0,363	-5,090	3,58E-07	0,246	0,537
4. Sed_KRL_2019	2,489	12,053	12,032	< 2,00E-16	8,035	18,079
5. Sed_BRA_2019	-2,564	0,077	-9,400	< 2,00E-16	0,045	0,131
6. Water_KWR_2020	0,830	2,293	4,233	0,00002	1,561	3,367

7. Blad_2020	-0,947	0,388	-4,783	1,73E-06	0,263	0,572
8. Sed_KRL_2020	-1,131	0,323	-5,341	9,22E-08	0,213	0,489
9. Sed_BRA_2020	-2,077	0,125	-8,592	< 2,00E-16	0,078	0,201
10. HF_KRL_2020	1,287	3,622	6,427	1,30E-10	2,446	5,363
11. HF_BRA_2020	1,158	3,185	5,809	6,30E-09	2,155	4,709
12. Filcom_zand_2020	-0,891	0,410	-3,247	0,00117	0,239	0,702
13. Blanco_2021	0,987	2,682	4,992	5,97E-07	1,821	3,951
14. Blad_2021	-0,679	0,507	-3,470	0,00052	0,345	0,744
15. Water_KRL_2019	0,485	1,625	2,509	0,01209	1,112	2,374
16. Biof_KRL_2021	0,087	1,091	0,453	0,65030	0,748	1,592
17. Blanco_2021(2)	0,431	1,538	1,591	0,11164	0,905	2,615
18. Blad_2021(2)	-0,117	0,889	-0,351	0,72527	0,462	1,712
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-0,422	0,656	-1,163	0,24476	0,322	1,336
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	1,464	4,324	5,920	3,22E-09	2,663	7,021

I.XVI Cox Proportional Hazards Model versus Biof_KRL_2021

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	0,505	1,658	2,591	0,00957	1,131	2,430
3. Blad_2019	-1,100	0,333	-5,500	3,79E-08	0,225	0,493
4. Sed_KRL_2019	2,402	11,045	11,641	< 2,00E-16	7,371	16,549
5. Sed_BRA_2019	-2,651	0,071	-9,683	< 2,00E-16	0,041	0,121
6. Water_KWR_2020	0,742	2,101	3,795	0,00015	1,432	3,083
7. Blad_2020	-1,034	0,356	-5,193	2,07E-07	0,241	0,525
8. Sed_KRL_2020	-1,219	0,296	-5,724	1,04E-08	0,195	0,449
9. Sed_BRA_2020	-2,164	0,115	-8,910	< 2,00E-16	0,071	0,185
10. HF_KRL_2020	1,200	3,319	6,005	1,91E-09	2,244	4,910
11. HF_BRA_2020	1,071	2,919	5,382	7,38E-08	1,976	4,311
12. Filcom_zand_2020	-0,979	0,376	-3,567	0,00036	0,219	0,643
13. Blanco_2021	0,899	2,458	4,559	5,15E-06	1,670	3,618
14. Blad_2021	-0,767	0,465	-3,898	9,70E-05	0,316	0,683
15. Biof_BRA_2021	-0,087	0,916	-0,453	0,65030	0,628	1,337
16. Water_KRL_2019	0,398	1,489	2,060	0,03940	1,020	2,175
17. Blanco_2021(2)	0,343	1,410	1,269	0,20442	0,829	2,396
18. Blad_2021(2)	-0,205	0,815	-0,613	0,53984	0,423	1,568
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-0,510	0,601	-1,404	0,16026	0,295	1,224
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	1,377	3,962	5,574	2,49E-08	2,442	6,429

I.XVII Cox Proportional Hazards Model versus Blanco_2021(2)

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	0,162	1,176	0,606	0,54476	0,696	1,987
3. Blad_2019	-1,443	0,236	-5,173	2,31E-07	0,137	0,408
4. Sed_KRL_2019	2,059	7,835	7,525	5,28E-14	4,583	13,393
5. Sed_BRA_2019	-2,995	0,050	-8,904	< 2,00E-16	0,026	0,097
6. Water_KWR_2020	0,399	1,490	1,490	0,13613	0,882	2,519
7. Blad_2020	-1,377	0,252	-4,940	7,82E-07	0,146	0,436
8. Sed_KRL_2020	-1,562	0,210	-5,421	5,93E-08	0,119	0,369
9. Sed_BRA_2020	-2,508	0,081	-8,046	8,53E-16	0,044	0,150
10. HF_KRL_2020	0,856	2,355	3,187	0,00144	1,391	3,987
11. HF_BRA_2020	0,728	2,070	2,714	0,00665	1,224	3,502
12. Filcom_zand_2020	-1,322	0,267	-3,993	0,00007	0,139	0,510
13. Blanco_2021	0,556	1,743	2,075	0,03794	1,031	2,947
14. Blad_2021	-1,110	0,330	-4,013	0,00006	0,192	0,567
15. Biof_BRA_2021	-0,431	0,650	-1,591	0,11164	0,382	1,105
16. Biof_KRL_2021	-0,343	0,709	-1,269	0,20442	0,417	1,206
17. Water_KRL_2019	0,055	1,056	0,204	0,83853	0,624	1,789
18. Blad_2021(2)	-0,548	0,578	-1,447	0,14802	0,275	1,215
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-0,853	0,426	-2,108	0,03504	0,193	0,942
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	1,033	2,811	3,386	0,00071	1,545	5,112

I.XVIII Cox Proportional Hazards Model versus Blad_2021(2)

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	0,710	2,035	2,141	0,03230	1,062	3,898
3. Blad_2019	-0,895	0,409	-2,626	0,00864	0,210	0,797
4. Sed_KRL_2019	2,607	13,554	7,742	9,80E-15	7,006	26,223
5. Sed_BRA_2019	-2,447	0,087	-6,287	3,23E-10	0,040	0,186
6. Water_KWR_2020	0,947	2,579	2,853	0,00432	1,345	4,942
7. Blad_2020	-0,829	0,436	-2,434	0,01492	0,224	0,851
8. Sed_KRL_2020	-1,014	0,363	-2,911	0,00361	0,183	0,718
9. Sed_BRA_2020	-1,959	0,141	-5,324	1,01E-07	0,069	0,290
10. HF_KRL_2020	1,405	4,074	4,220	2,45E-05	2,121	7,822
11. HF_BRA_2020	1,276	3,582	3,839	0,00012	1,867	6,871
12. Filcom_zand_2020	-0,774	0,461	-2,013	0,04415	0,217	0,980
13. Blanco_2021	1,104	3,016	3,325	0,00089	1,573	5,782

14. Blad_2021	-0,562	0,570	-1,659	0,09720	0,293	1,108
15. Biof_BRA_2021	0,117	1,125	0,351	0,72527	0,584	2,165
16. Biof_KRL_2021	0,205	1,227	0,613	0,53984	0,638	2,362
17. Blanco_2021(2)	0,548	1,730	1,447	0,14802	0,823	3,636
18. Water_KRL_2019	0,603	1,827	1,813	0,06989	0,952	3,507
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-0,305	0,737	-0,678	0,49755	0,305	1,779
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	1,582	4,862	4,360	1,30E-05	2,388	9,899

I.XIX Cox Proportional Hazards Model versus Biof_KRL_kwk_2021(2)

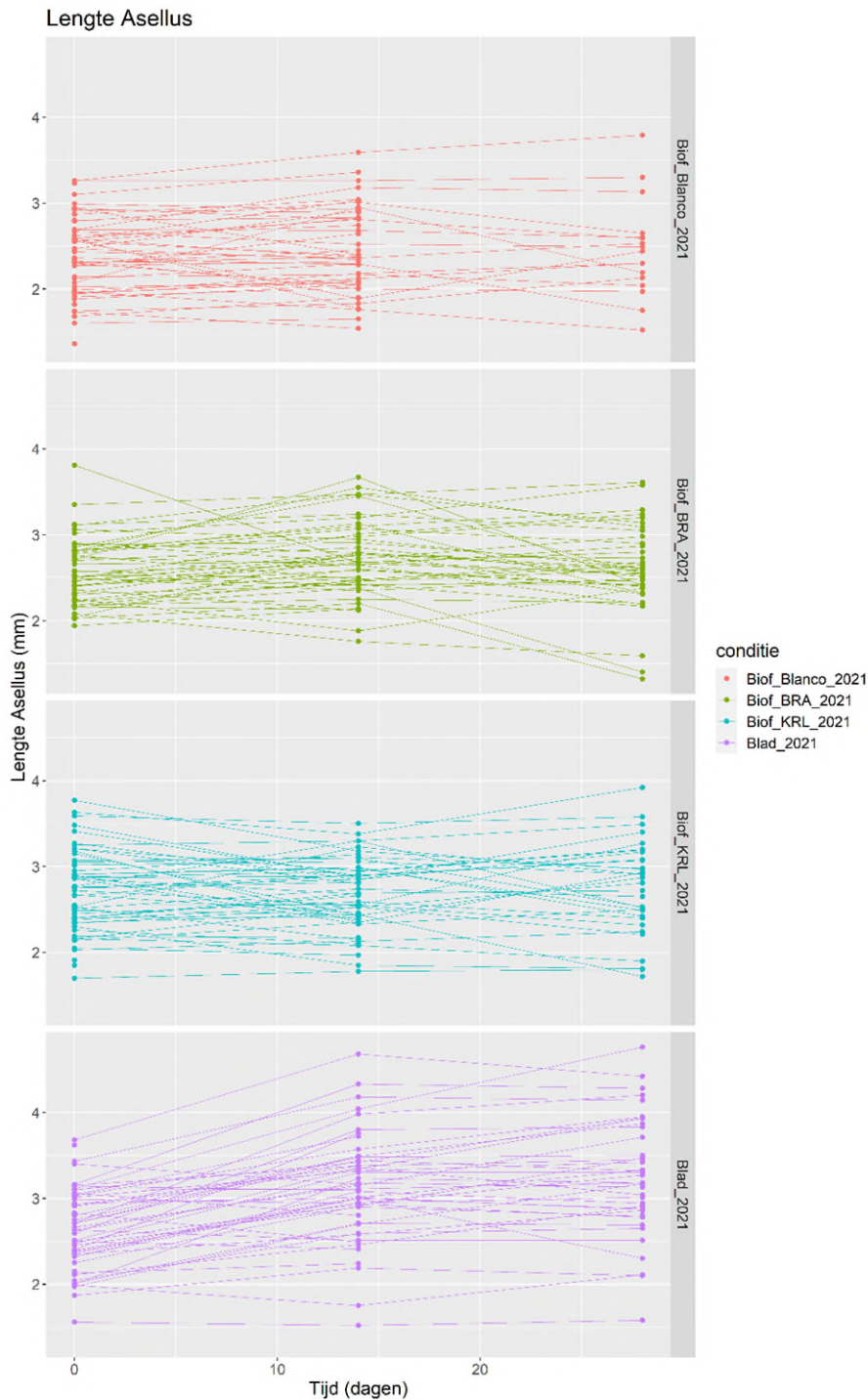
Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	1,015	2,760	2,813	0,00491	1,360	5,598
3. Blad_2019	-0,590	0,554	-1,598	0,11002	0,269	1,143
4. Sed_KRL_2019	2,912	18,386	7,966	1,64E-15	8,982	37,636
5. Sed_BRA_2019	-2,142	0,117	-5,170	2,34E-07	0,052	0,265
6. Water_KWR_2020	1,252	3,498	3,468	0,00052	1,724	7,097
7. Blad_2020	-0,524	0,592	-1,421	0,15543	0,287	1,220
8. Sed_KRL_2020	-0,709	0,492	-1,885	0,05947	0,235	1,029
9. Sed_BRA_2020	-1,655	0,191	-4,194	2,74E-05	0,088	0,414
10. HF_KRL_2020	1,709	5,526	4,724	2,31E-06	2,719	11,230
11. HF_BRA_2020	1,581	4,859	4,374	1,22E-05	2,393	9,866
12. Filcom_zand_2020	-0,469	0,626	-1,144	0,25251	0,280	1,397
13. Blanco_2021	1,409	4,091	3,902	9,56E-05	2,016	8,303
14. Blad_2021	-0,257	0,773	-0,700	0,48406	0,376	1,589
15. Biof_BRA_2021	0,422	1,526	1,163	0,24476	0,749	3,108
16. Biof_KRL_2021	0,510	1,665	1,404	0,16026	0,817	3,391
17. Blanco_2021(2)	0,853	2,347	2,108	0,03504	1,062	5,187
18. Blad_2021(2)	0,305	1,357	0,678	0,49755	0,562	3,273
19. Water_KRL_2019	0,908	2,479	2,510	0,01207	1,220	5,036
20. Biof_KRL_nat_2021(2)	1,886	6,596	4,842	1,28E-06	3,074	14,153

I.XX Cox Proportional Hazards Model versus Biof_KRL_nat_2021(2)

Variabele	Regressie-coëfficiënt	Hazard ratio	z	Pr(> z)	Lower 0,95	Upper 0,95
2. Water_BRA_2019	-0,871	0,418	-3,579	0,00035	0,260	0,674
3. Blad_2019	-2,476	0,084	-9,657	< 2,00E-16	0,051	0,139
4. Sed_KRL_2019	1,025	2,788	4,181	2,90E-05	1,724	4,508
5. Sed_BRA_2019	-4,028	0,018	-12,672	< 2,00E-16	0,010	0,033

6. Water_KWR_2020	-0,634	0,530	-2,610	0,00905	0,329	0,854
7. Blad_2020	-2,411	0,090	-9,409	< 2,00E-16	0,054	0,148
8. Sed_KRL_2020	-2,595	0,075	-9,745	< 2,00E-16	0,044	0,126
9. Sed_BRA_2020	-3,541	0,029	-12,143	< 2,00E-16	0,016	0,051
10. HF_KRL_2020	-0,177	0,838	-0,729	0,46600	0,521	1,348
11. HF_BRA_2020	-0,306	0,737	-1,259	0,20798	0,458	1,185
12. Filcom_zand_2020	-2,356	0,095	-7,539	4,72E-14	0,051	0,175
13. Blanco_2021	-0,478	0,620	-1,968	0,04912	0,385	0,998
14. Blad_2021	-2,144	0,117	-8,447	< 2,00E-16	0,071	0,193
15. Biof_BRA_2021	-1,464	0,231	-5,920	3,22E-09	0,142	0,376
16. Biof_KRL_2021	-1,377	0,252	-5,574	2,49E-08	0,156	0,410
17. Blanco_2021(2)	-1,033	0,356	-3,386	0,00071	0,196	0,647
18. Blad_2021(2)	-1,582	0,206	-4,360	1,30E-05	0,101	0,419
19. Biof_KRL_kwk_2021(2)	-1,886	0,152	-4,842	1,28E-06	0,071	0,325
20. Water_KRL_2019	-0,979	0,376	-4,001	6,31E-05	0,233	0,607

II Groeicurven individuele *Asellussen*



Figuur 18. Groeicurves van *Asellus* in het eerste groei- en overlevingsexperiment op verschillende voedselbronnen in de eerste 4 weken.