

Handreiking voor het uitvoeren van biologische effectmonitoring bij vergaande zuivering van RWZI-effluenten

Versie 0.9, eindversie 24 oktober 2024

Aanleiding

Vanuit het ministerie van IenW is budget beschikbaar gesteld om waterschappen een beperkt aantal jaren financieel te ondersteunen met als doel microverontreinigingen vergaand uit stedelijk afvalwater te verwijderen en een betere effluentkwaliteit te verkrijgen. Het budget wordt vooral besteed aan het opstarten van full-scale demonstratieprojecten om zo praktijkervaring op te doen en lerend te implementeren. Eén van de doelen is het krijgen van inzicht in de mate waarin vergaande zuiveringstechnieken bijdragen aan het verbeteren van de kwaliteit van het te lozen RWZI-effluent en daarmee in het positieve effect op het ontvangende oppervlaktewater. Deze verbetering wordt beoordeeld aan de hand van zowel chemische analyses als biologische effectmetingen. De voorliggende handreiking beschrijft de manier waarop de biologische effectmonitoring op het (vergaand gezuiverde) RWZI-effluent moet worden uitgevoerd en op welke wijze interpretatie van de resultaten dient plaats te vinden om zo een betrouwbare vergelijking van de verschillende demonstratieprojecten mogelijk te maken. Ook voor andere aspecten als bemonstering en analyse van enkele chemische stoffen, CO₂-footprint en berekening van de kosten zijn standaard werk- en berekeningswijzen vastgelegd.

Vorbereiding

Onderzoeksopzet

Centraal in de onderzoeksopzet is dat de effectiviteit van vergaande zuiveringstechnieken telkens wordt beoordeeld ten opzichte van het reguliere RWZI-effluent, dat niet met de vergaande zuiveringstechniek is behandeld. Het is belangrijk dat beide monsters zo identiek mogelijk worden genomen, opgewerkt en getest. Alleen dan zijn de resultaten bruikbaar om de effectiviteit gestandaardiseerd te beoordelen. Een volledig identieke methode (bijv. simultane monsternamen) is echter niet altijd mogelijk, waardoor men soms oplossingen moet kiezen, die dit zoveel mogelijk benaderen.

Planning

De monsternamen worden uitgevoerd bij droog weer afvoer (DWA; zie boxes hieronder). Alhoewel dat altijd een onzekerheid geeft, dient de planning er wel zo goed mogelijk op te worden afgestemd. Ga tevens na of er in de beoogde monsternamen periode andere onderzoeken lopen, die eventueel ook gebruik moeten maken van de monsternamen apparatuur en stem daar waar nodig mee af.

Keuze DWA i.p.v. RWA

Het merendeel van de tijd werkt een RWZI onder droogweer-afvoer (DWA) en ook het zuiveringsproces van de vergaande zuiveringstechniek zal naar verwachting hierop gedimensioneerd worden. Een deel van de regenweer-afvoer (RWA) kan dan als bypass langs de nageschakelde vergaande zuiveringstechniek worden geleid. Het grootste deel van het afgevoerde afvalwater en daarmee ook de vracht aan microverontreinigingen doorloopt het vergaande zuiveringsproces. Onderzoek naar de effectiviteit van vergaande zuiveringstechnieken lijkt daarom het meest relevant onder DWA-condities.

Te bemonsteren waterstromen

Zoals in de onderzoeksopzet is beschreven dient er bij voorkeur een directe vergelijking gemaakt te worden tussen het reguliere RWZI-effluent en het vergaand gezuiverde effluent (cq. de afloop van de vergaande zuiveringstechniek). Als de vergaande zuiveringstechniek als losse unit in het reguliere proces wordt opgenomen, kan het inkomende en aflopende water van de nageschakelde vergaande zuiveringstechniek direct met elkaar worden vergeleken. Als de vergaande zuiveringstechniek echter in het bestaande zuiveringsproces van de RWZI wordt geïntegreerd (zoals bij poederkooldosering in het actiefslibproces, PACAS) is dit niet mogelijk. In die situatie wordt voorafgaand aan de implementatie van de vergaande zuiveringstechniek een referentiewaarde vastgelegd voor het reguliere (niet vergaand gezuiverde) RWZI-effluent door de biologische effectmetingen uit te

voeren op ten minste zes verschillende effluentmonsters, die evenredig over het jaar zijn verdeeld. Om een directe relatie met de resultaten van de chemische analyses te waarborgen, wordt de monstername op eenzelfde manier uitgevoerd (namelijk volgens de 'aangepaste werkinstructie chemie v2') en kunnen de chemische analyses en de biologische effectmetingen aan dezelfde watermonsters worden uitgevoerd. Voor het uitvoeren van de biologische effectmetingen is in totaal minimaal 4 liter afvalwater nodig¹.

Monstername

Voor de monstername wordt aangesloten bij de bemonsteringsmethode voor de chemische monitoring van vergaande zuivering van RWZI-effluenten, zoals beschreven in de aangepaste werkinstructie² (kortweg 'aangepaste werkinstructie chemie v2'). Bij voortschrijdend inzicht tijdens het 'lerend implementeren' en vanwege aankomende EU-wetgeving kan deze werkwijze nog worden aangepast. In het kort: In de 'aangepaste werkinstructie chemie v2' wordt uitgegaan van een 24h debietsproportionele monstername gedurende 14 aaneengesloten dagen. Alle 24h monsters worden zo snel mogelijk na monstername ingevroren. Na de 14 dagen bemonsteringsperiode worden de DWA-dagen geselecteerd (zie onderstaande box en 'aangepaste werkinstructie chemie v2' voor verdere toelichting), waarna de dagmonsters van deze DWA-dagen worden ontdooid en gemengd. Voor een geldige monstername dienen ten minste zes dagmonsters gemengd te worden. In sommige gevallen kan het daarom nodig zijn om de 14-daagse bemonsteringsperiode met enkele dagen te verlengen. Als de voor de bioassays benodigde extractie van dit mengmonster niet direct kan worden uitgevoerd, wordt dit mengmonster weer ingevroren³. Voor RWZI's ≤ 100.000 i.e. mocht in voorgaande onderzoeken soms tijdsproportioneel bemonsterd worden. Onder de huidige 'aangepaste werkinstructie chemie v2' is dit niet langer toegestaan.

Zoals in de 'aangepaste werkinstructie chemie v2' aangegeven wijkt de monstername voor de biologische effectbeoordeling op één belangrijk punt af van de monstername voor de chemische analyses. Voor de biologische effectbeoordeling wordt er voor ieder dagmonster namelijk niet minimaal 100 maar 700ml in een HD-PE fles⁴ overgebracht en ingevroren. Vanuit het gestelde minimum van 6 dagmonsters in een mengmonster zorgt de dagelijkse monstername van 700ml ervoor, dat er altijd ten minste 4 liter voor de biologische effectbeoordeling beschikbaar is. Als er meer dan zes dagmonsters beschikbaar zijn, worden deze allen met elkaar gemengd, waarna er uit dit mengmonster een deelmonster van 4 liter kan worden genomen om te extraheren voor de biologische effectbeoordeling.

Er moet apparatuur beschikbaar zijn om gelijktijdig het reguliere RWZI-effluent en het vergaand gezuiverde effluent te verzamelen. Hierbij hoeft geen rekening te worden gehouden met de verblijftijd van het water in de vergaande zuiveringstechniek, aangezien deze doorlooptijd doorgaans kort is. In de 'aangepaste werkinstructie chemie v2' wordt de volgende aanpak gehanteerd voor het vaststellen van een DWA-bemonstering:

Selectie DWA-dagmonsters

De bemonstering dient een voldoende representatief beeld te geven van de werking van de RWZI en de vergaande zuivering. Het mengmonster dient hiervoor te bestaan uit 'pure' DWA-dagen. Of er sprake is van regenweer wordt bepaald aan de hand van het influentdebiet en de hydraulische verblijftijd: Dag 1 van een regenweerperiode is de dag, dat het influentdebiet hoger is dan $1,3 \times$ de mediaan van het influentdebiet over de 3 afgelopen jaren. Bij deze dag wordt de verblijftijd van de RWZI onder DWA-omstandigheden opgeteld. Pas als het influentdebiet na de regenweerperiode $< 1,3 \times$ mediaan bedraagt én nadat de verblijftijd is verstreken, kunnen de dagmonsters worden meegenomen in het mengmonster. Zie 'aangepaste werkinstructie chemie v2' voor een uitgebreidere toelichting en berekening van de hydraulische verblijftijd.

¹ Let op. Deze 4 liter geldt voor biologische effectmetingen aan RWZI-effluent. Voor onderzoek aan oppervlaktewater wordt uitgegaan van een extractie van 6 liter.

² Aangepaste werkinstructie bemonstering en chemische analyse medicijnresten in RWZI-afvalwater t.b.v. bijdrageregeling 'Zuivering medicijnresten' (IenW) (versie 2, april 2024).

³ Het tot $2 \times$ invriezen en ontdooiden van effluentmonsters blijkt niet bezwaarlijk voor de biologische effectbeoordeling (Ecofide, 2024).

⁴ Vanwege het benodigde invriezen van dagmonsters is een HD-PE fles geschikter dan glazen flessen.

Opwerken van de monsters

Multi-SPE extractie

Bij de multi-SPE extractie wordt het te extraheren effluentmonster in enkele gelijke delen opgesplitst, waarna ieder deel over één SPE-kolom wordt geëxtraheerd en het uiteindelijke extract weer kan worden samengevoegd. De methode is het resultaat van een doorontwikkeling van de eerder toegepaste LVSPE methodiek, is beschreven in Van den Berg (2021) en wordt hieronder samengevat⁵.

De monsters t.b.v. de biologische effectmetingen worden voorafgaand aan de extractie gefiltreerd over een cellulosefilter met een relatieve hoge doorlatendheid. Dit gebeurt uit praktische overwegingen om verstopping bij de extractie te voorkomen. Aan de monsters mag verder geen oplosmiddel worden toegevoegd, omdat dit van invloed is op het extractie-rendement.

Noot: Voor deze handreiking is gekozen om alle effluentmonsters standaard te filtreren, wetende dat filtratie kan leiden tot lagere concentraties van milieuverontreinigingen en daarmee ook minder biologische effecten. Zonder filtratie leiden veel effluënten echter tot verstopping van de SPE-kolommen. Dit is niet alleen praktisch onhandig, maar kan ook tot variatie en verschillen tussen vergaande zuiveringstechnieken en referentiestraten leiden, die niet direct als effect van de vergaande zuiveringstechniek gezien kunnen worden. Het is belangrijk om periodiek en in ieder geval voor iedere nieuwe batch cellulosefilters te controleren of het gebruik hiervan niet tot een verhoging van het achtergrondsignaal leidt.

Van het te concentreren effluentmonster wordt eerst het exacte volume bepaald (voor latere berekeningen) en vervolgens worden de aanwezige organische microverontreinigingen geëxtraheerd met een multi-SPE extractie. Hierbij wordt het totaal te extraheren volume in delen opgesplitst, waarna ieder deel over een eigen SPE-cartridge wordt geëxtraheerd. Zowel de extractie-opstelling als het volume van de te gebruiken SPE-cartridges kan per laboratorium verschillen, maar iedere SPE-cartridge is zodanig met Chromabond® HR-X materiaal⁶ gevuld, dat er altijd een verhouding van 1 gram Chromabond® HR-X materiaal op 2 liter te extraheren effluentmonster wordt gehanteerd. De extractiesnelheid is circa 10 ml/min, overeenkomend met een totale extractieduur van circa 3 à 3,5 uur. Voorafgaand aan de extractie worden de SPE-cartridges geconditioneerd door de kolom te spoelen met 2 maal 10 ml ethylacetaat, daarna 2 maal 10 ml methanol en ten slotte 2 maal 10 ml ultrapuur water (LC-MS kwaliteit). Deze volumes zijn gebaseerd op een 15ml SPE-cartridge met 1 gram Chromabond® HR-X materiaal. Bij kleinere SPE-cartridges kunnen de volumes naar rato van de hoeveelheid Chromabond® HR-X materiaal worden aangepast. De snelheid, waarmee de cartridges-kolom wordt doorgespoeld, is circa 2 tot 4 druppels per seconde. Verder wordt bij iedere serie monsters ook een procedure blanco meegenomen en getest.

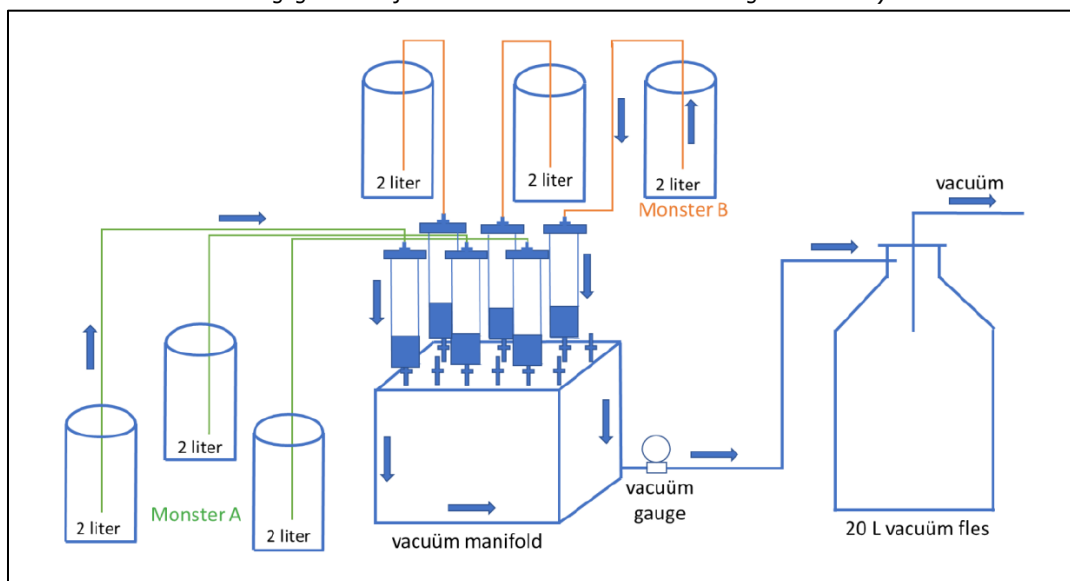
Tijdens de extractie wordt het effluentmonster over de geactiveerde SPE-cartridges geleid met een snelheid van circa 10 ml/min, waarna deze cartridges onder stikstof volledig worden droog geblazen. De gedroogde cartridges kunnen desgewenst in aluminiumfolie worden gewikkeld en enige tijd koel worden bewaard of direct worden opgewerkt.

Vervolgens wordt iedere droog geblazen kolom geëxtraheerd met achtereenvolgens 3 maal 5 ml ethylacetaat en 3 maal 5 ml methanol, waarbij een snelheid van circa 2 tot 4 druppels per seconde wordt aangehouden. Ook voor deze volumes geldt dat ze zijn gebaseerd op SPE-cartridges van 15ml met 1 gram Chromabond® HR-X materiaal. Bij kleinere SPE-cartridges kunnen de volumes naar rato van de hoeveelheid Chromabond® HR-X materiaal worden aangepast. Het verzamelde extract wordt vervolgens ingedampt m.b.v. een indamptoestel (Rotavap, TurboVap), waarna het resterende volume met een 1:1 mengsel van ethylacetaat en methanol zo wordt aangepast dat er een uiteindelijke concentratiefactor van 2000 is bereikt (4 liter effluent levert dan een extract van 2 ml op). Ten slotte worden uit dit eindextract de benodigde volumes voor de verschillende biologische analyses gehaald.

⁵ Per laboratorium mag de uitvoering op details verschillen, bijvoorbeeld bij het gebruik van een automaat of een andere grootte van de kolommen, zolang de essentiële stappen (filtratie, adsorptie materiaal, conditionering van de kolommen, loading, extractiesnelheid) maar overeenkomen.

⁶ Hydrophobic polystyrene-divinylbenzene copolymer; Keuze is gebaseerd op Schulze et al (2017). HR-X kent een gemiddelde recovery van 88% (mediane waarde = 96% gebaseerd op 246 verschillende stoffen), waarbij wordt opgemerkt dat er ook stoffen zijn die relatief slecht door HR-X worden geadsorbeerd. Dit geldt overigens in het algemeen: voor ieder absorbers zullen er altijd stoffen zijn die minder goed geëxtraheerd worden.

Illustratie van een multi-SPE opstelling (overgenomen uit Van den Berg, 2021; betrof extractie van oppervlaktewater waardoor er van 6 liter is uitgegaan terwijl er voor RWZI-effluent 4 liter wordt geëxtraheerd.)



Biologische effectmetingen

Met het verkregen extract van zowel de effluentmonsters als de procedure blanco worden de volgende biologische effectmetingen uitgevoerd:

Altijd verplicht	Bij toepassing van oxidatieve technieken óók verplicht
ERa-Calux PAH-Calux Microtox PXR-Calux Cytotox-Calux	P53-Calux (met en zonder S9) ^{a)}

^{a)} Bij oxidatieve technieken als ozon, H₂O₂ of UV kunnen bijproducten worden gevormd. Een deel hiervan zal niet milieubezwaarlijk zijn, maar er kunnen ook stoffen gevormd worden met bijvoorbeeld genotoxische eigenschappen. Om dit effect vast te kunnen stellen is de P53-Calux zonder metabole S9⁷ activatie verplicht. Daarnaast kunnen er stoffen gevormd worden, die op zichzelf niet genotoxisch zijn, maar die (eenmaal in het oppervlaktewater) alsnog in een genotoxische stof kunnen worden omgezet (precursor). Deze omzetting wordt nagebootst door de P53-Calux ook uit te voeren met metabole activatie door S9. Als voor de betreffende RWZI en vergaande zuiveringstechniek eenmaal is vastgesteld dat de kans op genotoxische effecten beperkt is (geen/beperkte toename van respons) kan vervolgonderzoek tot één van beide uitvoeringswijzen worden beperkt. Deze keuze wordt gebaseerd op de verkregen resultaten.

Keuze tussen een beperkte en meer uitgebreide set bioassays

Overeenkomstig met de keuzes voor de chemische monitoring (waarvoor een beperkt aantal gidsstoffen is geselecteerd) is ook voor de biologische effectmetingen een keuze voor een beperkte set bioassays gemaakt. Net zoals de analyse van meer chemische parameters ook meer inzicht geeft, geldt dit ook voor biologische effectmetingen. De huidige keuze is primair gericht op het verkrijgen van een algemeen beeld van de kwaliteitsverbetering van het RWZI-effluent als gevolg van de vergaande zuiveringstechniek en daarmee van een vermindering van effecten in het ontvangende oppervlaktewater. De bioassays zijn daarom zo gekozen dat de gezamenlijke set via verschillende werkingsmechanismen op een breed spectrum aan stoffen reageert. Dit laat onverlet dat bij andere, bredere vragen ook een bredere set bioassays passender kan zijn (zoals ook in het KIWK-project is beschreven; Pronk *et al.*, 2021). Zo kan (bovenstrooms) oppervlaktewater dat niet door RWZI-effluent is belast wel door andere emissiebronnen worden beïnvloed, waardoor ook andere effecten kunnen optreden. In het al genoemde KIWK-project is terug te lezen in welke situaties en met welke argumenten bepaalde bioassays al dan niet worden voorgesteld.

⁷ S9 is een leverextract, en daarmee rijk aan allerlei enzymen voor verdere biologische omzettingen.

Uit het met de multi-SPE methode verkregen extract worden twee sub-monsters genomen, die nodig zijn voor het uitvoeren van de *in vivo* bioassay met de Microtox (1 ml⁸) en de *in vitro* Calux-testen (1 ml). Door het uitvoerende laboratorium worden deze sub-monsters verder opgewerkt. Voor het uitvoeren van de *in vivo* bioassay wordt het sub-monster ingedampt en tot 30 ml aangevuld met Dutch standard water (DSW). Voor de Calux testen wordt het extract ingedampt en opgelost in 100 µl dimethylsulfoxide (DMSO).

Naast de gebruikelijke kwaliteitsborging van laboratoria is er binnen deze handreiking specifiek aandacht nodig voor het maken en testen van procedure blanco's. In de meeste gevallen zijn de testresultaten bij blootstelling aan een procedure blanco klein en duidelijk lager dan de effect signaalwaarde (ESW). Soms worden er echter ook iets verhoogde waarden vastgesteld. Bij het aantreffen van deze licht verhoogde waarden in de procedure blanco's worden de volgende voorwaarden gehanteerd omtrent het al dan niet uitvoeren van een heranalyse (hertest):

- *analyseresultaat blanco > hertest-waarde dan hertest blanco*
 - *analyseresultaat blanco > ESW dan hertest blanco en monsters*
- uitzondering: bijdrage blanco aan activiteit monster < 5%*

De grenswaarden voor een heranalyse van de procedure blanco zijn als volgt:

	ESW	Hertest waarde	Eenheid	Opmerking
Microtox	0,05	0,03	TU	Toxic Unit = 100 / EC ₅₀ -waarde. De EC ₅₀ -waarde ⁹ wordt berekend door de effecten in duplo bij vier verschillende concentraties te bepalen namelijk 2x, 4x, 8x en 16x verdund DSW-concentraat
PAH-Calux	41	13	ng Benzo(a)pyrene eq./l water	Calux-analyses worden bij drie verdunningen in triplo uitgevoerd, namelijk 1x, 3x en 10x verdund t.o.v. oorspronkelijk extract. Bij monsters waarin een hoog effect wordt verwacht worden ook 30x en 100x verdunde extracten ingezet. Als de effecten te hoog zijn voor het bereik van de analyse, dan wordt de meting herhaald bij hogere verdunningen. De hoogste verdunning, die tot een goed kwantificeerbaar resultaat (eerste conc. boven de LOQ, Limit of Quantification) leidt, wordt als eindresultaat gebruikt.
PXR-Calux	16	5,3	µg Nicardipine eq./l water	
ERα-Calux	0,52	0,17	ng 17β Estradiol eq./l water	
Cytotox-Calux	10 ¹⁾	3,3	µg TBT eq./l water	
P53-Calux + S9 - S9	500 ¹⁾ 10 ¹⁾	500 ²⁾ 10 ²⁾	µg Cyclofosfamide eq./L water ng Actinomycine D eq./l water	

¹⁾ Oorspronkelijke ESW waarden waren uitgedrukt met als eenheid TU (0,05 voor de Cytotox en 0,005 voor de P53-Calux). Om verwarring bij de rapportage te voorkomen zijn deze ESW-waarden op basis van bestaande datasets omgerekend naar waarden op basis van de hoeveelheid referentiestof en naar boven afgerond als de berekende waarde onder de bepalingsgrens lag (P53-Calux).

²⁾ De ESW is gelijk aan de rapportagegrens. Hertesten vinden dus plaats zodra het resultaat van de procedure blanco boven de rapportagegrens ligt.

Als de testen aan alle geldigheidscriteria hebben voldaan worden de resultaten door het uitvoerende laboratorium gerapporteerd. Hierbij zijn de ruwe resultaten (uitgedrukt in respons per ml extract) teruggerekend naar de respons per liter afvalwater¹⁰.

⁸ Deze 1 ml bestaat uit 0,5 ml voor de Microtox-test en een 0,5 ml als reservemateriaal voor een eventuele herhaling.

⁹ De concentratie waarbij er 50% afname t.o.v. de controle optreedt.

¹⁰ De uitvoerende laboratoria hebben het meest zicht op de gerealiseerde concentratiefactoren en gebruikte hoeveelheden extract. Omrekening kan daarom het beste door deze laboratoria worden uitgevoerd.

Interpretatie

Vervolgens kunnen de monsters beoordeeld worden. De effectiviteit van de vergaande zuivering wordt hierbij uitgedrukt als afname (%) ten opzichte van het reguliere effluent. Deze afname wordt per test berekend met de volgende formules:

Voor de *in vivo* assays (Microtox):

$$(TU_{\text{regulier effluent}} - TU_{\text{vergaande zuivering}}) / TU_{\text{regulier effluent}} * 100\%$$

Voor de *in vitro* assays (PAH-, ERα-, PXR-, Cytotox en P53-Calux assays):

$$(conc_{\text{regulier effluent}} - conc_{\text{vergaande zuivering}}) / conc_{\text{regulier effluent}} * 100\%$$

De concentratie is hetgeen door de laboratoria wordt gerapporteerd en is uitgedrukt in bioanalytische equivalenten (BEQ) van de referentiestoffen.

Het resultaat is een percentage afname van de effecten in de betreffende bioassay. Deze afname percentages kunnen vervolgens over alle geselecteerde bioassays rekenkundig gemiddeld worden tot één afnamepercentage voor de betreffende monstername.

Bij de verdere interpretatie kunnen de afzonderlijke bioassay-resultaten met de ESW's (Effect Signaalwaarden, behorend bij de gehanteerde multi-SPE extractiemethode) vergeleken worden. Dit geldt voor RWZI-effluent maar zeker ook als de situatie in het ontvangend oppervlaktewater beoordeeld wordt. De mate van overschrijding geeft een indicatie van de risico's voor het watermilieu (Bijlage 1). Een afname van deze overschrijding is daarmee een maat voor het behaalde rendement in het verlagen van deze risico's door de vergaande zuiveringstechniek. Voor een dergelijke, bredere interpretatie is het wel belangrijk om twee zaken in het achterhoofd te houden, aangezien de ESW niet voor niets een *signaalwaarde* is genoemd:

- a) De waarde is niet in beton gegoten en kent onzekerheden. Nieuwe kennis kan dan ook tot aanpassingen leiden, maar ook in de huidige situatie is een overschrijding van de ESW-waarde wel een teken dat er verhoogde risico's zijn¹¹. Vanwege de onzekerheden wordt echter aanbevolen om ook de hoogte van de overschrijding in ogenschouw te nemen. In De Baat *et al* (2021) wordt hierover meer informatie gegeven inclusief een vijf klassenbeoordeling, die op de KRW-systematiek aansluit.
- b) De simultane inzet van chemische en biologische analyses leidt nu al tot een beter beeld van de effectiviteit van vergaande zuiveringstechnieken en de resterende risico's voor het ontvangende oppervlaktewater. Aanvullend onderzoek, waaronder het eenvoudigweg herhalen van de metingen (reproduceerbaarheid), maar ook uitbreiding naar een simultane monstername van het oppervlaktewater, kan dit beeld verder verbeteren. Daarnaast zijn er technieken om te achterhalen door welk type stoffen een effect in een bepaalde bioassay werd veroorzaakt.

Aanbevolen wordt om alle onderzoeksresultaten centraal op te slaan, zodat een evaluatie van de verschillende technieken en RWZI-effluenten in de verschillende projecten wordt vereenvoudigd (een programmatische aanpak). Dit betreft niet alleen de afnamepercentages maar vooral ook de ruwe meetgegevens per afzonderlijke bioassay en de bijbehorende metagegevens. Dit betreft in ieder geval de RWZI, demonstratieproject, monsternamedatum en periode, gemiddeld en totale debiet tijdens monstername, toegepaste vergaande zuiveringstechniek en eventuele bijzonderheden daarvan (details van op- of instelling), bemonsterde afvalwaterstroom (regulier of vergaand), bemonsterd volume, eventuele bijzonderheden tijdens monstername, toegepaste extractietechniek en verkregen volume aan extract en de ruwe meetgegevens per bioassay.

¹¹ Dit komt overeen met de situatie rond chemische normen. Ook hiervoor geldt dat er voor de normstelling van de ene stof meer gegevens beschikbaar zijn dan voor een andere, dat nieuwe kennis tot een aanpassing kan leiden en dat het hanteren van bestaande normen toch ook al een teken van risico's is.

Referenties

- De Baat, ML, TE Pronk, SJP van den Berg & R van der Oost (2021). Kalibratie van de risicogrenzen voor interpretatie van bioassays. Versie 1, 21 december 2021. KIWK-Toxiciteit Notitie. Amersfoort, Nederland. Kennis Impuls Water Kwaliteit.
- De Zwart, D (2002). Observed regularities in SSDs for aquatic species. Pages 133-154 in L. Posthuma, G. W. Suter, II, and T. P. Traas, editors. Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Ecofide (2024). Ondersteunend onderzoek voor implementatie van biologische effectbeoordeling bij RWZI-effluenten. Uitgevoerd in opdracht van Rijkswaterstaat Water, Verkeer en Leefomgeving. Rapportnr. 175.
- May, M, W Drost, S Germer, T Juffernholz & S Hahn (2016). Evaluation of acute-to-chronic ratios of fish and *Daphnia* to predict acceptable no-effect levels. Environ Sci Eur 28:16.
- Pronk, TE, ML de Baat, SJP van den Berg & R van der Oost (2021). Achtergronddocument Basis-Set Bioassay Selectie. Achtergronddocument beschikbare kennis bij de sleutelfactor Toxiciteit. Versie 1, 21 december 2021. KIWK-Toxiciteit Notitie. Amersfoort, Nederland. Kennis Impuls Water Kwaliteit.
- RIZA (2003). Normstelling voor bioassays. Uitwerking voor oppervlaktewater en waterbodembodem. RIZA-rapport 2003.005.
- RIVM (2007). Relevantie van toxiciteit-bioassays bij de beoordeling van een goede toestand van oppervlaktewater. RIVM-briefrapport 607013006.
- RIVM (2021). Handleiding voor de afleiding van indicatieve milieurisicogrenzen. Deel 4. Ecotoxiciteit: verzameling, selectie en rapportage van gegevens. versie 1.0.
- Schulze et al (2017). Assessment of a novel device for onsite integrative large-volume solid phase extraction of water samples to enable a comprehensive chemical and effect-based analysis. Sci Tot Environ 581-582: 350-358.
- STOWA (2016a). Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit. Deel 1. Methode voor het in beeld brengen van de effecten van giftige stoffen in oppervlaktewater. STOWA rapportnummer 2016-15A.
- STOWA (2016b). Ecological key factor Toxicity. Part 5. Background document on effect-based trigger values for environmental water quality. STOWA-rapport 2016-15E.
- Van den Berg, W (2021). Robuustheid biologische effectmonitoring RWZI-effluenten. Rapportage Stichting Waterproef in opdracht van RWS.
- Van der Oost, R, G Sileno, M Suárez-Muñoz, MT Nguyen, H Besselink & A Brouwer (2017). SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I—model design and effect-based trigger values. Environ Toxicol Chem, 36: 2385-2399. <https://doi.org/10.1002/etc.3836>

Bijlage 1. Wat zijn de ecologische gevolgen als een bioassay de effect-sigitaalwaarde voor oppervlaktewater overschrijdt?

In de Handreiking zijn zes biologische effectmetingen verplicht voorgeschreven. Voor ieder hiervan zijn effect-sigitaalwaarden (ESW) vastgesteld. Overschrijding van de ESW duidt op een verhoogd ecologisch risico bij het lozen van het RWZI-effluent in oppervlaktewater. De zekerheid, waarmee deze ecologische risico's daadwerkelijk resulteren in nadelige ecologische effecten, maar ook de aard van deze ecologische effecten (welke organismen zullen welke effecten ondervinden) verschilt tussen de biologische effectmetingen. Dit verschil hangt samen met de hoeveelheid kennis, die over een bepaalde biologische effectmeting beschikbaar is, met de toxische mechanismen die in de organismen voorkomen (hormoonverstoring is bij vissen belangrijker dan bij fytoplankton) en met de methode waarmee de ESW is afgeleid. Voor dit laatste aspect (afleiden van de ESW; zie STOWA, 2016b voor methode) zijn drie groepen te onderscheiden, namelijk biologische effectmetingen waar:

- a) veel kennis over beschikbaar is (ER-CALUX en PAH-CALUX)
- b) een meer beperkte hoeveelheid kennis over ecologische effecten beschikbaar is (PXR-CALUX)
- c) effect-sigitaalwaarden vanuit meer algemene kennisregels zijn vastgesteld (Microtox, Cytotox-Calux, P53-Calux)

Voor ieder van deze drie groepen wordt hieronder eerst een meer algemene beschrijving gegeven van de wijze, waarop de ESW is opgesteld. Vervolgens wordt voor alle individuele biologische effectmetingen zo concreet mogelijk beschreven, welke ecologische effecten er bij een overschrijding van de ESW verwacht kunnen worden. Ten slotte worden enkele onderzoeken uit de literatuur samengevat, waarmee een koppeling tussen waargenomen effecten in RWZI-effluenten (o.a. ten gevolge van een vergaande zuivering) en ecologische effecten in het ontvangend oppervlaktewater gelegd konden worden.

Gezamenlijk geeft deze informatie een redelijk beeld van de aard en het type ecologische effecten, die bij een overschrijding van de ESW op kunnen treden. Tegelijkertijd hangen de daadwerkelijke ecologische effecten van een specifieke lozing van RWZI-effluent ook af van allerlei andere factoren zoals de optredende verdunning, de aanwezigheid van andere milieuverontreinigingen uit bovenstroomse bronnen en/of andere factoren die de aquatische levensgemeenschap beïnvloeden (zoals nutriënten, stroomsnelheid of oeverinrichting). Een overschrijding van de ESW is daarom niet te vertalen naar iets concreets als "zoveel procent afname van de EKR-waarde van bijvoorbeeld macrofauna" (overigens geldt dit evenzo voor overschrijding van de chemische normen). Tegelijkertijd geldt wel dat hoe sterker de ESW wordt overschreden, hoe groter het effect op de aquatische ecologie zal zijn.

a) biologische effectmetingen, waar veel kennis over beschikbaar is (ER-CALUX en PAH-CALUX)

a1) Gebruikte methode voor afleiden van de ESW

Voor zowel de ER- als PAH-CALUX is er in de wetenschappelijke literatuur veel informatie voorhanden over het verband tussen een respons in de test en de ecologische effecten daarvan. Dit heeft tot gevolg dat de afgeleide ESW een hoge mate van zekerheid kennen. Bij deze afleiding is gebruik gemaakt van een wiskundig model om het verband tussen de respons in een test en de ecologische effecten te beschrijven (een zogenaamde soortgevoeligheidscurve, SSD of Species Sensitivity Distribution; zie intermezzo). Hiermee zijn de ESW zo gekozen dat maximaal 5% van de soorten een nadelig effect ondervindt. Voor de ER- en PAH-CALUX ligt deze ESW op 0,52 ng EEQ/l respectievelijk 41 ng BaPEQ/l¹² (De Baat *et al.*, 2021). De hierbij gebruikte literatuur is samengevat

¹² Niet iedere stof veroorzaakt bij eenzelfde concentratie evenveel effect. Om effecten van verschillende stoffen toch te kunnen vergelijken worden de concentraties omgerekend naar bioanalytische equivalenten (BEQ), d.w.z. de concentratie van een gekozen referentie stof, die eenzelfde mate van effect in de bioassay veroorzaakt. Bijvoorbeeld als een stof een twee keer zwakker effect veroorzaakt, wordt de concentratie gehalveerd. Voor de ER-CALUX is deze referentie stof 17 β -estradiol (vandaar EEQ: Estradiol EQuivalents); voor de PAH-CALUX is dit Benzo(a)Pyreen (en dus BaPEQ). Ook wordt rekening gehouden met de duur van de blootstelling.

Als voorbeeld. In STOWA (2016b) is bij de ER-CALUX onderzoek van Colman *et al* (2009) beschreven. Dit betrof een experiment, waarbij zebravissen effecten te zien gaven na een blootstelling van 2 dagen aan 0,5 ng/l 17alpha-ethinylestradiol. De Relatieve Effect Potentie (REP) factor van 17alpha-ethinylestradiol is 1,56 (STOWA, 2016b). Dat wil zeggen dat het effect van 17alpha-ethinylestradiol 1,56 sterker is dan als de vissen aan eenzelfde concentratie van de referentiestof 17 β -estradiol werden blootgesteld. De naar 17 β -estradiol teruggerekende toxiciteitswaarde is dan 0,5 ng/l * 1,56 = 0,78 ng EEQ/l. Van 17 β -

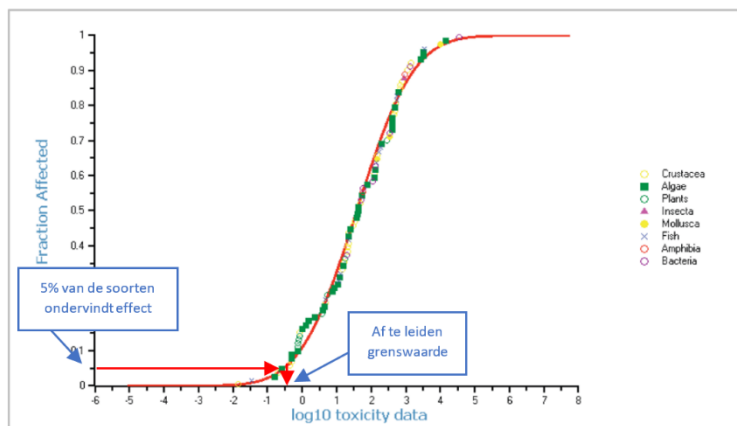
in de bijlagen van STOWA (2016b), waarbij deze bijlage als een opzoeklijst kan werken: met de vastgestelde ESW kan men in deze lijst nazoeken voor welke soorten wat voor type effecten onder de ESW zijn vastgesteld. Dit zijn namelijk de soorten, die bij de ESW een effect geven en in de SSD-curve dus links van die ESW liggen. Dit is voor de ER- en PAH-CALUX hieronder nader toegelicht. Daarmee geeft deze literatuur ook inzicht in de aard van de ecologische effecten, die bij overschrijding van de ESW verwacht kunnen worden.

Intermezzo. Werken met een soortgevoeligheidsverdeling

a) opstellen soortgevoeligheidsverdeling

Vanuit de beschikbare literatuur wordt een lijst opgesteld van experimenteel vastgestelde concentraties, waarboven een bepaalde soort een negatief effect van de blootstelling aan een milieuverontreinigende stof laat zien. Deze lijst wordt vervolgens van lage naar hoge concentraties gesorteerd. Iedere data-regel kan dan worden uitgedrukt als percentage van het totaal. Bijvoorbeeld: als er experimenten met 100 soorten zijn uitgevoerd, geeft de soort met de op vier na laagste effect concentratie het niveau, waarbij 5% van de soorten wordt blootgesteld boven hun effectdrempel. Dit is grafisch weer te geven door bij de betreffende concentratie op de x-as en een waarde van 5% op de y-as een stip te zetten. Bij de 6^{de} soort, doe je dit vervolgens ook maar dan bij een waarde van 6% op de y-as. Als men dit ook voor alle andere soorten doet, ontstaat een curve zoals weergegeven in onderstaand figuur. Door alle 100 individuele stippen kan vervolgens een curve worden gefit, die een wiskundige beschrijving van deze soortgevoeligheidsverdeling geeft.

Noot. De SSD wordt gebaseerd op zogenaamde chronische NOEC-waarden. Dit zijn de maximale concentraties, waarbij een langdurig blootgestelde soort nog net geen nadelig effect ondervindt (NOEC=No Observed Effect Concentration). Meestal is slechts een deel van de literatuur op dit chronische, geen effect niveau gebaseerd en daarmee direct bruikbaar voor de SSD. Andere experimenten, die naar bijvoorbeeld effecten bij een kortdurende blootstelling of ernstiger effecten kijken, geven echter ook aanvullende informatie. Op basis van vuistregels worden de concentraties dan omgerekend. Bijvoorbeeld: bij een kortdurende test, waarbij 50% van de dieren dood gaat, deelt men deze concentratie veelal door een factor 10 om zo een schatting te krijgen van de concentratie, die bij een langdurende blootstelling nog geen effect geeft (De Zwart, 2002; May *et al.*, 2016). Die factor 10 is gebaseerd op een zeer grote dataset met dergelijke verschillen tussen korte en lange blootstellingstijden.



Figuur. Voorbeeld van een soortgevoeligheidsverdeling. Op de x-as staan concentraties (nu gevisualiseerd als de logaritme van de concentraties in toxiciteitstesten). Op de y-as staat het percentage soorten (nu weergegeven als de fractie van de soorten; 0-1)¹³.

b) afleiden ESW

In de normstelling van stoffen is als uitgangspunt gekozen dat maximaal 5% van de soorten boven hun effectdrempel mag worden blootgesteld. Deze effectdrempel van 5% is ook gehanteerd bij het opstellen van de ESW voor biologische effectmetingen. Dit is in bovenstaand figuur geïllustreerd. Op de y-as geeft de blauwe pijl deze drempel van 5% aan. Via de rode pijlen kan men vervolgens aflezen (cq. vanuit het wiskundige model berekenen) welke concentratie (x-as) bij deze effectdrempel van 5% hoort.

estradiol is namelijk een hogere concentratie nodig om eenzelfde effect te veroorzaken dan voor 17alpha-ethinylestradiol. Het is echter een kortdurend experiment (2 dagen). Om representatief te zijn voor een chronische blootstelling wordt de waarde door een factor 10 gedeeld en bedraagt de gestandaardiseerde waarde 0,078 ng EEQ/l.

¹³ Figuur overgenomen uit STOWA (2016b). Rapportnummer 2016-15 E

a2) ecologische effecten ER-CALUX (oestrogene effecten)

De ER-Calux test reageert op een groot aantal stoffen, zoals verschillende natuurlijke en synthetische estrogenen, pseudo-estrogenen, bisfenol A, alkylfenolen, medicijnen en gewasbeschermingsmiddelen.

Binnen de aquatische levensgemeenschap reageren vooral vissen zeer gevoelig op zogenaamde (xeno)estrogenen. Blootstelling aan deze groep stoffen kan bij vissen tot vervrouwelijking leiden, waarbij het om zowel natuurlijke, vrouwelijke hormonen kan gaan als stoffen, die deze hormonen kunnen nabootsen. Bij vissen uit deze vervrouwelkende effecten zich o.a. in de aanwezigheid van het vrouwelijk eiwit vitellogenine in het bloed tot het vóórkomen van eicellen in het testisweefsel van de mannetjes (intersex). Hoe hoger de blootstelling, hoe meer vissoorten in steeds sterkere mate deze effecten zullen laten zien. Dit is echter niet het enige effect. Zo zijn er ook studies die gedragsveranderingen bestuderen of aandacht geven aan effecten op de groei en larvale ontwikkeling van allerlei (on)gewervelden diersoorten. Enkele van deze studies zijn hieronder als voorbeeld benoemd (zie STOWA, 2016b voor een uitgebreidere lijst literatuur).

Noot. In onderstaande voorbeelden gaat het soms om onderzoek met een kortdurende blootstelling. De concentratie waarbij de effecten zijn vastgesteld wordt vervolgens rekenkundig verlaagd omdat de organismen in het milieu langdurend worden blootgesteld. Bij het doornemen van onderstaande tabel moet men zich realiseren dat er bij een bepaalde concentratie in de linker kolom effecten zijn te verwachten, zoals beschreven in de middelste kolom met dien verstande dat die effecten dan bij een langdurende blootstelling verwacht worden (terwijl het in de beschrijving dus wellicht om acute effecten kan gaan). Bijvoorbeeld: als het in de beschrijving gaat over acute sterfte bij een concentratie van 1 µg/l, dan wordt die rekenkundig met een factor 10 verlaagd om rekening te houden met een langdurende blootstelling. In de linkerkolom staat dan een concentratie van 0,1 µg/l. De interpretatie hiervan is dan dat er bij een langdurende blootstelling aan 0,1 µg/l een sterfte onder de genoemde soort wordt verwacht, die op ordegrootte hetzelfde is als bij een hogere concentratie in de acute test werd vastgesteld.

Concentratie (ng EEQ/l)	Ecologisch effect ¹⁾	Referentie (zie STOWA, 2016b voor volledige referentie)
0,078	<u>Gedrag zebravis verandert</u> Mannelijke zebravissen werden gedurende 2 dagen blootgesteld aan 17alpha-ethinylestradiol. Bij een blootstelling aan 0,5 ng/l (0,078 ng EEQ/l) bleek de agressiviteit naar andere mannetjes significant af te nemen en veranderde het paargedrag (en dus het voortplantingssucces).	Colman <i>et al.</i> (2009).
0,47	<u>Groei zebravis vertraagt</u> Een 75 dagen durende blootstelling aan 0,3 ng/l 17alpha-ethinylestradiol (0,47 ng EEQ/l) leidde bij zebravis tot een tragere groei.	Wenzel <i>et al.</i> (2001)
0,52	ESW	
1,2	<u>Verhoogde vitellogenine concentratie in regenboogforel</u> Meerdere vissoorten werden gedurende 7 dagen blootgesteld aan 17alpha-ethinylestradiol. Bij een concentratie van 0,78 ng/l (1,2 ng EEQ/l) liet de regenboogforel een verhoogde vitellogenine concentratie zien. Bij 3 ng/l (4,7 ng EEQ/l) gaven ook blankvoorn en driedoornige stekelbaars vergelijkbare verhogingen te zien, terwijl de eveneens blootgestelde karpers nog geen effect te zien gaven.	Lange <i>et al.</i> (2012)
6,25	<u>Alle blootgestelde blankvoorns werden mannen</u> Blootstelling van jonge, nog niet seksueel gedifferentieerde blankvoorn (<i>Rutilus rutilus</i>) aan 4 ng 17alpha-ethinylestradiol/l (6,25 EEQ/l) gedurende 4 maanden zorgde voor een vervrouwelijking in de mannelijke gonaden en aan het einde van de test waren alle jonge, blootgestelde blankvoorns vrouwen geworden	Lange <i>et al.</i> (2008)
9,4	<u>Larvale ontwikkeling bruine kikker vertraagt</u> Onderzoekers keken naar de effecten van 17alpha-ethinylestradiol op de metamorfose van de bruine kikker (<i>Rana temporaria</i>). Bij een blootstelling aan 6 ng/l (resp. 9,4 ng EEQ/l) bleek de tijdsduur van de uitkomst van het ei tot metamorfose significant langer te duren.	Brande-Lavridsen <i>et al.</i> (2010)
200.000	<u>Groeiremming bij watervlo <i>Daphnia</i></u> De watervlo <i>Daphnia magna</i> werd gedurende 48 uur blootgesteld aan 17β-estradiol. Bij 2 mg/l (resp. 200.000 ng EEQ/l) werd de groei bij 50% van de dieren geremd.	Brennan <i>et al.</i> (2006)

¹⁾ Naast de in de literatuur gegeven blootstellingsconcentratie is ook de gestandaardiseerde waarde tussen haakjes opgenomen (STOWA, 2016b). Bij deze standaardisatie wordt rekening gehouden met de duur van de blootstelling, de mate van effect en de relatieve potentie van de gebruikte stof ten opzichte van die van 17β-estradiol. De waarde is gericht op de concentratie die bij een langdurende blootstelling nog net geen nadelig effect veroorzaakt.

a3) ecologische effecten PAH-CALUX

De PAH-Calux test reageert op een groot aantal stoffen, waaronder PAK's en PCB's maar bijvoorbeeld ook van nature voorkomende stoffen, medicijnen (bijv. cyclophosphamide) en glucocorticosteroiden (bijv. dexamethason). De bioassay reageert via een activatie van de zogenaamde Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). Activatie van deze receptor leidt in levercellen tot een verhoogde activiteit van het cytochroom P₄₅₀-systeem (dat onder andere bij de afbraak van lichaamsvreemde stoffen is betrokken) maar kan ook leiden tot nadelige effecten op ontwikkeling en reproductie, het immuunsysteem en tot carcinogeniteit. De AhR receptor kan door allerlei stoffen worden geactiveerd, waaronder Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen (PAK's) maar bijvoorbeeld ook benzimidazolen en flavonoiden.

Door veel onderzoekers wordt de inductie van de AhR-receptor gezien als een eerste signaal, indicatief voor het (bij verlengde blootstelling) optreden van carcinogene of teratogene effecten. Zo lijkt AhR de groei van tumoren te stimuleren, duidt ander onderzoek op een rol bij auto-immuun ziektes¹⁴ en kan AhR activatie de oestrogene receptor remmen¹⁵. Ook indirecte processen zijn mogelijk. Zo worden PAK's in gewervelde dieren door het cytochroom P₄₅₀ afgebroken. Sommige van de hierbij gevormde metabolieten zijn reactief, kunnen tot mutagene effecten in het DNA en daarmee tot carcinogene en/of teratogene effecten leiden.

Concentratie (ng BaPEQ/l)	Ecologisch effect ^{a)}	Referentie (zie STOWA, 2016b voor volledige referentie)
2	<u>Verminderde reproductie bij vissen (<i>Pimephales promelas</i>)</u> Volwassen vissen werden gedurende 21 dagen blootgesteld aan verschillende concentraties van het geneesmiddel dexamethason. Dit is een matige induceerder van het cytochroom P ₄₅₀ systeem. Blootstelling van volwassen vissen aan 100 ng/l dexamethason veroorzaakte bij mannelijke vissen een verhoogd gonadengewicht. Aangezien dexamethason circa 50 keer minder sterk is dan benzo(a)pyreen wordt de gestandaardiseerde waarde 2 ng BaPEQ/l.	LaLone <i>et al</i> (2012)
14 - 22	<u>Predicted No Effect Concentrations (PNEC)</u> Door zowel Amerika als Europa zijn bestaande toxiciteitstesten met benzo(a)pyreen gebruikt om een drempelwaarde af te leiden, waarboven er effecten op het aquatische ecosysteem optreden (PNEC-waarde). Deze PNEC-waarde bedroeg 14 ng/l (Amerika) dan wel 22 ng/l (Europa). Deze waarde van 22 ng/l was gebaseerd op een studie met oesters (<i>C. gigas</i>). Binnen 48 uur leidde blootstelling aan benzo(a)pyreen tot (schelp)misvormingen van de zich ontwikkelende larven. De EC ₁₀ -waarde was 220 ng/l. Aangezien dit een kortdurende blootstelling betreft werd de veilige concentratie bij een langdurende blootstelling op 22 ng/l vastgesteld.	US-EPA, 1996 EU Risk Assessment Report, 2008
20	<u>Voortplanting van de watervlo <i>Daphnia magna</i> vermindert</u> De voortplanting van watervlooiën, die gedurende 21 dagen aan 20 ng/l benzo(a)pyreen werden blootgesteld, was 33% lager dan in de controle.	Ha & Choi (2009)
41	ESW	
54	<u>Larvale ontwikkeling van vissen (<i>Oryzias latipes</i>) is verstoord</u> Een enkele dagen durende blootstelling aan PCB126 leidde tot effecten op het cardiovasculaire systeem, bloedingen, dooierzak oedeem, misvormingen en vertraging van de zwembblaas ontwikkeling. De EC ₅₀ -waarde (50% effectniveau) was 170 ng/l. Na standaardisatie en correctie voor de korte blootstellingsduur komt dit overeen met 54 ng BaPEQ/l.	Kim & Cooper (1999)
100	<u>Negatieve effecten op vis</u> Vanuit een literatuurstudie rapporteren de auteurs overzichten van de toxische effecten van onder andere benzo(a)pyreen. Voor vis werd een acute EC ₅₀ van 1000 µg/l gevonden. Na correctie voor de kortdurende blootstelling komt dit overeen met 100 ng BaPEQ/l.	Nendza & Wenzel (2006)

^{a)} Naast de in de literatuur gegeven blootstellingsconcentratie is ook de gestandaardiseerde waarde tussen haakjes opgenomen (STOWA, 2016b). Bij deze standaardisatie wordt rekening gehouden met de duur van de blootstelling, de mate van effect en de relatieve potentie van de gebruikte stof ten opzichte van die van benzo(a)pyreen. De waarde is gericht op de concentratie die bij een langdurende blootstelling nog net geen nadelig effect veroorzaakt.

¹⁴ Zie bijv. Yue et al (2020). Front Immunol. 2020; 11: 1510; doi: 10.3389/fimmu.2020.01510;

¹⁵ Zie bijv. Safe et al (2000). Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 5: 295–306.

b) biologische effectmetingen, waarvoor minder uitgebreide kennis over ecologische effecten beschikbaar is (PXR-CALUX)

b1) gebruikte methode voor afleiden van de ESW

In vergelijking met de hierboven genoemde ER- en PAH-CALUX is er voor de PXR-CALUX minder informatie over de ecologische effecten beschikbaar. Het afleiden van een ESW via de bovenbeschreven SSD-methode is daarom niet mogelijk. Bij de normstelling van stoffen wordt er in die gevallen als alternatieve aanpak gekeken naar de laagste NOEC-waarde van de verschillende onderzochte soorten (NOEC = hoogste concentratie, waarbij er nog geen ecologische effecten zijn aangetoond). Deze waarde hangt logischerwijs af van de omvang van de beschikbare gegevens. Is deze dataset klein, dan is de kans groot dat er andere (niet-geteste) soorten zijn met een hogere gevoeligheid, waarvoor deze 'laagste NOEC-concentratie' niet voldoende beschermend is. Om voor deze onzekerheid te corrigeren wordt gewerkt met veiligheidsfactoren. Is de dataset klein dan wordt de aangetroffen 'laagste concentratie' gedeeld door bijvoorbeeld een factor 10 of 100 om zo de grenswaarde vast te stellen. Is de dataset groter, dan kan met een kleinere veiligheidsfactor worden volstaan. Ook voor de PXR-Calux is deze methode uitgewerkt, maar de ESW is uiteindelijk gebaseerd op de respons, die op acht schone locaties werd aangetroffen (Ecofide, 2024).

Voor de PXR-CALUX ligt de ESW op 16 µg NicEQ/l¹⁶. In de bijlagen van STOWA (2016b) is een overzicht van de beschikbare literatuur opgenomen, die als een opzoeklijst kan werken: met de vastgestelde ESW kan men in deze lijst nazoeken voor welke soorten wat voor type effecten zijn vastgesteld. Dit is hieronder nader toegelicht. Daarmee geeft deze literatuur ook inzicht in de aard van de ecologische effecten, die bij overschrijding van de ESW verwacht kunnen worden.

b2) ecologische effecten PXR-CALUX (omzetting giftige stoffen)

De PXR-Calux test reageert op een groot aantal stoffen, waaronder gewasbeschermingsmiddelen (bijv. alachloor, bentazon en chloorpyrifos), PAK's, alkylfenolen, triazine pesticiden, medicijnen en PCB's.

De PXR-CALUX is gebaseerd op activatie van de pregnane X-receptor. Deze activatie leidt tot een verhoogde activiteit van het enzym Cyp_{3A4}, dat bij de afbraak van allerlei lichaamsvreemde stoffen betrokken is. De vaste referentiestof van deze PXR-CALUX is nicardipine, een medicijn dat bloedvaten verwijdt en bloeddruk verlaagt. Aangezien het enzym Cyp_{3A4} een grote groep milieuvreemde stoffen kan afbreken, heeft de PXR-CALUX een brede gevoeligheid voor allerlei stoffen, waaronder gewasbeschermingsmiddelen, PAK's, geneesmiddelen en alkylfenolen.

Door dit brede pakket aan werkzame stoffen kent de relatie tussen een PXR-respons en de ecologische effecten ook veel variatie. Zo hebben de PAK benzo(k)fluorantheen en het insecticide chloorpyrifos-ethyl een even sterke werking op de PXR-receptor, maar zijn de ecologische effecten van chloorpyrifos-ethyl vele malen groter (chloorpyrifos-ethyl heeft een specifiek werkingsmechanisme, terwijl het bij benzo(k)fluorantheen om narcose gaat¹⁷). De laagste effect concentratie is dan ook een waarde van 1 ng/l chloorpyrifos uit een acute toxiciteitsstudie van Ha & Choi (2009; zie hieronder). Dit komt overeen met 0,00002 µg NicEQ/l. Onderzoek op een aantal schone referentielocaties (Ecofide, 2024) liet echter zien dat de PXR-activiteit daar al veel hoger was (gemiddeld 15,9 µg NicEQ/l). Vanuit praktische toepasbaarheid en onderscheidend vermogen is de ESW daarom op 16 µg NicEQ/l vastgesteld (Ecofide, 2024). Deze variatie in respons betekent dat de zekerheid, waarmee een overschrijding van de ESW indicatief is voor het optreden van daadwerkelijke ecologische effecten in het ontvangend oppervlaktewater, kleiner is in vergelijking met de hierboven beschreven onderbouwing voor de ER-Calux en PAH-Calux.

¹⁶ Voor de PXR-CALUX is de referentie stof nicardipine (vandaar NicEQ: Nicardipine Equivalenten).

¹⁷ Dit wordt ook wel omschreven als 'base-line toxicity' (basistoxiciteit): de minimale toxiciteit die een organische contaminant veroorzaakt. Eventuele specifieke werkingsmechanismen kunnen de toxiciteit vervolgens versterken.

Concentratie (µg NicEQ/l)	Ecologisch effect ¹⁾	Referentie (zie STOWA, 2016b voor volledige referentie)
0,00002	<u>Effecten op hemoglobine en voortplanting van watervlooien</u> Blootstelling van watervlooien (<i>D. magna</i>) aan 1 ng/l chloorpyrifos leidde tot een verhoogde genexpressie voor hemoglobine. Deze verhoogde genexpressie correleerde (als early-warning) met effecten op de voortplanting.	Ha & Choi (2009)
0,0064	<u>Predicted No Effect Concentrations (PNEC) voor antracene</u> Door het RIVM zijn bestaande toxiciteitstesten met antracene verzameld en gebruikt om een drempelwaarde af te leiden, waarboven er effecten op het aquatische ecosysteem optreden (PNEC-waarde). Deze PNEC-waarde bedraagt 100 ng/l (gebaseerd op een acute toxiciteitstest met de watervlo <i>D. magna</i>) overeenkomend met 6,4 ng NicEQ/l.	EU Risk Assessment Report, 2008
0,021	<u>Sterfte bij vissen</u> In een andere studie met antracene werd gekeken naar de sterfte van vissen (<i>Lepomis macrochirus</i>), die vijf dagen werden blootgesteld. Afhankelijk van watertemperatuur, zuurstofgehalten en UV-belichting varieerde de LC ₅₀ -waarde tussen 3360 en 11920 ng/l (overeenkomend met 21 – 76 ng NicEQ/l).	McCloskey & Oris (1991)
6,0	<u>Groeiremming bij algen</u> Bij een 5-daagse blootstelling van algen aan het herbicide simazine werd een NOEC-waarde van 30 µg/l vastgesteld. Dit komt overeen met 6,0 µg NicEQ/l. Dit betrof zowel de diatomee <i>Navicula pelliculosa</i> als de groenalg <i>Selenastrum capricornutum</i> .	US-EPA (2013)
9,1	<u>Biochemische veranderingen in vissen</u> Na een blootstelling van 20 dagen aan 45 µg/l chloorpyrifos bleken de eiwit, koolhydraten en cholesterol gehalten in kieuwen, levers, spieren en nieren van de vis <i>Oreochromis mossambicus</i> significant te zijn verlaagd.	Saradhamani & Kumari (2011)
16	ESW	
20,2	<u>Larvale-ontwikkeling bij amfibieën</u> Bij een blootstelling aan chloorpyrifos gedurende 14 dagen bleek de larvale sterfte vanaf circa 500 µg/l sterk te stijgen (>50%). Bij dergelijke concentraties (>500 µg/l) trad er ook groeiremming, vertraagde zwemactiviteit en een verlate metamorfoses op. De NOEC-waarde was 100 µg/l, overeenkomend met 20,2 µg NicEQ/l.	Wijesinghe <i>et al.</i> (2011)
23,2	<u>Voortplanting bij watervlooien</u> Na een blootstelling van 21 dagen aan 230 µg/l alachlor bleken er nadelige effecten op de reproductie van watervlooien op te treden. Dit komt overeen met 23,2 µg NicEQ/l.	US-EPA (2013)

¹⁾ Naast de in de literatuur gegeven blootstellingsconcentratie is ook de gestandaardiseerde waarde tussen haakjes opgenomen (STOWA, 2016b). Bij deze standaardisatie wordt rekening gehouden met de duur van de blootstelling, de mate van effect en de relatieve potentie van de gebruikte stof ten opzichte van die van nicardipine. De waarde is gericht op de concentratie die bij een langdurende blootstelling nog net geen nadelig effect veroorzaakt.

c) biologische effectmetingen, waarvoor de ESW vanuit meer algemene kennisregels zijn vastgesteld (Microtox, Cytotox-Calux, P53-Calux)

Het afleiden van een ESW voor biologische effectmetingen met levende organismen begint met een uitgangspunt: Het waterkwaliteitsbeleid moet ervoor zorgen dat organismen in het oppervlaktewater geen nadelige effecten van milieuverontreinigingen ondervinden, ook niet bij een langdurige blootstelling. In RIZA (2003) is dit nader omschreven als het Maximaal Toelaatbaar Effect = geen effecten bij een chronische blootstelling voor drie soorten. In dit rapport is ook beschreven dat een algemeen geaccepteerde, generieke factor voor het verschil in de gevoeligheid van testen met een kortdurende (acute EC₅₀ ¹⁸⁾ dan wel langdurende

¹⁸ EC₅₀-waarde = de concentratie waarbij de helft van de organismen in de test een nadelig effect ondervindt. NOEC=No Observed Effect Concentration

(chronische NOEC) blootstelling een factor 10 bedraagt¹⁹. Voor acute testen is het Maximaal Toelaatbaar Effect in RIZA (2003) daarom omschreven als 'geen effecten bij een acute blootstelling voor drie soorten aan 10 keer geconcentreerd oppervlaktewater'. Vervolgens is beredeneerd (zie Van der Oost *et al.*, 2017; De Baat *et al.*, 2021) dat men bij het maken van een extract nooit alle stoffen volledig zal extraheren. Dit verlies tijdens extractie zal per stof verschillen en is ook niet voor alle stoffen bekend. Op pragmatische gronden is dit extractierendement op 50% gezet. Het Maximaal Toelaatbaar Effect bij acute testen kan dan worden herschreven als 'bij een acute blootstelling aan 20* geconcentreerd oppervlaktewater mag er bij geen van de drie soorten meer dan 50% effect optreden' of te wel de ESW voor de EC₅₀ is 20* geconcentreerd. Vanwege de gewenste synergie met chemische concentraties (hoe hoger de waarde, hoe hoger het risico) wordt bij biologische effectmetingen met organismen gewerkt met een zogenaamde Toxic Unit²⁰. Deze Toxic Unit waarde wordt berekend als 1/EC₅₀-waarde uitgedrukt in concentratiefactoren. De ESW voor Toxic Units is dan dus $1/20 = 0,05$. Deze ESW geldt voor de bacterie in de Microtox-test maar is ook van toepassing op de Cytotox-test. In de Cytotox-test is de effectparameter ook gericht op de cel als geheel (cel-dood), terwijl andere Calux-testen zich op meer specifieke, biochemische reacties richten. Voor de ESW van de P53-Calux geldt een aanvullende bepaling (STOWA, 2016a): *Bij de normstelling van genotoxische stoffen, die mogelijk tot tumorvorming kunnen leiden (kankerverwekkend), wordt ervan uitgegaan dat er geen veilig niveau is. De kansen nemen wel af bij lagere blootstelling, maar er blijft altijd een theoretische kans op effecten bestaan. Bij het interpreteren van bioassays voor genotoxiciteit (bijv. Ames, umuC en p53 CALUX) geldt hetzelfde en liggen de risico's hoger dan voor chronische toxiciteit. Hierom zijn de effect signaalwaarden, zoals die voor de algemene bioassays zijn afgeleid, nogmaals een factor 10 verlaagd, waardoor een laag-risico signaalwaarde van 0,005 TU (meetbare genotoxiciteit bij een 200x geconcentreerd monster) wordt voorgesteld. Om verwarring bij de rapportage te voorkomen zijn deze effect-signalwaarden voor de Cytotox en P53-Calux op basis van bestaande datasets omgerekend naar waarden op basis van de hoeveelheid referentiestof en naar boven afgerond als de berekende waarde onder de bepalingsgrens lag (P53-Calux).* Zie ook de tabel op pagina 7 ter toelichting.

Overschrijding van de ESW betekent primair dat er toxische effecten op het betreffende organisme worden verwacht. De Microtox-test is gebaseerd op een verstoring van de citroenzuurcyclus en daarmee op een in alle organisme voorkomend energiesysteem. RIVM (2007) refereert bijvoorbeeld aan een studie van Cronin *et al* (1991), waarin resultaten van de Microtox-test sterk aan visdata zijn gecorreleerd. Overschrijding van de ESW in de Microtox-test kan dus breder worden gezien als een aanduiding dat er bij allerlei organismen in het oppervlaktewater effecten op kunnen treden. Daarnaast geldt voor alle testen, dat hoe groter de overschrijding hoe meer soorten nadelige effecten in het oppervlaktewater zullen ondervinden.

d) Verbanden tussen effecten in RWZI-effluent en ecologische effecten in ontvangend oppervlaktewater

Oestrogene effecten

In de huidige handreiking worden deze effecten vastgesteld met de ER-Calux test. In de literatuur worden ook andere, vergelijkbare *in vitro* assays gebruikt, zoals de YES-assay. In gewervelde dieren, zoals vissen, is de gelijkwaardige tegenhanger het vaststellen van vitellogenine-gehalten.

Abegglen et al (2009). Ozonung von gereinigtem Abwasser. Schlussbericht Pilotversuch Regensburg. EAWAG.

De ozon-behandeling leidde tot een significante afname van de oestrogene effecten (YES-assay) in het effluent. Tegelijkertijd werd vastgesteld dat de inductie van vitellogenine in larven van de regenboogforel blootgesteld aan het reguliere RWZI-effluent, na de ozon-behandeling niet langer werd aangetroffen. Overigens werd in dit onderzoek ook een verbetering van de macrofaunagemeenschap vastgesteld. Deze verbeteringen betroffen vooral een toename van het aantal gevoelige soorten (van 18 naar 30%), terwijl het totaal aantal soorten ongeveer gelijk bleef. De aangetroffen toename van het aantal gevoelige soorten, betekende volgens de auteurs dat de EKR-score ongeveer met 1 klasse toeneemt (van in dit geval ontoereikend naar matig). Belangrijk element in deze studie was het feit dat een aantal jaren na het stopzetten van de ozon-behandeling het aantal gevoelige macrofauna soorten weer op het oude (lage) niveau lag.

¹⁹ Die factor 10 geldt daarmee voor een vergelijking van de concentratie, die bij een kortdurende blootstelling 50% effect veroorzaakt, en de concentratie die bij een langdurende blootstelling nog net geen effect veroorzaakt.

²⁰ Voor acute testen wordt gewerkt met de EC₅₀-waarde als effectsignaal

Effecten op de Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)

In de huidige handreiking worden effecten op deze receptor vastgesteld met de PAH-Calux test. In de literatuur worden ook andere, vergelijkbare *in vitro* assays gebruikt, zoals de H4IIE-luc assay. In gewervelde dieren, zoals vissen, is de gelijkwaardige tegenhanger het vaststellen van de EROD-activiteit²¹.

Maier et al (2016). Reduction of dioxin-like toxicity in effluents by additional wastewater treatment and related effects in fish. Ecotox and Environ Safety 132: 47-58.

Dit onderzoek werd bij twee RWZI's uitgevoerd. Met de *in vitro* test (H4IIE-luc assay) werd vastgesteld dat de effecten in RWZI-effluent afnemen door (combinaties van) ozon en poederkool. Behaalde reducties varieerden tussen de 50 en 90%. Tegelijkertijd nam ook de EROD-activiteit in blootgestelde vissen (regenboogforel) af. Voorafgaand aan de vergaande zuivering waren deze EROD-waarden in benedenstrooms blootgestelde vissen groter dan op de bovenstroomse situatie, terwijl dit verschil na installatie van de vergaande zuiveringstechniek verdween. Daarmee kwamen de effecten in vissen overeen met hetgeen op basis van de *in vitro* testen werd verwacht.

Effecten in de Microtox test en organismen in het oppervlaktewater

Harth et al (2019). Small but with big impact? Ecotoxicological effects of a municipal wastewater effluent on a small creek. J Environ Sci Health A; 53(13): 1149-1160.

Met de Microtox-test en in experimenten met vlokreeften (*Gammarus spec*) werd vastgesteld dat de toxiciteit van zowel het RWZI-effluent als het benedenstrooms bemonsterde oppervlaktewater hoger was dan in het bovenstrooms bemonsterde oppervlaktewater. Ook in veldtesten, waarbij vlokreeften direct aan het oppervlaktewater werden blootgesteld, werd op de benedenstroomse locatie een hogere sterfte vastgesteld dan op de bovenstroomse locatie.

Bij deze RWZI werd geen vergaande zuivering toegepast, maar werd de RWZI in zijn geheel opgeheven. In de experimenten, die na deze sluiting werden uitgevoerd, werd telkens een lager effect op de benedenstroomse locatie aangetroffen en nam het verschil tussen de boven- en benedenstroomse locatie af.

Bovenstaande voorbeelden komen uit een beknopte literatuurstudie²² naar de vraag of de implementatie van vergaande zuivering van RWZI-effluenten kan leiden tot positieve ontwikkelingen op de aquatische levensgemeenschap in het ontvangende oppervlaktewater.

²¹ EROD = Ethoxyresorufin-O-deethylase; EROD-activiteit meet de snelheid waarmee het substraat 7-ethoxyresorufin (7-ER) door CYP1A-gestuurde enzymactiviteit wordt omgezet. De EROD-activiteit wordt meestal in levers bepaald.

²² Ecologische effecten van vergaande zuiveringen van RWZI-effluent; een beknopte literatuurstudie. Ecofide (2019).