

RIVM Briefrapport 607013003/2007

Effectmetingen van geneesmiddelen

Geschiktheid van bioassays voor het meten van antibiotica,
en pilotmetingen van ziekenhuiseffluent

E.J. van den Brandhof
E. van der Grinten

Contact:
Esther van der Grinten
RIVM/MEV/LER
esther.van.der.grinten@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het ministerie van VROM, in het kader van project nummer M/607013/07DA Antibiotica (Bioassays)

VOORWOORD

Dit rapport bevat de verkorte verslaggeving van de beoordeling van de bruikbaarheid en geschiktheid van bioassays om specifieke effecten van antibiotica in het watermilieu te beoordelen.

Tevens wordt verslag gedaan van het pilotonderzoek naar de methodiek om ziekenhuiseffluent te testen met bioassays, waarbij specifiek aandacht is besteed aan logistieke planning en arbotechnische procedures rondom bemonstering.

Voor het bioassay-onderzoek willen we Remko Siers, Gerard Stroomberg, Serge Rotteveel, Marja Wouterse en Erik Steenbergen bedanken voor hun inhoudelijke en praktische bijdragen. De afdeling AEE van de Universiteit van Amsterdam (UvA) wordt bedankt voor het faciliteren van laboratoriumruimte en -materiaal.

Voor het onderzoek naar ziekenhuiseffluent willen wij de medewerkers van het waterschap Hunze en Aa's (André Kamminga en Hilde Politiek), RIZA (Hannie Maas en Serge Rotteveel), UvA (Michiel Kraak, Annelies Veraart) en STOWA (Bert Palsma) bedanken voor hun medewerking en inzet.

INHOUD

SAMENVATTING	4
1 INLEIDING	5
2 GESCHIKTHEID VAN BIOASSAYS VOOR HET METEN VAN ANTIBIOTICAEFFECTEN	6
2.1 Inleiding	6
2.2 Selectie van antibiotica	6
2.3 Methoden	6
2.4 Resultaten	7
2.4.1 PAM-algentest	7
2.4.2 Multibacterietest	7
2.4.3 Microtoxtest	8
2.5 Conclusies en discussie	8
2.6 Aanbevelingen voor verder onderzoek	9
3 PILOT ZIEKENHUISEFFLUENT	11
3.1 Bevindingen monsternamen en behandeling effluenten	11
3.2 Resultaten van bioassays, resistentiebepaling en chemische analyses	11
3.3 Conclusies en aanbevelingen	12
4 LITERATUUR	13

SAMENVATTING

Met bioassays worden door het RIVM in samenwerking met het RIZA al enige tijd effectmetingen verricht naar stoffen in het oppervlaktewater in het kader van monitoring. Eén groep van potentieel gevaarlijke stoffen zijn de geneesmiddelen, en dan in het bijzonder de antibiotica. Antibiotica kunnen namelijk resistentie veroorzaken bij organismen en in drinkwater voorkomen. Dit soort stoffen heeft vaak een specifiek werkingsmechanisme waardoor ook specifieke effecten kunnen optreden.

Vanuit het ministerie van VROM is de vraag gekomen of dit soort specifieke effecten ook met bioassays te meten zijn en zo ja of deze bioassays toe te passen zijn in de huidige monitoringsopzet.

In dit onderzoek is daarom voor een geselecteerd aantal bioassays gekeken of ze geschikt zijn om effecten van antibiotica te kunnen aantonen. De multibacterietoets bleek de meeste potentie te hebben om effecten van antibiotica in oppervlaktewater aan te tonen. Vooral nog lijkt de bioassay Cyano PAMtox (waarbij met behulp van een cyanobacterie de efficiëntie van fotosynthese gemeten kan worden) minder geschikt te zijn. Nader onderzoek naar de extractie-efficiëntie van stoffen (met name antibiotica) wordt aanbevolen als ook een evaluatie van de toepassingsmogelijkheden en knelpunten van deze testmethode binnen het pT-project (potentiële toxiciteit rijkswateren).

Om de bemonstering en opwerkingsmethode te testen op een veldmonster (effluent van een ziekenhuis) werd aangehaakt bij een bemonsteringscampagne van een waterschap. De verwachting was dat effecten van antibiotica bij de bron (ziekenhuis effluent) het hoogst zouden zijn. Het monster werd naast chemische analyses doorgemeten met een aantal bioassays (Microtox, PAM-test, Chydotox, Cyano PAMtox en de multibacterietoets). Met behulp van deze pilot werd ervaring opgegaan met de logistiek van de bemonstering en de inventarisatie van pathogene en virale risico's bij blootstelling aan veldeffluenten. Werkprocedures werden hiervoor geëvalueerd voor vervolgonderzoek.

Er werden in alle bioassays hoge effecten gemeten. In de veldmonsters werd ook resistentie (circa 10% totaal DNA) vastgesteld. Nadere karakterisatie en betekenis van deze resistentie wordt momenteel nog onderzocht.

1 INLEIDING

De oppervlaktewaterkwaliteit wordt in veel gevallen met chemische analyses onderzocht. Het aantal stoffen dat in oppervlaktewater voorkomt is veel groter dan met chemische analyses kan worden aangetoond. Bovendien worden de (combinatie-)effecten op waterorganismen hier niet mee aangetoond. Met de komst van de Kaderrichtlijn Water (KRW) is er een belangrijke verandering in het waterkwaliteitsbeleid gekomen. De chemische kwaliteit staat niet langer voorop, maar de ecologische kwaliteit is leidend geworden.

Een methode om effecten op waterorganismen te kunnen meten is met behulp van bioassays. Binnen het RIVM loopt in samenwerking met het RIZA al geruime tijd het pT-project (Struijs et al., 1995), waarbij Nederlandse Rijkswateren met behulp van bioassays gemonitord worden.

Eén groep van potentieel gevaarlijke stoffen zijn de geneesmiddelen, en in het bijzonder de antibiotica. Antibiotica kunnen namelijk tot resistentie leiden en komen voor in het drinkwater. Dit soort stoffen heeft vaak een specifiek werkingsmechanisme waardoor ook specifieke effecten kunnen optreden. Zij worden zowel via humanitair als veterinair gebruik in het milieu gebracht.

Na een inventariserend literatuuronderzoek in 2005 (van der Grinten, 2005) is nu vanuit het ministerie van VROM de vraag gekomen of dit soort specifieke effecten ook met bioassays te meten zijn en zo ja of deze bioassays toe te passen zijn in de huidige monitoringsopzet. Om deze vraag te kunnen beantwoorden zijn twee onderzoeken uitgevoerd.

In een laboratoriumstudie is een aantal bestaande, maar ook in ontwikkeling zijnde, bioassays getest op de geschiktheid voor het meten van de effecten van antibiotica. Om vast te stellen in welke mate effecten van antibiotica kunnen worden aangetoond, zijn de resultaten met elkaar vergeleken en samengevat in hoofdstuk 2.

Parallel aan dit onderzoek is gekeken naar de methodiek om ziekenhuiseffluent te testen met bioassays. Hierbij ging het niet zozeer om de resultaten van de bioassays, maar om de vraag welke logistieke en arbotechnische procedures gevolgd moeten worden bij het werken met veldeffluenten waarin met bioassays mogelijke effecten van antibiotica kunnen worden aangetoond. De resultaten van dit onderzoek zijn samengevat in hoofdstuk 3.

2 GESCHIKTHEID VAN BIOASSAYS VOOR HET METEN VAN ANTIBIOTICAEFFECTEN

2.1 Inleiding

De huidige testbatterij voor het monitoringonderzoek van Rijkswateren bestaat uit bioassays waarmee niet-specifieke effecten van stoffen gemeten kan worden. Om specifieke effecten van antibiotica te detecteren wordt onderzocht of er bioassays beschikbaar zijn die effecten van antibiotica kunnen aantonen. Daarbij is het relevant dat deze bioassays effecten meten die niet met de huidige bioassays kunnen worden gemeten. Hiervoor is een onderzoek opgezet waarbij de effecten van enkele individuele antibiotica met verschillende bioassays werd onderzocht. Dit onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met een student van de Saxion Hoge school te Deventer. Hieronder volgt een samenvatting van het onderzoek; voor details zie Siers (2007).

2.2 Selectie van antibiotica

Om een representatief beeld te krijgen van de meetbaarheid van de verschillende antibiotica is een selectie gemaakt van zes verschillende antibiotica. Daarbij is rekening gehouden met een evenwichtige verdeling van de verschillende hoofdgroepen antibiotica, het vóórkomen in het oppervlaktewater, randvoorwaarden voor het gebruik van de multibacterietest (RIZA), beschikbare toxiciteitsinformatie, en de stabiliteit en de wateroplosbaarheid van de antibiotica. De geselecteerde antibiotica waren sulfamethoxazol, trimethoprim, flumequine, tylosine, streptomycine en oxytetracycline. Bij dit onderzoek is gekeken naar de effecten van de afzonderlijke antibiotica en niet naar mogelijke combinatie-effecten.

2.3 Methoden

Twee potentiële testen om de effecten van antibiotica te kunnen beoordelen zijn vergeleken met twee testen die al in de huidige testbatterij meedraaien. De potentiële testen zijn de multibacterietest met 96 wells van het RIZA (Stroomberg et. al., 2006) en de PAM-algentest (Beusekom et.al, 1999) met een blauwalg met een blootstellingstijd van 4,5 of 24 uur. De huidige testen zijn de PAM-algentest met de groenalg (*Pseudokirchneriella subcapitata*) (4,5 uur blootstelling) en de microtoxtest (Bulich, 1982).

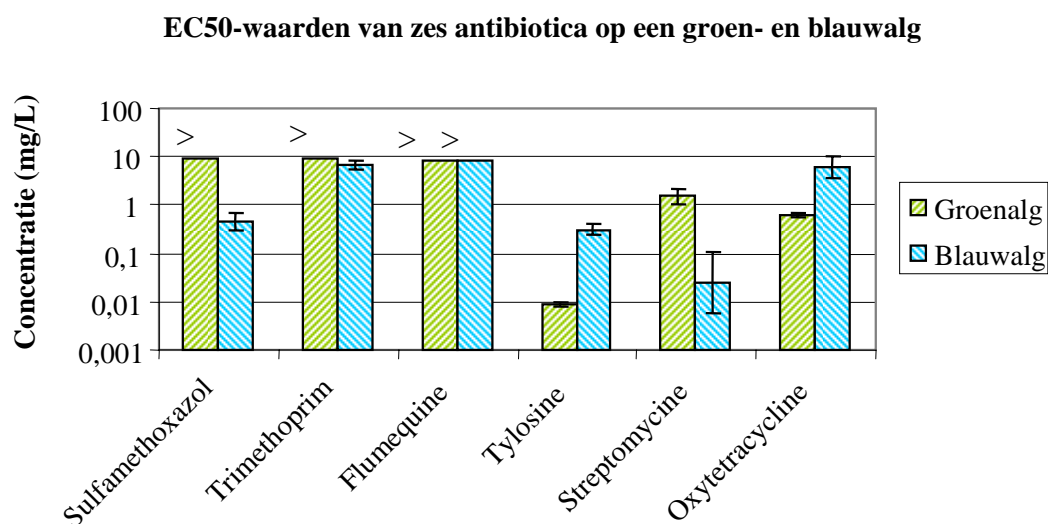
De PAM-algentesten zijn uitgevoerd bij het RIVM (4,5-uursmeting groenalg) en bij de UvA (4,5- en 24-uursmeting groen- en blauwalg (*Microcystis aeruginosa*)). Er is gekozen voor een verlengde blootstellingstijd om de antibiotica de tijd te geven in te werken op de fysiologische systemen van de testorganismen. Bij de PAM-algentesten wordt het effect op de fotosynthese-efficiëntie gemeten.

De multibacterietest en de microtoxtest zijn uitgevoerd bij het RIZA. Bij de multibacterietest wordt in een 96 wells microtiterplaat de bacteriële groeiremming gemeten aan de hand van de optische dichtheid. Bij de microtoxtest wordt de remming van de citroenzuurcyclus gemeten.

2.4 Resultaten

2.4.1 PAM-algentest

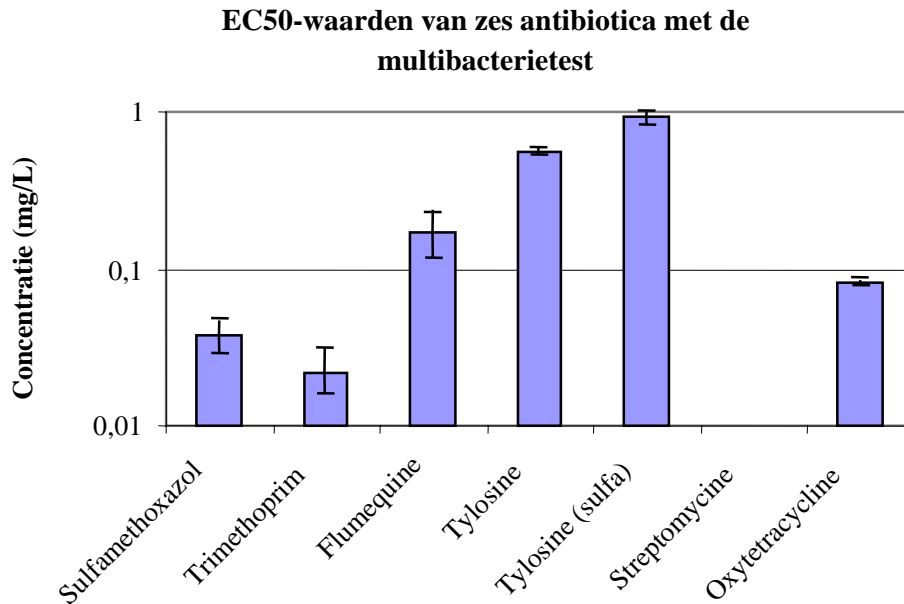
Voor de 4,5 uren meting met de PAM-algentesten (van Beusekom et al., 1999) is in geen van de geteste concentraties een effect gevonden groter dan 50% en dus zijn de EC_{50} -waarden niet af te leiden. De PAM-algentesten met een blootstelling van 24 uur geven wel een effect, waarbij de fotosynthese-efficiëntie soms tot nul wordt gereduceerd. Effecten zijn gevonden voor tylosine, streptomycine en oxytetracycline op de groenalg. Op de blauwalg zijn effecten van sulfamethoxazol, trimethoprim, tylosine, streptomycine en oxytetracycline gemeten (Figuur 1). De gebruikte groenalg blijkt het meest gevoelig te zijn voor tylosine terwijl de gebruikte blauwalg het meest gevoelig voor streptomycine is.



Figuur 1: EC_{50} -waarden (mg/L) + standaarddeviatie van de zes gemeten antibiotica op de geteste groen- en blauwalg met de PAM-algentest van de UvA (24 uur). (> Betekent dat de waarde groter is dan de weergegeven concentratie).

2.4.2 Multibacterietest

Met de multibacterietest is voor alle gemeten antibiotica (behalve streptomycine) een effect gevonden (Figuur 2). Bij de multibacterietest (Stroomberg et al., 2006) wordt gebruikgemaakt van verschillende platen die specifiek bedoeld zijn voor verschillende groepen antibiotica. Opvallend is dat de geteste antibiotica alleen een effect geven op de daarvoor bestemde plaat. Alleen tylosine geeft ook een effect op de plaat bestemd voor de antibioticagroep “sulfanomiden”. De effecten zijn dus specifiek per antibioticagroep te meten.



Figuur 2: EC₅₀-waarden + 95% betrouwbaarheidsinterval van zes antibiotica op de voor het antibioticum bestemde plaat en tylosine op de sulfanomidenplaat met de multibacterietest.

2.4.3 Microtoxtest

Bij de microtoxtest is alleen bij oxytetracycline een licht effect (10%) gevonden. Het effect is beduidend lager dan 50%, waardoor er geen EC₅₀ berekend is. Een te korte blootstellingsduur (30 minuten) kan een oorzaak zijn van het niet vinden van geen of onvoldoende effect.

2.5 Conclusies en discussie

Antibiotica zijn met name ontwikkeld om een effect op bacteriën te veroorzaken en niet specifiek op algen. De verwachting was dat er lagere EC₅₀-waarden zouden worden gevonden voor de bacterietesten, dan voor de algentesten. Deze verwachting is juist gebleken, hoewel er voor tylosine een lagere EC₅₀-waarde is gevonden bij de algentesten (zowel groen- als blauwalg), dan bij de bacterietesten. Het is onbekend waarom juist tylosine een uitzondering is.

Er is géén wezenlijk verschil te ontdekken tussen de geteste groen- en blauwalg als er gekeken wordt naar de concentratie waarbij er een effect optreedt. Dat is opvallend, omdat de geteste blauwalg deels bacterie is, waardoor je zou kunnen verwachten dat blauwalgen gevoeliger zijn dan groenalgen (zoals uit de literatuur ook blijkt als gekeken wordt naar groeitesten). Mogelijk komt dit door de geteste parameter, namelijk fotosynthese-efficiëntie.

Van de geteste bioassays lijkt de multibacterietest de meeste potentie te hebben om specifieke effecten van antibiotica aan te tonen. De test maakt onderscheid tussen antibioticagroepen en is van de geteste bioassays het meest gevoelig. Om deze test aan de

huidige testbatterij toe te voegen, is echter nader onderzoek nodig naar de mogelijke effecten van andere in het oppervlaktewater voorkomende stoffen dan antibiotica en het effect de specificiteit van deze stoffen op de verschillende platen.

2.6 Aanbevelingen voor verder onderzoek

- Door de relatief lage veldconcentraties van antibiotica (Schrap et al., 2003) kunnen effecten van antibiotica in bioassays moeilijk worden aangetoond. Daarvoor is het nodig het veldmonster eerst te concentreren. De huidige voorbehandelingsmethode (concentratiestap) van het RIVM is gericht op het concentreren van met name de apolaire verbindingen in een monster. Uit het onderzoek in hoofdstuk 3 is gebleken dat deze voorbehandelingsmethode niet voldoende is om ook de polaire antibiotica uit de monsters te extraheren.
Binnen het pT-project wordt in de tweede helft van 2007 nader onderzoek naar polaire stoffen gestart. Het is aan te bevelen om bij dit onderzoek ook enkele polaire antibiotica te betrekken, zodat het mogelijk wordt om deze ook in veldmonsters te kunnen meten.
- Als men effecten van antibiotica in geconcentreerde veldmonsters heeft gevonden kan in een vervolgstap verder gezocht worden naar welke stof dit effect veroorzaakt kan hebben. Voor de multibacterietest heeft het RIZA een fractioneringmethode met behulp van een HPLC opgezet om de toxische stoffen te kunnen identificeren. Het veldmonster wordt over een kolom geleid en gefractioneerd afgevangen. Deze verschillende fracties kunnen vervolgens afzonderlijk van elkaar worden gemeten en getest in een 96-wells microtiter multibacterietest (bioassays). Deze methodiek wordt momenteel door het RIZA geoptimaliseerd.
- De concentratie- en de fractioneringsmethode zijn twee belangrijke aandachtspunten in de verdere optimalisatie van bioassays om specifieke effecten van antibiotica in het oppervlaktewater te kunnen aantonen.
- Het is onbekend of andere in oppervlaktewater voorkomende stoffen invloed hebben op de multibacterietest. Het is aan te bevelen om nader onderzoek uit te voeren naar de gevoeligheid van de multibacterietest voor andere in oppervlaktewater voorkomende stoffen. Met deze kennis wordt meer inzicht verkregen over de specificiteit van deze test.
- De combinatie-effecten van antibiotica en andere in oppervlaktewater voorkomende stoffen en de combinatie-effecten van de antibiotica onderling zijn in dit onderzoek niet bekeken. In dit onderzoek is alleen gekeken naar de effecten van één antibioticum in oplossing, maar het is niet uit te sluiten dat de antibiotica onderling of samen met andere stoffen elkaars effect kunnen versterken of afzwakken. Sulfamethoxazol en trimethoprim worden samen toegepast en daarvan is al bekend dat er een versterkend effect optreedt. De multibacterietest lijkt hier alleen gevoelig voor te zijn indien er meerdere antibiotica uit dezelfde hoofdgroep in het monster zitten. Voor de PAM-algentest is het zeker interessant om te weten of de antibiotica elkaars effecten versterken of afzwakken.
- Er waren tijdens dit onderzoek onvoldoende gegevens om ervan verzekerd te zijn dat er géén afbraak van de gebruikte antibiotica plaatsvond tijdens de experimenten. Er zijn echter verschillende effecten gemeten met hetzelfde antibioticummonster op verschillende tijdstippen. Ook is niet bekend hoe de nominale concentraties zich verhouden met de actuele (werkelijk gemeten) concentraties. Geadviseerd wordt om in vervolgonderzoek actuele gehalten van antibiotica in bioassays te meten en/of om stabiliteitsonderzoek uit te voeren voor verschillende soorten antibiotica. Deze kennis

kan tevens gebruikt worden om te bepalen hoe lang veldmonsters bewaard kunnen blijven, onder welke omstandigheden, en of er met een correctiefactor eventueel gecorrigeerd kan worden.

- Een opmerkelijk verband blijkt aanwezig te zijn tussen de biomassa en de fotosynthese-efficiëntie. Het was in dit onderzoek niet mogelijk om hier dieper op in te gaan. Aangeraden wordt om te onderzoeken welk werkingsmechanisme er achter dit verband schuilgaat. Mogelijk dat dit een specifieke eigenschap voor bepaalde soorten antibiotica kan zijn.

3 PILOT ZIEKENHUISEFFLUENT

Het doel van de pilot met het ziekenhuiseffluent was om ervaring op te doen met de logistiek van bemonstering en vervoer, met het testen van veldmonsters in bioassays en met de noodzakelijke arbotechnische maatregelen bij het werken met veldeffluënten. Voor de pilot is aansluiting gezocht bij een al lopende pilot van een waterschap waarbij effluent van een ziekenhuis chemisch werd doorgemeten op aanwezigheid van geneesmiddelen. Op twee momenten werd op één locatie een 24-uurs bemonstering uitgevoerd. Daarbij werd in het bijzonder beoordeeld hoe bruikbaar een dergelijke bemonstering binnen het pT-project is, en wat de toepassingsmogelijkheden ervan zijn. Ook de recovery van de concentratiemethodiek werd in deze pilot meegenomen. In het kader van onderzoek naar het voorkomen van antibioticaresistentiegenen in het (waterige) milieu (opdrachtgever: RIVM, uitvoering: IRAS / Universiteit Utrecht), werden ook monsters van het ziekenhuis riool effluent onderzocht. Daarvoor werd de totale bacteriële gemeenschap in (ruw) effluentwater op filters geconcentreerd en de DNA daarvan geëxtraheerd. Vervolgens werd de DNA op de aanwezigheid van zes resistentiegenen onderzocht (zoals beschreven in Schmitt et al., 2006).

3.1 Bevindingen monsternamen en behandeling effluënten

In het algemeen kan gesteld worden dat de bemonstering succesvol verliep.

In deze pilot moest de planning voor het doormeten van mogelijke effecten in bioassays anders gefaseerd worden doordat onverwachte regen de bemonstering hinderde. Ook aan de monsternametechniek moesten tussentijds aanpassingen worden aangebracht. Qua kosten en logistiek lijkt het daarom verstandiger de uitvoer van bioassays in de tijd los te koppelen van de bemonsteringsperiode. Het is echter niet bekend of door een eventueel langere bewaartijd stoffen in het monster afbreken.

Voor de behandeling van effluënten werden diverse procedures opgesteld en geëvalueerd waarbij onderstaande bevindingen werden vastgesteld:

- Veiligheidsmaatregelen tegen pathogene en virale besmetting van betrokkenen bij zowel de bemonstering als de verwerking van de monsters op het lab moeten vooraf goed geïnventariseerd worden.
- Vanuit arbotechnisch oogpunt dienen maatregelen getroffen worden om de risico's zo klein mogelijk te maken. Te denken valt aan: inenting tegen onder andere hepatitis, het dragen van handschoenen en mondkap bij de monsternamen, het werken in een klasse II BSLt bij het overbrengen van monsters in tienliterflessen op het lab. Ook is het raadzaam om tienliterflessen die gebruikt worden bij de extractieprocedure op de rollerbanken te coaten met polycarbonaat om risico's van breuk en daarmee contaminatie zo klein mogelijk te maken.

3.2 Resultaten van bioassays, resistentiebepaling en chemische analyses

Hoewel het doel van dit onderzoek was om de methodiek van bioassays te testen op ziekenhuiseffluent, en in kaart te brengen welke problemen daarbij kunnen optreden, valt er ook iets te zeggen over de verkregen resultaten.

Uit de resultaten van de geteste extracten van ziekenhuiseffluent op bioassays (Chydoridentoets, PAM-toets, Microtox, Cyano Pamtox en multibacterietoets) blijkt dat er hoge toxische effecten worden gevonden in dit effluent op beide bemonsteringstijdstippen.

Alle onderzochte resistentiegenen (tet(B), tet(E), tet(D), tet(O), tet(Q) en tet(W)) waren sterk aanwezig. Daarbij werden ook genen aangetoond die in Nederlands oppervlaktewater zelden of niet gevonden werden (tet(B), tet(D) en tet(E)). Er werd ook onderzoek verricht naar specifieke bacteriën en hun resistentiepatronen, in het kader van het onderzoeksproject “Verkennde metingen: Antibioticumresistente bacteriën”, met als opdrachtgever de VROM-Inspectie (uitvoering: RIVM-LZO). De resultaten van dit onderzoek komen eind 2007 ter beschikking.

In het ruwe monster en in het opgewerkte (geconcentreerde) monster zijn de recoveries bepaald door middel van chemische analyses van 43 antibiotica, 5 natuurlijke en synthetische hormonen, 3 alkylphenolen en 2 phyto-estrogenen. Stoffen die wel in het ruwe monster werden teruggevonden en niet in de opgewerkte concentraten (of onder detectieniveau) waren: amoxicillin, metronidazole, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin. Stoffen die boven detectieniveau in de concentraten werden teruggevonden waren: anhydro-erythromycin, clarithromycin, roxithromycin, sulfamethoxazole, clindamycin, metronidazole voor de antibiotica. Overige stoffen die ver boven detectiegrens werden teruggevonden waren: estrone, estriol, bisphenol-A, tert-octylphenol, iso-monylphenol, Bisitostrerol, daidzeïne.

3.3 Conclusies en aanbevelingen

- Om gezondheidsrisico's van blootstelling aan pathogenen zo klein mogelijk te maken is het beter om verder van de bron af te meten. In dit kader kan gesteld worden dat de risico's bij het omgaan met effluënten uit Rijks water zuiverings installaties (RWZI's) aanzienlijk kleiner zijn dan bij influënten van RWZI's. Personen die omgaan met influënten van RWZI's of met effluënten van ziekenhuizen dienen vooraf voldoende te zijn ingeënt tegen onder andere hepatitis A en B en met de standaard DTP-inenting.
- Qua logistiek is het verstandiger het opwerken van een monster los te koppelen van de daadwerkelijke meting in het oppervlaktewater. Echter zolang er géén inzicht is in de stabiliteit van antibiotica in het ingevroren eluaat lijkt dit niet aan te bevelen. Uit de recovery-analyses van de opgewerkte monsters (extractie met XAD4/8) blijkt dat er veel stoffen in de opwerkmethode verdwijnen. De vraag rijst hiermee of voor de concentratie van antibiotica (geneesmiddelen) niet een andere opwerkmethode gekozen dient te worden die een hogere recovery heeft. Het risico van de huidige methode is dat er effecten van stoffen worden gemist omdat ze met de huidige methode niet of onvoldoende geconcentreerd kunnen worden. Nader onderzoek hiernaar wordt aanbevolen.
- In vervolgonderzoek kan verder ingezoomd worden op de daadwerkelijk gevonden effecten en op de vraag in hoeverre de resultaten verklaard kunnen worden door gevonden concentraties aan stoffen. Hiervoor lopen al vervolgactiviteiten. Zo loopt er een pilot met het KIWA, waarbij actuele concentraties van antibiotica in effluënten van een aantal RWZI's gekoppeld kunnen worden aan effectmetingen in bioassays.

4 LITERATUUR

- Beusekom, S.A.M. van, Admiraal, W., Sterkenburg, A., De Zwart, D., 1999. Handleiding. PAM-Test, ECO notitie 98/09, Laboratorium voor Ecotoxicologie, RIVM
- Boxall, A.B.A., P. A. Blackwell, P. Blackwell, P. Kay, E. J. Pemberton and A. Croxford, 2004, *Veterinary medicines in the environment*, Rev. Environmental contamination toxicology 180, pp 1-91.
- Bulich, A.A., 1982, *A Practical and Reliable Method for Monitoring the Toxicity of Aquatic Samples*, Process Biochemistry Vol 17, No 2, p 45-47.
- Grinten, van der E. 2005. Briefrapport Bioassays voor hormoonverstorende stoffen en geneesmiddelen, RIVM_LER Bilthoven.
- Siers, H.J. 2007, *Ontwikkeling van bioassays om de effecten van antibiotica in oppervlaktewater te beoordelen*, Stageverslag RIVM-Saxion hogescholen.
- Schmitt, H., K Stoob, G Hamscher, E Smit, W Seinen, 2006, *Tetracyclines and Tetracycline resistance in Agricultural Soils: Microcosm and Field Studies*, Microbial Ecology 51, pp 267-276.
- Schrap, S.M., Rijs G.B.J., Beek M.A., Maaskant J.F.N., Staeb J., Stroomberg G., Tiesnitsch J. (2003) Humane en veterinaire geneesmiddelen in Nederlands oppervlaktewater en afvalwater. Rapport nr. 2003.023, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA), Lelystad.
- Stroomberg, G.J., Rotteveel, S., Bouter, A., Tiesnitsch J., Staeb, J., 2006, *Antibiotica in oppervlakte- en afvalwater – Toepassing van de RIKILT Meat Scan op extracten van oppervlakte- en afvalwater*, RIZA-werkdocument 2006.084x Lelystad.
- Struijs, J., en L. van Buren. 1995, Milieutoxiciteit (pT) van water (I): het opwerken tot water concentraten RIVM-rapport nr. 607042006, RIVM Bilthoven.