

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

versie 0.7, 03-04-2020

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 grootschalige 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 water. Deze verbetering wordt beoordeeld aan de hand van zowel chemische analyses als biologische effectmetingen. De huidige handreiking beschrijft de manier waarop de biologische effectmonitoring moet worden uitgevoerd en de resultaten worden geïnterpreteerd om zo een betrouwbare vergelijking van de verschillende demonstratieprojecten mogelijk te maken. Voor andere aspecten als bemonstering en analyse van enkele chemische stoffen, CO₂-footprint en berekening van de kosten wordt aan vergelijkbare acties gewerkt.

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. Dit is bijvoorbeeld het geval als de vergaande zuiveringstechniek niet als aparte unit maar integraal in het bestaande zuiveringsproces wordt opgenomen, zoals het geval is bij poederkooldosering aan actief slib bekkens.

Planning

De monsternamen worden bij voorkeur 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 vergaande zuivering 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.

a) Monstername

Voor de monstername wordt aangesloten bij de bemonsteringsmethode voor de chemische monitoring van vergaande zuivering van RWZI-effluenten, zoals beschreven in de voorlopige werkinstructie¹ (kortweg 'werkinstructie chemie v0.7) Deze werkwijze kan in de tijd nog wijzigen o.a. door voortschrijdend inzicht o.a. in de variabiliteit van de aanwezigheid van microverontreinigingen in het RWZI-afvalwater. In de werkinstructie wordt op basis van de huidige inzichten uitgegaan van een 48 uren debietproportionele bemonstering. Voor RWZI's ≤ 100.000 i.e. mag tijdproportioneel worden bemonsterd als dit ook is toegestaan bij de reguliere monstername van de klassieke parameters op desbetreffende RWZI. Uit praktische overwegingen kan gekozen worden voor 1x48 uur of voor 2x24 uur bemonstering, afhankelijk van de beschikbare bemonsteringsapparatuur. Er moet apparatuur beschikbaar zijn om gelijktijdig het reguliere RWZI-effluent als het vergaand gezuiverde effluent te verzamelen. Hierbij hoeft geen rekening te worden gehouden met de verblijftijd van het water in de vergaande zuiveringstechniek, omdat deze doorlooptijd doorgaans kort is.

In de werkinstructie chemie 0.7 wordt de volgende stappenplan gehanteerd voor het vaststellen van een DWA-bemonstering:

Vaststellen DWA-bemonstering

Stappenplan:

1. Bepaal het intreegebied van de RWZI (geografische ligging innamestelsels).
2. Bepaal de ledigingstijd in het rioolstelsel*.
3. Verzamel de influent dagdebieten van de drie voorgaande jaren**
4. Ga voor de drie voorgaande jaren na op welke data er sprake was van neerslag in het intreegebied.
5. Elimineer de dagdebieten van de dagen waarop er neerslag is gevallen in het intreegebied
6. Elimineer de dagdebieten van de dagen nadat er neerslag is gevallen in het intreegebied op basis van de onder punt 2 bepaalde ledigingstijd in het rioolstelsel.
7. De overgebleven dagen bevatten droogweeraanvoer in m³/d, zonder significante regenweeraanvoer. Bepaal op basis van deze dataset de *gemiddelde droogweeraanvoer* en de spreiding in deze droogweeraanvoer op basis van de *standaarddeviatie*.
8. De bemonstering is geldig, indien het influentdebiet in m³/d *kleiner* is dan: *de gemiddelde droogweeraanvoer+standaarddeviatie + 20% x (gemiddelde droogweeraanvoer+standaarddeviatie)****

Voor het uitvoeren van een juiste bemonstering, verdient het nadrukkelijk de voorkeur om bovenstaand stappenplan door te lopen.

Indien bovenstaand stappenplan niet kan worden uitgevoerd, geldt de volgende versimpelde methode:

1. Verzamel de influent dagdebieten in m³/d van de drie voorgaande jaren**.
2. Bepaal de *mediaan (=50-percentiel waarde)* van de dagdebieten
3. De bemonstering is geldig, indien het influentdebiet in m³/d *kleiner* is dan: *1,3 x mediaan dagdebieten*

* De ledigingstijd is gelijk aan de stelselberging (in m³) gedeeld door de pompovercapaciteit (in m³/h). Indien geen sprake is van doorpompsystemen (rioolstelsels in cascade) mag ook de indicatieve ledigingstijd bepaald worden. Deze is gelijk aan de stelselberging (in m³) gedeeld door de geïnstalleerde pompcapaciteit (in m³/h).

** Indien influentdebieten niet beschikbaar zijn, kunnen effluentdebieten worden gebruikt.

*** De marges in beide berekeningsmethoden zijn opgenomen om te voorkomen dat bemonsteringen worden afgekeurd door variatie in DWA-aanvoer over het jaar en/of lichte regenval. Op basis van deze methoden worden bemonsteringen afgekeurd, indien de daggemiddelde verhouding RWA/DWA hoger is dan circa 1,35 (d.i. afhankelijk van afvoerpatroon van RWZI)

¹ Voorlopige werkinstructie bemonstering en chemische analyse medicijnresten in RWZI-afvalwater t.b.v. bijdrageregeling 'Zuivering medicijnresten' (IenW) en innovatieprogramma 'Microverontreinigingen uit RWZI-afvalwater' (STOWA/IenW) (versie 0.7, 3 april 2020).

b) Laboratorium werkzaamheden

Apparatuur voor het uitvoeren van een LVSPPE-extractie op de verzamelde monsters

Keuze LVSPPE i.p.v. XAD of passive samplers

Om een onderbouwde keuze tussen deze drie monsternamen en extractie methoden te kunnen maken is in 2018 op een drietal RWZI's nader onderzoek uitgevoerd (Waternet & Ecofide, 2019)². Ten opzichte van de XAD-methode en het toepassen van passive samplers, heeft de LVSPPE-methode de volgende voordelen:

- Het bemonsterde volume is exact bekend. Variaties in het geëxtraheerde volume (relevant voor passive samplers) in de tijd, tussen regulier en vergaand gezuiverd afvalwater of tussen RWZI's spelen daarmee geen rol in de resultaten (voordeel t.o.v. passive samplers)
- Chemisch analytisch komen de geëxtraheerde concentraties het best overeen met de concentraties in het niet geëxtraheerde effluent (voordeel t.o.v. XAD en passive samplers).
- Het bemonsterde water kan gesplitst worden voor uitvoering van diverse analyses voordat extractie heeft plaatsgevonden. Chemische analyses aan het ruwe water kunnen daarmee aan hetzelfde monster worden uitgevoerd als de extracties (voordeel t.o.v. passive samplers)
- Uit zogenaamde non-target screenings blijkt dat de LVSPPE-methode meer stoffen en in grotere hoeveelheden extraheert (voordeel t.o.v. XAD)
- De bemonstering voor LVSPPE sluit goed aan bij de reguliere bemonsteringsmethode op RWZI's (voordeel t.o.v. passive samplers)
- De methode is goed uitvoerbaar voor ILOW en commerciële laboratoria (voordeel t.o.v. passive samplers)

Bemonstering

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.

Is er sprake van een pilot-opstelling op een deelstroom, dan kan het reguliere effluent ook in de parallel lopende stroom worden bemonsterd³ en vergeleken met de afloop van de vergaande zuiveringstechniek.

Tijdsduur en mengmonsters

Om een directe relatie met de resultaten van de chemische analyses te waarborgen, wordt de monsternamen op eenzelfde manier uitgevoerd volgens de 'werkinstructie chemie v0.7' en kunnen de chemische analyses en de biologische effectmetingen aan dezelfde monsters worden uitgevoerd.

Vooralsnog is het volume dat nodig is voor het uitvoeren van de biologische effectmetingen doorslaggevend. Voor het uitvoeren van zowel de chemische analyses als de biologische effectmetingen is in totaal maximaal 8 liter afvalwater benodigd.

Er wordt bij voorkeur op doordeweekse dagen bemonsterd, aangezien de belasting van RWZI's in het weekend kan afwijken (bijv. als gevolg van verminderde activiteiten in ziekenhuizen). De verschillende monsters worden direct na verzamelen koel opgeslagen en na afloop van de monsternamen periode gekoeld naar het laboratorium vervoerd waar het mengmonster kan worden samengesteld. Het mengmonster van 8 liter wordt vervolgens gesplitst in een deelmonster van 2 liter voor chemische analyses en eventuele algemene parameters en een

² Waternet & Ecofide (2019). Doorontwikkeling van monitoring van biologische effectmetingen in RWZI-effluent. Vergelijking tussen extraheren met XAD, LVSPPE of gebruik van passive samplers.

³ Op deze manier kan voor het reguliere effluent meestal gebruik worden gemaakt van de al aanwezige monsternamen apparatuur.

deelmonster van 6 liter voor extractie met LVSPÉ ten behoeve van de biologische effectmetingen (zie hieronder). Mochten er geen chemische analyses en/of meer algemene parameters geanalyseerd worden, dan kan logischerwijs met een monster van 6 liter worden volstaan. Ook in die gevallen blijft het essentieel om het reguliere RWZI-effluent en het effluent van de vergaande zuiveringstechniek op een vergelijkbare manier te bemonsteren.

Noot

Het huidige voorschrift is gebaseerd op de thans beschikbare informatie over biologische effectmetingen op RWZI-effluenten. Tegelijkertijd is het aantal monsters dat met de LVSPÉ-methode is geconcentreerd nog beperkt. Daarmee is er nog enige onzekerheid over de gemaakte keuzes. Op termijn wordt verwacht dat men bij de monsternamen kan volstaan met een monsterhoeveelheid van in totaal 4 liter voor de biologische effectmetingen. Voorsnog wordt een iets ruimere hoeveelheid bemonsterd, zodat hogere concentratiefactoren bereikt kunnen worden, testen indien nodig herhaald kunnen worden of de gekozen set biologische effectmetingen (beperkt) kan worden uitgebreid. Door nu met het huidige voorschrift verdere ervaring op te doen, kan over een jaar besloten worden of het voorschrift verder moet worden aangescherpt. Verder kunnen door voortschrijdend inzicht door lopend onderzoek naar de chemische monitoring naar o.a. de variabiliteit van de samenstelling van RWZI-afvalwater nadere aanwijzingen komen over bijvoorbeeld de gewenste periode en duur van de bemonstering. Dit betreft dan niet alleen een verdere aanscherping van de voorlopige 'werkinstructie chemie v0.7', maar ook deze voorlopige handreiking voor biologische monitoring van RWZI-effluenten, zodat zowel voor biologische effectmetingen als voor chemische analyses zo veel mogelijk dezelfde bemonsteringsprocedure gevolgd wordt met oog op vergelijkbaarheid van de meetgegevens.

Wat te doen bij afwijkende situaties

Ondanks een goede voorbereiding kunnen er tijdens de monsternamen altijd onverwachte zaken optreden. Om vast te stellen hoe hier mee om te gaan, zijn hieronder drie voorbeelden beschreven. Belangrijkste in de te maken keuze is het uitgangspunt dat de monsters zonder en met vergaande zuiveringstechniek altijd zo vergelijkbaar mogelijk moeten zijn.

* Het verzamelde volume op dag x is minder dan beoogd

De voorkeursoptie is om alle monsters van de betreffende dag weg te gooien en niet mee te nemen in het mengmonster, om vervolgens de monsternamenperiode met één dag te verlengen.

Mocht dit niet mogelijk zijn dan kan ook besloten worden om het monster wel mee te nemen, maar dan dient ook het simultaan bemonsterde volume van het 'tweede' monster te worden teruggebracht. Met 'tweede' monster wordt het parallel verzamelde monster bedoeld van respectievelijk het reguliere RWZI-effluent dan wel het effluent van de vergaande zuiveringstechniek, zodat in beide gevallen het mengmonster op dezelfde manier wordt samengesteld. In die gevallen moet er op de resterende dagen iets meer bemonsterd worden om toch op het eindvolume van 8 liter uit te komen.

* De zuivering heeft 's nachts niet naar behoren gefunctioneerd

Het monster van die dag is daarom niet representatief en dient niet te worden meegenomen in het verzamelmonster. De bemonsteringsperiode daarom met één dag verlengen. "Niet naar behoren gefunctioneerd" is een moeilijk in te kaderen begrip. Meer kwalitatief wordt het omschreven als een situatie, die door het personeel van de RWZI als een zeer afwijkende situatie wordt gezien, waarbij de routinematige parameters laten zien dat het zuiveringsproces niet optimaal heeft verlopen.

* Er is toch een situatie van regenwaterafvoer tijdens de bemonstering opgetreden.

Als de hoeveelheid aangevoerd RWZI-water de in bovenstaande box "Vaststellen DWA-bemonstering" waarde overschrijdt dan is deze monsternamen niet bruikbaar. Afhankelijk van de te verwachten hoeveelheid neerslag zal de bemonsteringsperiode met één dag moeten worden verlengd of op een later tijdstip opnieuw ingepland. Dit verschilt per RWZI en is afhankelijk van het aanvoerpatroon van het afvalwater naar de RWZI.

Opwerken van de monsters

LVSPE-extractie

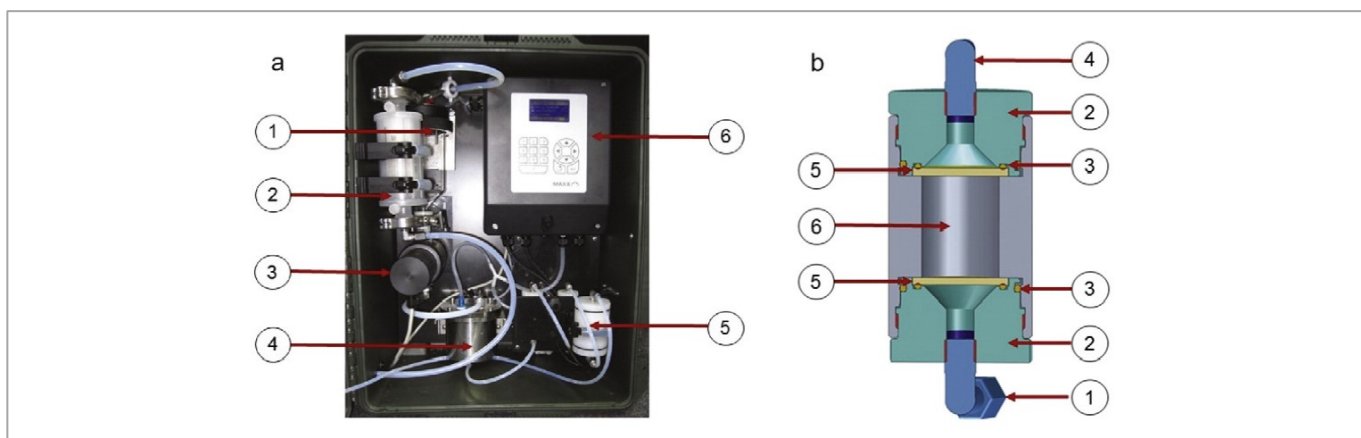
De te gebruiken procedure is in detail beschreven door Schulze et al (2017)⁴ en wordt hieronder samengevat. Van het te concentreren effluentmonster wordt eerst het exacte volume bepaald (voor latere berekeningen) en vervolgens worden de aanwezige organische microverontreinigingen geëxtraheerd middels een LVSPE extractie (Large Volume Solid Phase Extraction). De hierbij te gebruiken kolom wordt voorbehandeld middels een Soxhlet of Soxtec clean-up om eventuele aanwezige verontreinigingen te verwijderen. Vervolgens wordt de kolom geconditioneerd door deze met 200ml ethylacetaat (EtAc), 200ml methanol (MeOH) en ten slotte 100 ml ultrapuur water (LC-MS kwaliteit) voor te spoelen. Voor de extractie kan gebruik worden gemaakt van een commercieel verkrijgbaar LVSPE-apparaat (zie onderstaande illustratie). In dat geval wordt het effluentmonster via een vacuüm door het apparaat opgezogen en opgevangen in een doseersysteem. Dit water wordt vervolgens onder overdruk (100 kPa) door de van te voren geconditioneerde kolom met adsorberend materiaal geleid. Omdat het goedkoper is, zal ik de praktijk gebruik worden gemaakt van een vergelijkbare laboratorium-opstelling, waarbij alle procedures, clean-up stappen en zowel de aard als de hoeveelheid van het adsorbens gelijk wordt gehouden.

!! In tegenstelling tot de voorbehandeling, zoals beschreven in de voorlopige 'werkinstructie chemie v0.7' vindt bij het opwerken van de monsters t.b.v. de biologische effectmetingen voorafgaand aan de extractie voorfiltratie (zwartband filter) plaats. Dit gebeurt uit praktische overwegingen om verstopping bij de extractie te voorkomen. Verder worden de monsters **niet** voorbehandeld met methanol, omdat dit invloed heeft op het extractierendement.

In principe kan het LVSPE-apparaat en elke laboratorium-opstelling het monster sequentieel over verschillende kolommen leiden met telkens een iets ander adsorberend materiaal. Voor de huidige handreiking is voornamelijk gekozen om met één kolom te werken en deze te vullen met 10g Chromabond® HR-X materiaal⁵. Ook deze keuze is gebaseerd op de resultaten van 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 adsorbens zullen er altijd stoffen zijn die minder goed geëxtraheerd worden.

Illustratie van een LVSPE – apparaat afkomstig uit Schulze et al (2017)

(a) Afbeelding van het LVSPE50-apparaat; (1): Doseersysteem (500 ml), (2): voorfilter (3): kogelklep, (4): drukkamer (550 ml), (5): extractiepatroon, (6): controller (Foto MAXXGmbH); (b) Schema van het LVSPE50 patroon, lichaam en schroefdooppen, gemaakt van polyvinylideenfluoride; (1): inlaat, (2) onderste en bovenste schroefdeksel met doorvoergaten (3) siliconen afdichting (O-ringen), (4) uitlaat, (5) glazen filterschijf, (6) kolom met HR-X sorbent



⁴ 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.

⁵ Hydrophobic polystyrene-divinylbenzene copolymer

Na extractie kunnen de kolommen in aluminiumfolie worden gewikkeld en enige tijd koel worden bewaard of direct worden opgewerkt. Bij deze opwerking wordt er eerst gedurende 1 uur stikstof over de kolom geleid om resterend water te laten verdampen, waarna de kolommen gedurende 8 uur worden gevriesdroogd. De HR-X kolom wordt vervolgens geëxtraheerd met 100 ml ethylacetaat en 100 ml methanol. Het volume van dit verkregen extract wordt in een "draaiverdamper" (Rotavap, Turbovap) gereduceerd en uiteindelijk met een 1:1 mengsel van ethylacetaat en methanol aangepast tot een uiteindelijke concentratiefactor van 2000 (6 l effluent levert dan een sample van 3 ml op). Ten slotte worden uit dit monster enkele sub-monsters gehaald voor de verschillende biologische analyses.

Biologische effectmetingen

In de voor oppervlaktewater ontwikkelde methodiek (Sleutelfactor Toxiciteit; STOWA, 2016⁶) worden in totaal 15 verschillende bioassays toegepast. Deze bioassays hoeven echter niet allemaal geanalyseerd te worden om toch een betrouwbare beoordeling van de effectiviteit van vergaande zuiveringstechnieken alsmede van de ecotoxicologische risico's van RWZI-effluenten voor het ontvangende oppervlaktewater mogelijk te maken. Naar analogie met de keuze van gidsstoffen voor de chemische monitoring is daarom ook voor de biologische effectmetingen een nadere selectie gemaakt. De hiervoor gehanteerde argumenten staan hieronder vermeld.

Keuze biologische effectmetingen

Bij de keuze voor de biologische gidsparameters (bioassays) hebben de volgende criteria een rol gespeeld:

- De bioassay moet bij het merendeel van de RWZI-effluenten een meetbare respons (>RG) geven
Argument: voorkómen van resultaten, die onder de rapportagegrens liggen
- Een substantiële afname in effect door de vergaande zuivering moet betrouwbaar kunnen worden vastgesteld
Argument: de effectiviteit van de vergaande zuivering kan alleen nauwkeurig worden bepaald als beide monsters (regulier RWZI-effluent en vergaand gezuiverd effluent) meetbare responses geven.
- De bioassay moet relevante informatie geven over de verwachte ecologische effecten in het ontvangend oppervlaktewater
Argument: Toepassen van vergaande zuivering moet naast een verbetering van de chemische waterkwaliteit resulteren in lagere ecotoxicologische risico's voor het ontvangend oppervlaktewater. Hoe eenduidiger men de relatie tussen de toegepaste bioassay en het te verwachten (negatieve) effect in het ontvangend watersysteem kan maken, hoe geschikter de bioassay.
- De bioassay moet in de praktijk goed toepasbaar zijn.
Argument: De bioassay moet algemeen uitgevoerd kunnen worden, niet te specialistisch zijn, betaalbaar, voldoende betrouwbaar, met een aanvaardbare reproduceerbaarheid, etc
- De set bioassays moet elkaar onderling versterken en aanvullen
Argument: Alhoewel medicijnresten veel aandacht krijgen is de inzet van vergaande zuiveringstechnieken gericht op het verminderen van de milieubelasting van een zo groot mogelijk aantal stoffen met de nadruk op relatief polaire, goed oplosbare, moeilijk afbreekbare stoffen (waaronder medicijnresten). De set bioassays moet deze breedte zo goed mogelijk representeren. Als twee bioassays op eenzelfde groep stoffen reageren en tot vergelijkbare ecotoxicologische risico's leiden is de onderlinge toegevoegde waarde echter beperkt.

De getalsmatige uitwerking van deze criteria is opgenomen in de bijlage. Dit heeft tot onderstaande keuze geleid, waarbij er voor vier biologische effectmetingen is besloten dat die in ieder geval deel uit maken van de definitieve set. Daarnaast zijn er twee bioassays die nuttige aanvullende inzichten kunnen opleveren, maar waarvoor de ervaringen nog te beperkt zijn om nu al een definitieve keuze te maken. Deze worden voorlopig nog een tijdje meegenomen vanwege het 'lerend implementeren' motto. Tenslotte is er één bioassay, gericht op genotoxiciteit en mutageniteit, waarvoor wordt aanbevolen om die op te nemen in het geval de vergaande zuiveringstechniek op oxidatieve technieken (zoals ozon) betrekking heeft. Daarnaast wordt momenteel binnen het Kennisimpuls Waterkwaliteit (KIWK) project "Toxiciteit" een evaluatie van mogelijk geschikte bioassays uitgevoerd. Ook deze kennis kan straks helpen in het maken van een definitieve keuze en verdere aanscherping van deze handreiking.

⁶ STOWA (2016). Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit. Deel 1. Methode voor het in beeld brengen van de effecten van giftige stoffen in oppervlaktewater. STOWA rapport 2016-15a.

In ieder geval onderdeel van definitieve set:	Tijdelijk verplichte, aanvullende bioassays, om ervaring op te doen en vervolgens de verplichte set al dan niet uit te breiden:
Daphniatox Microtox PAH-Calux ER-Calux	PXR-Calux GR-Calux Bij oxidatieve technieken: P53-Calux (-S9)

Uit het met de LVSPPE-methode verkregen extract worden twee sub-monsters genomen, die nodig zijn voor het uitvoeren van deze *in vivo* bioassays (1 ml) en Calux-testen (1 ml). De derde ml blijft over als reserve voor eventuele herhalingen of aanvullend onderzoek. Door het uitvoerende laboratorium worden deze sub-monsters verder opgewerkt. Voor het uitvoeren van de twee *in vivo* bioassays wordt 1 ml van het extract ingedampt en tot 25 ml aangevuld met Dutch standard water (DSW). Voor de Calux testen wordt 1 ml van het extract ingedampt en opgelost in 100 µl dimethylsulfoxide (DMSO).

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 afvalwater⁷, waardoor de resultaten met de volgende eenheden worden gerapporteerd:

Bioassay	Eenheid	Opmerking
Daphnia tox	TU/l water	Toxic Unit = 100 / EC ₅₀ -waarde. De EC ₅₀ -waarde ⁸ wordt berekend door de effecten in duplo bij vier verschillende concentraties te bepalen namelijk 2x, 4x, 8x en 16x verdund DSW-concentraat
Microtox	TU/l water	
PAH-Calux	ng BEQ/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.
ER-Calux	ng EEQ/l water	
PXR-Calux	µg NEQ/l water	
GR-Calux	ng DEQ/l water	
P53-Calux (-S9)	µg CEQ/l water	

Interpretatie

De effectiviteit van de vergaande zuivering wordt uitgedrukt als afname (%) ten opzichte van het reguliere effluent. Deze afname wordt eerst per test berekend met de volgende formules:

Voor de *in vivo* assays (Microtox, Daphnia tox):

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

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

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

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

Bij de verdere interpretatie kunnen de bioassay-resultaten met de ESW's (Ecologisch Signaal Waarden, behorend bij de gehanteerde LVSPPE-extractiemethode) vergeleken worden. De mate van overschrijding geeft een indicatie

⁷ De uitvoerende laboratoria hebben het meest zicht op de gerealiseerde concentratiefactoren en gebruikte hoeveelheden extract. Omrekening kan daarom het beste door de laboratoria worden uitgevoerd.

⁸ De concentratie waarbij er 50% afname t.o.v. de controle optreedt.

van de risico's voor het watermilieu. Een afname van deze overschrijding is daarmee een maat voor het behaalde rendement in het verlagen van deze risico's door de vergaande zuiveringstechniek.

Aanbevolen wordt om alle onderzoeksresultaten centraal op te slaan, zodat een evaluatie van de verschillende technieken en RWZI-effluenten in de verschillende demonstratieprojecten 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 (aantal uur), 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, dag van de week, eventuele bijzonderheden tijdens monstername, toegepaste extractietechniek en verkregen volume aan extract, ruwe meetgegevens per bioassay.

Bijlage 1. Onderbouwing keuze bioassays

Argument 1) De bioassay moet bij het merendeel van de RWZI's een meetbare respons geven (dit betreft dus de respons in regulier effluent)

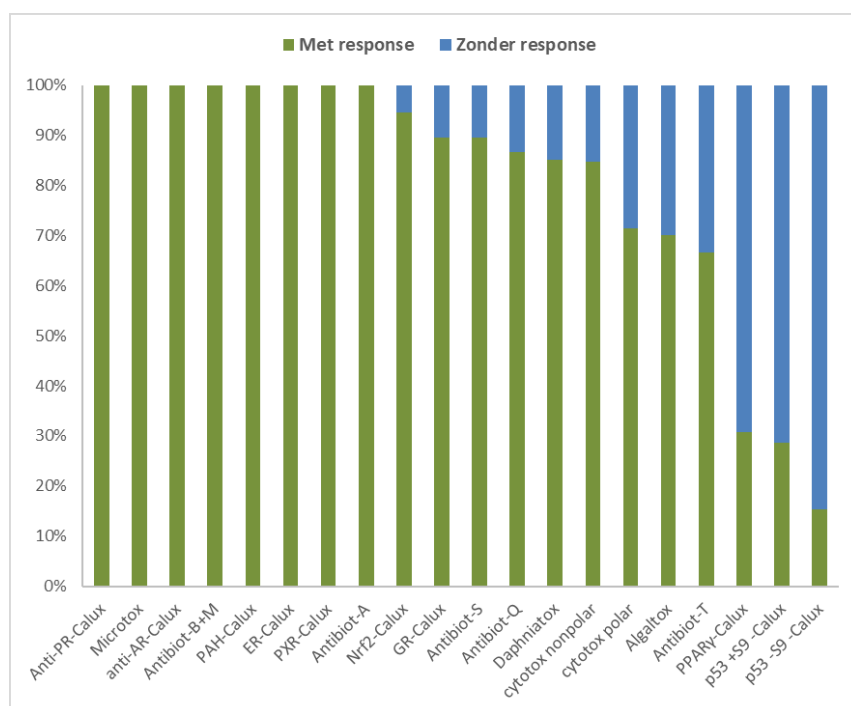
Criterium: In meer dan 80% van de monsters wordt een respons gemeten

Data zijn momenteel afkomstig van 20 geteste monsters uit 8 RWZI's. Van die 20 monsters zijn er 3 met de LVSPÉ, 13 met XAD en 4 met passieve samplers geëxtraheerd. Dit zijn onderzoeken door HHNK (Rutgrink, 2018), Waternet & Ecofide (2019), PACAS (Stowa, 2018-02), Zoetwaterfabriek (Stowa, 2018-46), Aa & Maas (2019). In onderstaand figuur is per bioassay aangegeven welk percentage van de monsters een response gaf. De bioassays, waarbij het resultaat in minimaal 80% van de monsters boven de rapportagegrens ligt, zijn:

In vivo testen: Microtox, Daphnia-tox, cytotox non-polar,

Calux testen: Anti-PR, Anti-AR, PAH, GR, Nrf2, ER, PXR

Antibiotica-testen: T, B+M, A, S, Q



Vanwege het beperkt aantal monsters is er in deze analyse nog geen onderscheid gemaakt tussen de verschillende extractietechnieken (LVSPÉ, XAD en passieve samplers).

Als alleen naar de resultaten van de drie LVSPÉ-monsters wordt gekeken dan geldt dat, op één na, alle hierboven genoemde assays in alle drie monsters een effect geven. De uitzondering is de GR-Calux die in slechts één monster een effect gaf. Daarentegen zou de antibiotica test T aan de lijst kunnen worden toegevoegd, omdat alle drie de monsters ook op deze test een effect gaven.

Argument 2) Een substantiële afname in effect door de vergaande zuivering moet betrouwbaar kunnen worden vastgesteld

Criterium: In meer dan 80% van de monsters is de respons in het geteste extract ten minste twee keer groter dan de rapportagegrens.

Afgezien van de testen, die op criterium 1 al niet voldeden, voldoen alle andere testen (m.u.v. cytotox nonpolar) ook aan dit tweede criterium (zie onderstaande tabel voor de getalsmatige onderbouwing). Voor de *Daphnia* test wordt het criterium weliswaar net niet gehaald (67%), maar als alleen naar de resultaten van de drie LVSPÉ-monsters wordt gekeken dan blijkt de *Daphnia* test in alle drie monsters een effect te geven.

		RWZI-belast oppervlaktewater				Afwalwater		Aantal voldaan (≥3)	Voorstel
		Aantal monsters met response (%)	Aantal metingen in extract ≥ 2*RG (%)	Relatie met ecologie	Gem. toename in respons (%)	Gem. response tov ESW (%)	Aantal monsters met response >ESW (%)		
in vivo	Daphniatox	85	67 ²⁾	+	256	6	25	4	Ja
	Algaltox	70	11	+	22	1	0	1	<3 criteria voldaan
	Microtox	100	83	+	-8	3	20	3	Ja
	cytotox nonpolar	85	60		-9	0	0	1	<3 criteria voldaan
	cytotox polar	71	-		-20	16	14	0	<3 criteria voldaan
CALUX	PAH	100	100	+	0	15	45	3	Ja
	PPARγ	31	36		53	12	15	1	<3 criteria voldaan
	Nrf2	94	83		-22	33	71	3	Nee
	PXR	100	94		204	405	100	5	Ja
	p53 -S9	15			292	18	0	1	Ja (oxidatieve tech)
	p53 +S9	29			-2	2	0	0	<3 criteria voldaan
	ER	100	100	+	86	133	79	6	Ja
	Anti-AR	100	100		114	50	37	4	Nee
	GR	90 ¹⁾	88		430	29	32	3	Ja
	Anti-PR	100	100		80	38	11	3	Nee
	antibiotics	T	67 ²⁾	90		155	9	0	3
Q		87	100		204	9	20	3	Semi-kwantitatief
B+M		100	100		216	37	42	3	Semi-kwantitatief
S		89	87		172	82	89	5	Semi-kwantitatief
A		100	100		131	23	84	4	Semi-kwantitatief

¹⁾ In de drie beschikbare LVSPPE monsters zou de GR-Calux het criterium van 80% niet halen

²⁾ In de drie beschikbare LVSPPE monsters zou de test het criterium wel halen

±) De antibiotica testen hebben een iets lager oordeel omdat deze een semi-kwantitatief resultaat opleveren, waarmee het berekenen van het verwijderingsrendement van vergaande zuivering ook een grotere variatie zal kennen.

Argument 3) De bioassay moet relevante informatie geven over de verwachte ecologische effecten in het ontvangend oppervlaktewater

Hier geldt zowel een kwalitatief als kwantitatief criterium.

Kwalitatief criterium:

Er is bekeken op basis van welke argumenten de testen als voldoende indicatief voor een ecologisch effect (op populatieniveau) in het ontvangende oppervlaktewater beschouwd kunnen worden. In een recente literatuurstudie is dit argument ook beoordeeld voor de effecten van vergaande zuivering (Ecofide, 2019⁹). Als deze relatie tussen de bioassay en een ecologisch effect momenteel nog onduidelijk is, wil dit niet zeggen dat zo'n relatie ook niet bestaat, maar slechts dat de nu beschikbare kennis onvoldoende is. Daarom is als criterium alleen gekeken naar de bioassays waar de relatie voldoende voor is te onderbouwen.

In vivo bioassay. Deze testen beoordelen een direct effect op levende organismen en zijn op basis daarvan als voldoende indicatief voor een ecologisch effect beoordeeld.

ER-Calux. Bioassays gericht op oestrogene werking zijn als voldoende indicatief beoordeeld, aangezien er voldoende onderzoek is die een relatie tussen *in vitro* testen en effecten (zoals vitellogenine gehalte en geslachtsverandering) op vissen aannemelijk maken.

PAH-Calux. Bioassays gericht op het Cyt P₄₅₀-complex zijn als voldoende indicatief beoordeeld, omdat ook voor deze *in vitro* testen geldt dat er voldoende onderzoek is die dergelijke effecten relateert aan biomarker responsen en effecten in vis.

Noot. Voor beide Calux-testen geldt dat dit argument ook op gaat als er specifiek naar de effecten van vergaande zuiveringstechnieken wordt gekeken (Ecofide, 2019⁹).

⁹ Ecofide (2019). Ecologische effecten van vergaande zuiveringen van RWZI-effluent. Een beknopte literatuurstudie. Rapportnr. 128.

Kwantitatief criterium:

Er zijn twee verschillende redeneringen. De eerste kijkt naar resultaten van onderzoek uitgevoerd in oppervlaktewater. De andere naar de resultaten in effluent.

Oppervlaktewater. Uit de beschikbare bioassays met oppervlaktewater moet blijken dat a) de respons in RWZI-belast oppervlaktewater gemiddeld genomen meer dan de helft hoger ligt dan in referentie of bovenstroomse locaties én b) dat deze respons gemiddeld meer dan de helft van de ESW bedraagt. Zie overzichtstabel voor de berekende waarden per test. Hierbij is het gehanteerde criteria "meer dan de helft" telkens rekenkundig aangeduid met waarden boven de 50%.

Afvalwater. Uit de beschikbare bioassays met afvalwater moet blijken dat in meer dan de helft van de monsters de ESW wordt overschreden (aantal monsters met een response >ESW moet meer dan 50% zijn. Als dit percentage <20% is, is er een sterk argument om de bioassay juist niet te selecteren.

Argument 4) De bioassay moet in de praktijk goed toepasbaar zijn

Criterium: De kwaliteitsborging van de geselecteerde testen moet niet ter discussie staan.

Voor alle geselecteerde bioassays geldt dat de uitvoerende laboratoria beschikken over standaard procedures en protocollen, waarin uitvoeringsdetails zijn vastgelegd maar ook de kwaliteitsborging is beschreven. Deze kunnen tussen de laboratoria worden gedeeld, waardoor de onderlinge vergelijkbaarheid is geborgd. Hiermee leidt dit criterium niet tot een verdere onderbouwing van de bioassay-selectie. Dit geldt ook voor de antibiotica-testen. Bij deze testen is echter ook nog een ander aspect relevant, namelijk het feit dat het resultaat semi-kwantitatief wordt beoordeeld (de grootte van de cirkel waarin de bacteriegroei wordt geremd wordt beoordeeld en niet opgemeten). Dit is voor veel toepassingen voldoende, maar is een nadeel bij het kwantitatief vergelijken van meetdata in RWZI-effluenten om o.a. de effectiviteit van vergaande zuiveringstechnieken onderling te bepalen. Semi-kwantitatieve resultaten zullen namelijk naar verwachting leiden tot een grotere variatie in de uitkomsten.

Argument 5) De set bioassays moet elkaar onderling versterken en aanvullen

Dit argument is wel relevant maar kan niet per bioassay worden toegekend. Uit de overzichtstabel blijkt dat de criteria tot een voorlopige selectie van vier bioassays leiden, die allen de effecten van hormoonverstorende stoffen vaststellen, namelijk de ER-, GR-, anti-AR-, en anti-PR-Calux. De veroorzakende stoffen en de beïnvloede hormonen verschillen weliswaar, maar desondanks is er bij deze vier testen minder sprake van "elkaar aanvullen" dan met de andere testen. Verder geldt dat de relevantie voor ecologische effecten in het ontvangend oppervlaktewater voor de ER-Calux beter is te onderbouwen dan voor de andere drie. Daarmee heeft de ER-Calux de voorkeur. Van deze testen is de GR-Calux qua werkingsmechanisme nog het meest verschillend met de ER-Calux (GR: glucocorticoïden vormen een groep steroïde-hormonen die door de bijnierschors worden geproduceerd. Zij danken hun naam aan het feit dat het corticosteroiden zijn met een effect op het metabolisme van glucose). Daarnaast laat (lopend) onderzoek in RWZI-effluent en oppervlaktewater zien dat de GR-Calux in effluent een duidelijk hogere respons geeft dan in onbelast oppervlaktewater. Deze is voorlopig daarom aanvullend geselecteerd.

Samenvattend

Bij het toepassen van biologische effectmetingen om de effecten van vergaande zuiveringen te beoordelen zijn twee aspecten van belang. Enerzijds moet de effectiviteit van een vergaande zuiveringstechniek betrouwbaar beoordeeld kunnen worden. De eerste twee criteria geven hier inzicht in. Daarnaast moet de vergaande zuivering leiden tot een afname van de ecotoxicologische risico's van RWZI-effluenten voor het ontvangende oppervlaktewater. Daarom is ook het derde criterium van belang. Op basis van deze drie criteria worden de volgende bioassays voornamelijk niet geselecteerd: Algaltox, Cytotox¹⁰, PPAR γ en beide mutageniteitstesten (P53).

¹⁰ Cytotox testen dienen niet alleen als biologische effectmeting maar zijn ook een belangrijke negatieve controle bij het uitvoeren van antagonist-Calux-testen. Een daling van de respons kan in die gevallen namelijk ook door cytotoxiciteit veroorzaakt worden.

Verder is het onwenselijk als het testresultaat semi-kwantitatief wordt vastgesteld. Daarom zijn er geen antibiotica testen geselecteerd.

Op basis van deze criteria zijn er negen testen die in potentie geschikt zijn voor de beoogde toepassing in biologische effectmonitoring van vergaande zuiveringstechnieken bij RWZI-effluenten. Dit zijn twee *in vivo* testen (Daphniatox en Microtox) en zeven Calux-testen (PAH, Nrf2, PXR, ER, GR, anti-AR en Anti-PR). Hierbij zijn nog enkele aanvullende opmerkingen te maken.

- *) De Nrf2-Calux reageert sterk op de aanwezigheid van stoffen met een oxidatieve werking. Dit is een relevant risico bij het toepassen van ozon, en de test is dan ook bruikbaar om het risico op het lozen van dergelijke stoffen te minimaliseren (bijv. bij overdosering). Opname van deze test in de verplichte set betekent echter dat alle ozon-toepassingen op voorhand al een nadeel hebben ten opzichte van andere zuiveringstechnieken. Dit nadeel is echter niet gebaseerd op verwijderingsrendement en zou voor een onderling ongelijke beoordeling van vergaande zuiveringstechnieken leiden. Oxidatieve technieken hebben mogelijk nog wel een ander nadeel namelijk de mogelijke vorming van ongewenste transformatieproducten en daarmee een verhoogde kans op het optreden van genotoxische en/of mutagene effecten. Bij de toepassing van oxidatieve technieken wordt daarom aanbevolen om de P53-Calux (-S9) in het onderzoek mee te nemen.
- *) Er zijn nu vier testen geselecteerd die effecten van hormoonverstorende stoffen beoordelen, namelijk de ER-, GR-, anti-AR-, en anti-PR-Calux. Allen hebben hun meerwaarde maar de onderlinge toegevoegde waarde is minder in vergelijking met de andere bioassays. Daarnaast is de relevantie voor ecologische effecten in het ontvangend oppervlaktewater het beste voor de ER-Calux te onderbouwen. Daarmee heeft de ER-Calux de voorkeur. Van de andere drie is de GR-Calux qua werkingsmechanisme nog het meest verschillend met de ER-Calux. Deze is voorlopig daarom aanvullend geselecteerd.
- *) Ook de PXR-Calux is voorlopig aanvullend geselecteerd. Deze bioassay blijkt op vrijwel alle criteria goed te scoren. Belangrijkste aandachtspunt is dat de PXR-Calux als werkingsmechanisme gevoelig is voor de omzetting van giftige stoffen. Dit is een relevant proces maar tegelijkertijd kan deze door een breed scala aan verontreinigingen worden getriggerd. Uit monitoringsonderzoek blijkt dan ook dat deze test niet alleen op RWZI-effluent maar ook in allerlei oppervlaktewatermonsters reageert. Voor de beoordeling van de effectiviteit van een vergaande zuivering hoeft dit geen beperking te zijn, maar voor het tweede doel van de demonstratieprojecten (beoordelen van de mate waarin de ecotoxicologische risico's in oppervlaktewater afnemen door de vergaande zuivering) kan dit een complicerende factor blijken te zijn.

Dit heeft tot onderstaande keuze geleid, waarbij er voor vier biologische effectmetingen is besloten dat die in ieder geval deel uit maken van de definitieve set. Daarnaast zijn er twee bioassays die nuttige aanvullende inzichten kunnen opleveren, maar waarvoor de ervaringen nog te beperkt zijn om nu al een definitieve keuze te maken. Deze zijn daarom tijdelijk verplicht. Tenslotte is er één bioassay, gericht op genotoxiciteit en mutageniteit, waarvoor wordt aanbevolen om die op te nemen in het geval de vergaande zuiveringstechnieken op oxidatieve technieken (zoals ozon) betrekking heeft.

In ieder geval onderdeel van definitieve set:	Tijdelijk <u>verplichte</u> , aanvullende bioassays, om ervaring op te doen en vervolgens de verplichte set al dan niet uit te breiden:
Daphniatox Microtox PAH-Calux ER-Calux	PXR-Calux GR-Calux Bij oxidatieve technieken: P53-Calux (-S9)