

Ecologische effecten van vergaande zuiveringen van RWZI-effluent

Een beknopte literatuurstudie



Ecologische effecten van vergaande zuiveringen van RWZI-effluent

Een beknopte literatuurstudie

Datum:	7-10-2019
Opdrachtgever:	Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat / Rijkswaterstaat Water, Verkeer en Leefomgeving
Contactpersoon opdrachtgever:	Gerard Rijs
Projectnummer:	128
Auteur(s):	Dr. J.F. Postma
Status:	Eindrapport

Ecofide

Singel 105
1381 AT Weesp
Telefoon: 0294 450282
KvK: 32134487
info@ecofide.nl
www.ecofide.nl



Inhoudsopgave



1	Samenvatting.....	1
2	Bevindingen per thema.....	3
2.1	Chemische analyses.....	4
2.2	<i>In vitro</i> assays.....	4
2.3	Enzymatische of morfologische effecten in blootgestelde organismen.....	5
2.4	Ecotoxicologische effecten op organismen.....	7
2.5	Effecten op aquatische levensgemeenschappen.....	8
3	Conclusies.....	11
3.1	Conclusies uit literatuur.....	11
3.2	Extrapolatie naar de Nederlandse situatie.....	12
4	Achterliggende gegevens per RWZI.....	15
5	Referenties.....	33

1 Samenvatting



Centrale vraag

Leidt de implementatie van vergaande zuivering van RWZI-effluent tot positieve ontwikkelingen op de aquatische levensgemeenschap in het ontvangende oppervlaktewater?

Aanleiding

Binnen de ketenaanpak 'Medicijnresten uit Water' wordt onder andere gekeken naar de mogelijkheden voor een vergaande zuivering van het effluent van rioolwaterzuiveringen (RWZI's) voor medicijnresten en overige organische microverontreinigingen. De afgelopen jaren zijn hiertoe meerdere studies uitgevoerd, waaronder enkele pilotprojecten bij RWZI's. Deze pilotprojecten demonstreren dat vergaande zuivering tot een verbetering van de effluentkwaliteit kan leiden, aangezien er zowel in de concentraties van stoffen als in de biologische effecten verbeteringen waren te zien (Stowa, 2018a,b). Ook voor de op te starten demonstratieprojecten binnen de ketenaanpak alsmede voor het innovatieprogramma van de STOWA en het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat¹ zal de effectiviteit van de vergaande zuiveringstechnieken aan de hand van zowel stofconcentraties (chemische analyses) als biologische effectmetingen worden gekarakteriseerd. Hiermee wordt een belangrijke stap gezet om inzicht te krijgen in de mate waarin de kwaliteit van het RWZI-effluent, en daardoor die van het ontvangende oppervlaktewater, verbetert. Tegelijkertijd kent de extrapolatie van effluentkwaliteit naar de daadwerkelijke effecten op de aquatische ecologie nog de nodige onzekerheden. Vragen als "In welke mate leidt vergaande zuivering tot zichtbare verbeteringen voor het waterleven in het ontvangende oppervlaktewater?" of "In welke mate neemt de EKR-waarde toe als vergaande zuivering op de RWZI's wordt toegepast?" zijn relevant.

Aanpak

In een voorfase van dit project is kennisgenomen van twee uitgebreide onderzoeksprogramma's in Duitsland en Zwitserland (SchussenAktiv; Strategie Micropoll). Beide studies laten zien dat vergaande zuivering tot positieve effecten op de ecologie in het ontvangende oppervlaktewater kan leiden en geven daarmee inzicht in bovenstaande vragen. In de huidige beperkte literatuurstudie zijn deze resultaten samengevat en is nagegaan of er in de wetenschappelijke literatuur vergelijkbare studies zijn gepubliceerd. Op deze manier is inzicht verkregen in de vraag of de onderzoeksresultaten van individuele RWZI's en vergaande zuiveringstechnieken veralgemeniseerd kunnen worden. De studie had niet tot doel om een volledig overzicht van de beschikbare literatuur op te stellen.

In de wetenschappelijke literatuur zijn meerdere onderzoeken naar de effecten van vergaande zuivering beschreven. Overeenkomstig met de huidige Nederlandse aanpak richtte een deel van deze onderzoeken zich op chemische en biologische effectmetingen in het te lozen RWZI-effluent om zo het effect van vergaande zuivering te beoordelen en de zuiveringsprocessen te kunnen optimaliseren. Daarnaast zijn er studies, die ook de effecten in het ontvangende oppervlaktewater hebben bestudeerd. De bevindingen van deze laatste groep studies zijn in de huidige literatuurstudie samengevat om antwoord te geven op de vraag of de implementatie van vergaande zuivering van RWZI-effluent tot positieve ontwikkelingen op de aquatische levensgemeenschap in het ontvangende oppervlaktewater kan leiden. Op basis van deze bevindingen is vervolgens een vertaalslag gemaakt naar wat dit voor de Nederlandse situatie kan betekenen.

¹ Bij de demonstratieprojecten binnen de ketenaanpak gaat het om vergaande zuivering van RWZI-effluenten met de momenteel beschikbare technieken. Bij het innovatieprogramma betreft het onderzoek naar kansrijke zuiveringstechnieken.

Bevindingen

In het algemeen laat de uitgevoerde beknopte literatuurstudie een positief beeld zien over de te verwachten ontwikkelingen bij de implementatie van vergaande zuivering op Nederlandse RWZI's. De in Nederland beschikbare informatie over biologische effectmetingen in RWZI-effluenten en in oppervlaktewater nabij de lozingspunten komt in voldoende mate overeen met de in de literatuur beschreven onderzoekresultaten. Daarmee is er voldoende onderbouwing om de onderzoeksresultaten bij buitenlandse RWZI's te extrapoleren naar de Nederlandse situatie. Concreet wordt verwacht dat door vergaande zuivering van RWZI-effluenten in het ontvangend oppervlaktewater:

- **de concentraties van milieuverontreinigingen zullen dalen**, leidend tot lagere bioaccumulatie van deze stoffen in organismen als vissen. Dit geldt niet alleen voor medicijnresten maar tevens voor een breder spectrum aan stoffen;
- **de toxiciteit zal afnemen**. Dit geldt voor allerlei toxicologische effecten op een diversiteit aan organismen, zoals sterfte of een lagere voortplanting bij ongewervelde dieren als watervlooien en vlokreeften, maar ook het verminderd optreden van hormoonverstorende effecten zoals vervrouwelijking bij mannelijke vissen;
- **de aquatische levensgemeenschappen herstellen**. Dit geldt met name voor de populaties van gevoelige macrofauna soorten als haften en kokerjuffers (dit zijn belangrijke taxa bij de KRW-scores) en voor de gezondheidstoestand van vissen.

De mate waarin dit gebeurt verschilt per RWZI en is afhankelijk van de locatiespecifieke omstandigheden van de RWZI-effluent lozing. Het positieve effect zal groter zijn naarmate het RWZI-effluent een meer dominante emissiebron van milieuvreemde stoffen voor het ontvangende oppervlaktewater is en naarmate andere ecologische stuurfactoren beter op orde zijn.

Deze beknopte literatuurstudie geeft een eerste beeld van de te verwachten positieve ontwikkelingen op het watermilieu door vergaande zuivering van RWZI-effluenten. Het geeft hiermee een kader voor de biologische effectmetingen, die binnen de demonstratieprojecten en het innovatieprogramma naar vergaande zuiveringstechnieken, uitgevoerd zullen gaan worden. Ook geeft de studie input aan de selectie van de toe te passen testmethoden, zoals de keuze van *in vitro* en *in vivo* bioassays bij RWZI-effluenten. De bioassays zullen voldoende indicatief moeten zijn voor de potentieel voorkomende ecologische effecten (bij voorkeur op populatieniveau) in het ontvangende oppervlaktewater. De *in vitro* bioassays zijn hierbij vooral indicatief voor verschillende effecten op vissen (zoals de ER-CALUX als biomarker respons van verhoging van vitellogenine-gehalte en geslachtsverandering bij vissen), terwijl de *in vivo* bioassays meer indicatief zijn voor effecten op ongewervelde waterorganismen. Verder blijkt dat de in de literatuur beschreven testmethoden en de in Nederland toegepaste methoden weliswaar kunnen verschillen, maar doorgaans gebruik maken van dezelfde achterliggende werkingsmechanismen. Hierdoor kunnen de uitkomsten in absolute zin verschillen, maar het beeld van het effect (af- of toename) verandert hierdoor niet.

2 Bevindingen per thema

In de huidige literatuurstudie zijn onderzoeksgegevens van 12 verschillende RWZI's bestudeerd. Deze RWZI's liggen in Engeland (2), Duitsland (4), Zwitserland (1), Zweden (3), Canada (1) en de USA (1). In de meeste situaties is gekeken naar de effecten van vergaande zuivering middels poederkool (2), granulair actief kool (4) en/of ozon (5) (al dan niet met aanvullende zandfiltratie). Daarnaast is er een studie met chloordioxide (ClO₂) uitgevoerd, is er bij twee RWZI's gekeken naar de ecologische effecten van het installeren van een actief slib systeem en is er in één geval naar de effecten van het stopzetten van de lozing gekeken. Deze laatste studies gaan niet in op de effecten van vergaande zuiveringen 'an sich' maar geven wel inzicht in de effectketen (van effluent naar oppervlaktewater) en zijn daarmee ondersteunend aan de andere studies. Het aantal studies naar de ecologische effecten van vergaande zuiveringen is hiermee nog vrij gering en tevens divers van aard. Hierdoor is het nog niet mogelijk om conclusies te trekken over eventuele verschillen in de effectiviteit, waarmee de verschillende vergaande zuiveringstechnieken ecologische effecten verminderen.

In de verschillende onderzoeken zijn een groot aantal testmethoden toegepast. Deze zijn globaal te ordenen op basis van hun relevantie bij het beoordelen van de effecten van vergaande zuivering op de aquatische levensgemeenschap in het ontvangende oppervlaktewater:

- a) Chemische analyses
- b) *In vitro* assays (testen met cellijnen)
- c) Enzymatische of morfologische effecten in blootgestelde organismen
- d) Ecotoxicologische effecten op organismen
- e) Effecten op aquatische levensgemeenschappen

In deze ordening zijn er steeds meer factoren, die het directe, rechtlijnige verband met het effect van vergaande zuivering kunnen beïnvloeden. Zo wordt het uiteindelijke effect van vergaande zuivering op de aquatische levensgemeenschap niet alleen door de behaalde zuiveringsrendementen op de RWZI bepaald, maar spelen ook allerlei andere factoren een rol (bijv. emissies vanuit bovenstrooms gelegen RWZI's of agrarische gebieden, de mate van eutrofiering en de habitatgeschiktheid). Hierdoor neemt de ecologische relevantie in deze ordening van testmethoden toe, maar wordt tegelijkertijd het eenduidig aantonen en kwantificeren van de effecten van vergaande zuivering steeds moeilijker. Voor het overzicht is deze ordening hieronder aangehouden om zo de resultaten van de verschillende studies samen te kunnen vatten.

In de verdere uitwerking wordt over zowel het effect van RWZI-effluent als over het effect van vergaande zuiveringstechnieken gesproken. De term 'effect' heeft echter een verschillende betekenis. Bij het beschrijven van effecten van RWZI-effluent gaat het over het (veelal) *negatieve* effect dat door het RWZI-effluent wordt veroorzaakt. In het tweede geval, het effect van vergaande zuivering, gaat het echter over een *positief* effect, namelijk de mate waarin de vergaande zuiveringstechniek een eerder geconstateerd effect van RWZI-effluent kan verminderen.

2.1 Chemische analyses

Bij alle 11 onderzochte RWZI's bleek de verbeterde zuivering te leiden tot lagere concentraties van allerlei milieuverontreinigende stoffen in het effluent (bij de 12de RWZI is dit niet onderzocht). De mate waarin deze verbetering optrad verschilde per stof en techniek maar ook de effectiviteit van de zuivering in het reguliere proces beïnvloedde de toegevoegde waarde van vergaande zuiveringstechnieken. Voor twee van de 11 RWZI's (Langwiese en Swindon²) is ook aangetoond dat de vergaande zuiveringstechnieken tot lagere concentraties in het ontvangende oppervlaktewater leiden. Dit wil niet zeggen dat dit effect voor de andere RWZI's niet optreedt, maar alleen dat er geen gegevens over de chemische analyses in oppervlaktewater zijn beschreven³. Voor zover bekend bestond het oppervlaktewater benedenstrooms voor alle bestudeerde RWZI's voor >50% uit effluent. Een concentratiedaling in het effluent zal dan automatisch ook moeten leiden tot een daling in het oppervlaktewater.

Bij de RWZI's Langwiese en Eriskirch zijn er ook chemische analyses in blootgestelde organismen uitgevoerd en werd aangetoond dat de vergaande zuiveringstechnieken ook tot lagere diclofenac en/of PFOS-gehalten in blootgestelde regenboogforellen leidden. Ook in de van nature aanwezige vissen (gestippelde alver) werd bij de RWZI Langwiese een verlaging van de PFOS-gehalten door de vergaande zuivering aangetoond.

Chemische analyses

Vergaande zuivering leidt tot lagere concentraties van milieuverontreinigende stoffen in het effluent en in het benedenstroomse oppervlaktewater. De mate waarin verschilt per stof, per zuiveringstechniek en per lozings situatie. Ook de bioaccumulatie in vissen neemt af. Dit is aangetoond voor zowel een geneesmiddel (diclofenac) als voor de prioritaire stof PFOS.

2.2 *In vitro* assays

Bij zes van de 12 RWZI's is onderzocht in hoeverre een verbeterde zuivering tot lagere effecten in *in vitro* testen met effluent leidt. Bij alle zes RWZI's leidde de verbeterde zuivering tot een verlaging van de oestrogene-effecten. Daarnaast werden verlaagde effecten vastgesteld voor genotoxiciteit (RWZI's Langwiese, Eriskirch en Wüeri), de effecten van dioxine-achtige stoffen (RWZI's Langwiese en Eriskirch) en neurotoxiciteit (RWZI Wüeri). Overigens werden niet alle parameters in alle RWZI's toegepast. Ook werd in drie gevallen juist een toename van de respons vastgesteld. Dit betrof een stijging van de mutageniteit (door ozon) en van de anti-oestrogene effecten (1* bij poederkool en 1* bij granulaire actief kool). In deze gevallen werd simultaan ook een verlaging van de oestrogene effecten vastgesteld. Een toename van anti-oestrogene effecten kan dan komen doordat de vergaande zuivering een wisselend effect op de concentraties van de verschillende oestrogene en anti-oestrogene stoffen heeft.

In twee studies is ook gekeken naar de effecten op *in vitro* assays met oppervlaktewater. In één geval (RWZI Wallernhausen) was sprake van het beëindigen van de lozing van RWZI-effluent. In dit effluent werd een verhoogde oestrogene, anti-oestrogene en anti-androgene activiteit vastgesteld en ook op de benedenstroomse locatie (100m) werden verhoogde activiteiten met *in vitro* testen vastgesteld. Na het beëindigen van de RWZI-lozing verdwenen deze effecten en waren er geen verschillen meer met de bovenstroomse referentielocatie. Bij de tweede RWZI (Langwiese) leidde een poederkoolinstallatie tot een afname van de genotoxiciteit, oestrogeniteit en van de effecten van dioxine-achtige stoffen in het effluent. Voor de effecten van dioxine-achtige stoffen werd deze verlaging door poederkool ook in het oppervlaktewater op de benedenstroomse locatie vastgesteld. Voor genotoxiciteit en oestrogeniteit konden geen conclusies getrokken worden omdat deze effecten voorafgaand aan de poederkoolinstallatie al niet in het oppervlaktewater werden aangetroffen dan wel omdat de effecten op de bovenstroomse controle locaties in de tijd varieerden.

² In de bijlage van deze memo zijn de onderzoeken aan alle bestudeerde RWZI's in meer detail beschreven.

³ Deze gegevens zijn wellicht deels in andere studies beschreven, maar in deze beperkte literatuurstudie is hier niet specifiek naar gezocht.

***In vitro* assays**

Bij zes studies is gekeken naar de effecten van vergaande zuivering op *in vitro* assays met effluent. In alle zes studies werd een verlaging van de oestrogene effecten vastgesteld. Daarnaast werd ook een vermindering van genotoxiciteit, neurotoxiciteit en de effecten van dioxine-achtige stoffen vastgesteld, waarbij overigens niet alle parameters in ieder RWZI zijn toegepast. Ook werd in drie gevallen juist een toename van de respons vastgesteld. Dit betrof een stijging van de mutageniteit door ozon en van de anti-oestrogene effecten bij poederkool en actief kool. Dit laatste kan komen doordat het rendement van vergaande zuivering voor de verschillende stoffen met een oestrogene dan wel anti-oestrogene werking kan variëren (idem voor androgene), waardoor ook het gezamenlijke effect van het mengsel varieert.

In twee studies werd gekeken naar de effecten in het ontvangende oppervlaktewater. In beide gevallen werd ook in het benedenstroomse oppervlaktewater een afname van de effecten in *in vitro* assays aangetroffen. Deze afname in het oppervlaktewater werd echter niet voor alle, in het RWZI-effluent reagerende, assays aangetroffen. Dit kwam doordat er óf voorafgaand aan de vergaande zuivering al geen verhoging in het oppervlaktewater werd gemeten óf door de aanwezige variatie in de respons.

2.3 Enzymatische of morfologische effecten in blootgestelde organismen

Er zijn zeven studies, die bekeken hebben in hoeverre het toepassen van vergaande zuiveringstechnieken kan leiden tot een afname van enzymatische of morfologische effecten in vissen, blootgesteld aan RWZI-effluent en/of aan met RWZI-effluent belast oppervlaktewater. Hierbij is vaak nagegaan of deze effecten zijn te correleren aan andere veranderingen in de effectketen, zoals dalende concentraties van stoffen of een afname van effecten in *in vitro* assays. Daarnaast is er een studie die gekeken heeft naar het optreden van DNA-schade bij de driehoeksmossel.

De twee studies aan een RWZI waar een actief slib systeem werd geïnstalleerd of geoptimaliseerd (RWZI Kitchener en de RWZI Boulder) geven beiden aan dat chemisch vast te stellen verbeteringen indicatief kunnen zijn voor ecologische effecten. Beide studies betroffen oestrogene effecten, waarbij de verbetering van de zuivering leidde tot i) lagere concentraties van hormoonverstorende stoffen in het effluent; ii) lagere effecten in *in vitro* assays gericht op oestrogeniteit; iii) lagere vitellogenine gehalten in blootgestelde vissen; iv) minder morfologische veranderingen in de gonaden en/of v) een lager voorkomen van intersex in vispopulaties in het ontvangende oppervlaktewater. In Nederland omvatten alle RWZI's een actief slibstelsysteem en deze wijze van afvalwaterzuivering valt daarmee niet onder het begrip "vergaande zuivering". Tegelijkertijd geven deze studies wel inzicht in hoe effecten op verschillende testmethoden elkaar kunnen versterken tot een samenhangend beeld over de effecten op de aquatische levensgemeenschap.

Ook in vier studies naar vergaande zuiveringstechnieken is gekeken naar deze effectketen voor hormoonverstorende effecten. In een Engelse studie (RWZI niet met naam genoemd) werden blankvoorns gedurende 6 maanden blootgesteld. Blootstelling aan het reguliere effluent van zowel het actief slibproces als het zandfilter bleek de vitellogenine gehalten significant te verhogen, terwijl deze verhoging niet optrad bij dieren die aan het effluent van de vergaande zuiveringstechnieken (granulair kool en chloordioxide) werden blootgesteld. Deze resultaten kwamen overeen met de simultaan verkregen resultaten van zowel de chemische analyses als de *in vitro* assay. Verder bleek het reguliere effluent uit het actief slibstelsysteem tot een sterke stijging van intersex te leiden. Dit effect werd na het zandfilter echter niet meer aangetroffen en het effect van de vergaande zuiveringstechnieken kon daarom niet beoordeeld worden. Ook in een Zwitsers onderzoek (Wüeri) werd vastgesteld dat de vergaande zuiveringstechniek (in dit geval ozon) tot lagere concentraties van een groot aantal stoffen en lagere effecten in *in vitro* assays gericht op oestrogene effecten leidde en tevens dat de verhoogde vitellogenine gehalten in regenboogforellen (reguliere situatie) niet langer werden aangetroffen. Niet in alle gevallen waren de resultaten echter even duidelijk. Zo werd in een Zweeds onderzoek (RWZI Knivsta) gekeken naar de effecten op zebravissen, die gedurende 3 weken aan het RWZI-effluent werden blootgesteld. In dit geval leidde de vergaande zuivering met ozon tot een verhoogde gen-activiteit voor vitellogenine (indicatief voor oestrogene effecten), een effect dat volgens de onderzoekers waarschijnlijk werd veroorzaakt door de vorming van afbraakproducten en/of de aanwezigheid van anti-androgeen werkende stoffen.

Ten slotte werd ook in een Duitse studie (RWZI Langwiese) aandacht besteed aan het optreden van hormoonverstorende effecten. In dit geval leidde de vergaande zuivering met poederkool wel tot een verlaging van de oestrogene effecten in het RWZI-effluent (*in vitro* assay), maar waren de concentraties te laag om in de reguliere situatie tot een duidelijke verhoging van de vitellogenine-gehalten in de vissen te leiden. In deze studie werden dan ook slechts enkele indicaties gevonden dat poederkool wellicht tot een verlaging van de oestrogene effecten in vissen (beekforel en regenboogforel) kan leiden. Voor genotoxische effecten werd in deze Duitse studie wel aangetoond dat effecten in *in vitro* assays indicatief kunnen zijn voor effecten in organismen. De vergaande zuivering met poederkool leidde namelijk niet alleen tot een verlaging van de genotoxische respons in een *in vitro* test maar ook tot een verlaging van het aantal zogenaamde micronuclei in bloedcellen van blootgestelde regenboogforellen. Voorafgaand aan de poederkool-installatie was de frequentie waarmee micronuclei in bloedcellen van forellen op de benedenstroomse locatie werden aangetroffen significant hoger dan bovenstrooms. Na de bouw van een vergaande zuivering met poederkool was de frequentie afgenomen en werd ook dit verschil tussen boven- en benedenstroomse locaties niet langer aangetroffen. Ook bij een tweede Duitse RWZI (Eriskirch) werd vastgesteld dat de vergaande zuiveringstechnieken tot een verlaging van het aantal micronuclei in rode bloedcellen leidden.

Verder is er in twee studies aandacht besteed aan inductie van het cytochroom P₄₅₀-systeem. Dit is een verzameling van enzymen, die betrokken zijn bij de afbraak van potentieel schadelijk stoffen en lichaamsvreemde stoffen zoals medicijnresten. Hierbinnen wordt vaak gekeken naar het EROD-gehalte, als maat voor een keten van effecten die beginnen met de binding aan de Ah-receptor en uiteindelijk kunnen leiden tot groeivertraging en reproductiestoringen. In beide studies met in totaal vier RWZI's (Langwiese, Eriskirch, Käppalaverket en Kungsängsverket) bleek blootstelling aan het reguliere effluent tot een verhoging van de EROD-gehalten (en Cyp 1a⁴) in vissen te leiden en in één van deze situaties is dit effect ook in gekooide forellen op de benedenstroomse locatie vastgesteld (in de andere is dit niet onderzocht). De vergaande zuiveringstechnieken (poederkool, granulair actief kool, ozon) bleken dit effect op het EROD-gehalte in alle vier de RWZI's te verlagen. In twee van deze RWZI's is ook naar de effecten van dioxine-achtige stoffen in *in vitro* assays gekeken (dit is één van de stofgroepen die tot inductie van het cytochroom P₄₅₀-systeem kan leiden). Ook deze effecten bleken in het RWZI-effluent en/of oppervlaktewater door de vergaande zuiveringstechniek verkleind te worden.

Bij de RWZI Neuss is onderzocht op vergaande zuivering met ozon en/of poederkool kan leiden tot een vermindering van de DNA-schade bij driehoeksmosselen. Voor poederkool was dit het geval, terwijl de vergaande zuivering met ozon de DNA-schade juist liet toenemen. Deze toename verdween door het effluent over een aanvullend zandfilter te leiden.

Bij de Engelse RWZI van Swindon is bestudeerd of een granulair actief kool systeem tot veranderingen in de van nature aanwezige driedoornige stekelbaarzen leidt. In de benedenstrooms aanwezige populatie wees een gewijzigde RNA/DNA verhouding op een verbetering door granulair actief kool en ook de groeisnelheid van de dieren was bij de vergaande zuivering toegenomen. Beide constatering duiden op een positief effect op de gezondheidstoestand door granulair actief kool. Tegelijkertijd konden de onderzoekers niet uitsluiten dat deze effecten niet ook (deels) door andere effecten (zoals verhoogde zuurstofconcentraties of veranderde voedselbeschikbaarheid) zijn veroorzaakt.

Ten slotte is bij één van de hierboven al genoemde Duitse studies (RWZI Langwiese) zeer uitgebreid onderzoek aan vissen uitgevoerd, waarbij experimenten met doorstroom-aquaria, kooi-studies in het veld en onderzoek aan van nature aanwezige vissen zijn gecombineerd. In deze studies werd onder meer vastgesteld dat de toegepaste vergaande zuivering met poederkool bij zowel van nature aanwezige vissen (gestippelde alver) als gekooide of in aquaria blootgestelde vissen (regenboogforel, beekforel) tot minder histopathologische afwijkingen in lever, kieuwen en nieren leidde. Tevens werden indicaties verkregen dat de energiereserves in de vissen toenamen (regenboogforel) en de gehalten aan stressproteïnen juist afnamen (regenboogforel en beekforel). Ook bij de RWZI Eriskirch werd vastgesteld dat de vergaande zuiveringstechnieken tot een verbetering van de histopathologische situatie van blootgestelde regenboogforellen leidden. Dit alles duidt op een toegenomen gezondheidstoestand van vissen als gevolg van de vergaande zuivering, waarbij de effecten ook in het ontvangende oppervlaktewater zijn aangetoond.

⁴ Ook een enzym complex verbonden aan het cytochroom P₄₅₀-systeem.

Enzymatische of morfologische effecten in blootgestelde organismen

Bij zeven van de acht onderzochte RWZI's is vastgesteld dat vergaande zuivering kan leiden tot een verbetering in de gezondheidstoestand van blootgestelde vissen, waarbij dit effect in twee studies ook in het ontvangende oppervlaktewater werd aangetoond. Verbeteringen van de gezondheidstoestand zijn op meerdere manieren aangetoond, zoals een verlaging van het vitellogenine-gehalte (indicatief voor oestrogene effecten), een afname van de inductie van het cytochroom P₄₅₀-systeem (benodigd voor de afbraak van lichaamsvreemde stoffen), een lagere genotoxiciteit en een vermindering van histopathologische afwijkingen in lever, kieuwen en nieren.

Ook in dit geval zijn er echter studies, die minder eenduidige resultaten opleverden. Zo leidde vergaande zuivering door ozon in één studie juist tot een verhoging van het vitellogenine-gehalte, een effect dat waarschijnlijk werd veroorzaakt door de vorming van afbraakproducten en/of de aanwezigheid van anti-androgeen werkende stoffen. In een andere studie leidde de vergaande zuivering met poederkool wel tot een verlaging van de oestrogene effecten in het RWZI-effluent (*in vitro* assay), maar waren de concentraties te laag om in de reguliere situatie tot een duidelijke verhoging van de vitellogenine-gehalten in de vissen te leiden.

2.4 Ecotoxicologische effecten op organismen

Bij vijf RWZI's zijn ook ecotoxicologische testen (bioassays) uitgevoerd om te beoordelen in hoeverre organismen nadelige effecten van het, al dan niet vergaand, gezuiverde effluent ondervinden. Bij drie van deze RWZI's (Wüeri, Eriskirch, Neuss⁵) is alleen gekeken naar de ecotoxicologische effecten in het effluent. Het reguliere effluent van de RWZI Wüeri bleek toxische effecten op de Microtox-test (een bacterie) en algen te veroorzaken, waarbij deze effecten door de ozon-behandeling afnamen. Verder bleek de voedselconsumptie van vlokreeften door de ozon-behandeling juist toe te nemen. Ook werden enkele nadelige effecten van de ozon-behandeling vastgesteld (op regenboogforellen en een oligochaete worm). Ook bij de RWZI van Wallernhausen werden in de Microtox-test toxische effecten van het effluent vastgesteld, die in dit geval ook in de benedenstroomse locatie werden aangetroffen. Na het stopzetten van deze RWZI verdwenen deze toxische effecten in het oppervlaktewater. Bij de RWZI Neuss werd geconstateerd dat vergaande zuivering met ozon kan leiden tot een toename van de ecotoxicologische effecten (afname van de voortplanting van wormen).

Bij de RWZI Langwiese bleek het reguliere effluent tot toxische effecten op de slak *Potamopyrgys antipodarum* te leiden (lagere reproductie), terwijl de poederkool behandeling dit embryotoxisch effect liet afnemen (17-24% meer embryo's). Dit effect werd echter niet in het oppervlaktewater aangetoond, aangezien de reproductie in boven- en benedenstroomse locaties vergelijkbaar was. Opvallend genoeg werd bij de RWZI Eriskirch juist vastgesteld dat de vergaande zuiveringstechnieken (in dit geval ozon en granulaire actief kool) tot een toename van de ecotoxicologische effecten op de slak *P. antipodarum* leidden.

Ook bij de groei van kroos en de reproductie van de oligochaete worm *L. variegatus* was er in de reguliere situatie van RWZI Langwiese geen verschil tussen de boven- en benedenstroomse locaties en kon de vergaande zuivering dan ook niet tot een aantoonbare verbetering leiden. Dit was wel het geval voor de Early Life Stage (ELS) test met zebrafish-larven, waar de resultaten op de benedenstroomse locatie een significante verbetering lieten zien nadat de vergaande zuivering met poederkool was geïnstalleerd.

Ecotoxicologische effecten op organismen

Bij drie van de vier onderzochte RWZI's werd geconcludeerd dat vergaande zuiveringstechnieken tot een verlaging van de ecotoxicologische effecten in bioassays kunnen leiden. Dit werd deels in het effluent zelf aangetoond en deels ook in het ontvangende oppervlaktewater. Ook bij de vijfde RWZI werd een afname van de ecotoxicologische effecten in oppervlaktewater aangetoond. In dit geval betrof het echter het stopzetten van een RWZI-lozing. Tegelijkertijd zijn er ook verschillen. Zo werden de effecten niet in alle bioassays aangetoond, soms werden ze alleen in RWZI-effluent en niet in oppervlaktewater aangetroffen en soms was er juist sprake van een toename van de effecten (drie keer door ozon).

⁵ Overigens zijn er in de literatuur meer studies, die zich alleen op het effluent hebben gericht. De focus van de huidige studie was echter gericht op studies, die ook naar de effecten in het ontvangende oppervlaktewater gekeken hebben.

2.5 Effecten op aquatische levensgemeenschappen

In vier studies is onderzocht in welke mate vergaande zuiveringstechnieken tot verbeteringen in de benedenstrooms aanwezige aquatische levensgemeenschappen kunnen leiden. In alle vier de onderzoeken is gekeken naar effecten op de macrofauna (zie hieronder). Daarnaast is er in één studie (RWZI Wüeri) ook gekeken naar diatomeeën. Uit de veldinventarisaties hiervan bleek echter dat de vergaande zuivering (ozon) niet tot een verbetering van het kwaliteitsoordeel over de diatomeeën leidde. Volgens de onderzoekers kunnen daar meerdere oorzaken aan ten grondslag liggen, zoals de variatie in de tijd die de bestudeerde beeksystemen van nature kenmerkt, de al aanwezige belasting bovenstrooms of het feit dat de diatomeeën ook op andere factoren reageren dan alleen de milieuverontreinigingen, die door de ozon-behandeling zijn verwijderd.

Onderzoek naar vis-populaties is nauwelijks uitgevoerd, deels omdat van nature aanwezige vissen ook tussen boven- en benedenstroomse locaties kunnen migreren. In één studie (RWZI Wüeri) is dit wel gedaan en werd vastgesteld dat de dichtheid van modderkruipers in de benedenstroomse locaties ten tijde van de vergaande zuivering veel hoger was dan in de jaren ervoor, terwijl zo'n toename op de bovenstroomse locatie niet werd vastgesteld. Het is echter moeilijk om deze eenmalige waarneming ook direct als een (causaal) effect van de vergaande zuivering (ozon) te zien.

De uitkomsten van de vier macrofauna-studies variëren, mede als gevolg van de lokale situatie, maar er zijn ook overeenkomsten. Zo lijken effecten van vergaande zuiveringstechnieken eerder met gericht, meer specialistisch onderzoek te worden aangetoond dan vanuit de routinematige monitoring en overall parameters. In een Zwitserse studie naar de effecten van een vergaande zuivering met ozon (RWZI Wüeri) werd bijvoorbeeld geen verandering van de IBGN-index (een Franse overall parameter) vastgesteld en ook het totaal aantal soorten veranderde nauwelijks. De SPEAR_{organic}-index (specifiek gevoelig voor de aanwezigheid van organische contaminanten) liet echter wel een verbetering zien, waarbij het aantal gevoelige soorten van 18 naar 30% was toegenomen. In de literatuur is ook de relatie tussen de SPEAR_{organic}-index en de EKR-waarde onderzocht. De aangetroffen toename van het aantal gevoelige soorten betekent volgens de auteurs dat de EKR-score door de vergaande zuivering waarschijnlijk met 1 klasse zou toenemen (van in dit geval ontoereikend naar matig). Het interessante van deze Zwitserse studie is dat ze de macrofaunagemeenschap ook een aantal jaren na het stopzetten van de ozon-behandeling hebben geïnventariseerd. Toen was het aantal gevoelige macrofauna-soorten weer op het oude (lage) niveau. Dit versterkt de relatie met de vergaande zuivering als causaal verband. Verder is in deze studie gekeken naar effecten op in kooitjes uitgezette vlokreeften. Ook deze gaven aan dat de ozon-behandeling de negatieve effecten van het RWZI-effluent op de macrofauna deed afnemen. In de reguliere situatie zonder vergaande zuivering met ozon bleek de voedselconsumptie van vlokreeften op benedenstroomse locaties zo'n 50-90% lager te liggen dan op bovenstroomse locaties en ook de dichtheid was benedenstrooms ca. 75% lager. Tijdens de ozon-behandeling werd deze significante afname van voedselconsumptie niet langer vastgesteld.

Een vergelijkbare toename in het aantal gevoelige macrofauna soorten werd ook vastgesteld in studies bij de Duitse RWZI Langwiese, waarbij naar het effect van poederkool is gekeken. In de periode voorafgaand aan de poederkooldosering werd bij deze RWZI vastgesteld dat het totaal aantal taxa op benedenstroomse locaties iets lager was dan op bovenstroomse locaties. Na de installatie van de poederkoolzuivering was het aantal taxa benedenstrooms iets toegenomen en was er geen significant verschil meer met het aantal taxa op de bovenstroomse locatie. De toename in soorten werd vooral veroorzaakt door een aantal als gevoelig bekendstaande macrofaunasoorten zoals haften, steenvliegen, enkele waterkevers (Elmidae) en kokerjuffers. Ook uit een multivariate-analyse bleek dat de macrofauna-monsters die voorafgaand aan de poederkooldosering waren genomen, duidelijk verschilden van de monsters, die tijdens de periode met een vergaande zuivering met poederkool waren genomen. Verder werden er ook in de seks-ratio van vlokreeften op boven- en benedenstroomse locaties verschillen vastgesteld. Voorafgaand aan de poederkoolzuivering was deze ratio op de benedenstroomse locatie in het voordeel van vrouwtjes verschoven (significant meer dan de enigszins scheve verhouding die ook van nature kan voorkomen). Direct na het in bedrijf nemen van de poederkoolzuivering is nog twee keer eenzelfde scheve verhouding vastgesteld, maar in de vijf daarna volgende inventarisaties werd dit niet meer vastgesteld. Dergelijke effecten zijn ook uit ander onderzoek onder meer gecontroleerde omstandigheden bekend en komen overeen met de *in vitro* testen, die aantoonen dat een vergaande zuivering met poederkool leidde tot een verlaging van de concentratie aan oestrogeen-actieve stoffen in zowel RWZI-effluent als de benedenstroomse locatie. Daarnaast werd een verschil in de vruchtbaarheid (aantal juvenielen) van de

vrouwelijke dieren vastgesteld. In de periode voorafgaand aan de poederkoldosering was de vruchtbaarheid op de benedenstroomse locatie lager dan bovenstrooms, terwijl dit verschil bij een werkende aanvullende poederkoldosering niet langer werd vastgesteld.

Ook in een Engelse studie (RWZI Swindon) bleek dat het voornaamste effect van een vergaande zuivering (granulair actief kool) met de SPEAR_{organic}-index werd aangetoond. Deze onderzoekers hebben geen gericht onderzoek uitgevoerd maar hebben de resultaten van 40 jaar routinematige macrofauna-monitoring gekoppeld aan drie in deze periode opgetreden aanpassingen van de RWZI. Uit deze studie bleek dat de grootste verbeteringen in de macrofaunagemeenschap van de rivier Ray waren terug te voeren op het in bedrijf nemen van een actief slibstelsysteem in 1991 en, in mindere mate, het starten met fosfaatverwijdering in 1999. Ten opzichte hiervan leidde een full-scale pilot met granulair actief-kool (2008-2014) niet tot vergelijkbare duidelijke verbeteringen. Desondanks nam de SPEAR_{organic}-index in 2008-2014 toe (van ca. 5-10 voorafgaand aan de vergaande zuivering tot 20% tijdens) en vertoonde ook verschillende families van kokerjuffers en watermijten opvallend hoge dichtheden. De onderzoekers concludeerden dat het RWZI-effluent momenteel niet langer de dominante stuurfactor op de macrofauna is, zoals dat in 1991 wel het geval was. Andere factoren zoals habitat en bovenstrooms agrarisch landgebruik speelden ook een rol en kunnen (mede) beperkend zijn voor een verder herstel (bijv. Munz *et al.*, 2017).

In een vierde studie is niet naar het effect van een vergaande zuivering gekeken maar naar het stopzetten van de RWZI van Wallernhausen. Gezien de kleine omvang (1300 i.e.) bleek het effectiever om de RWZI in zijn geheel te sluiten en het RWZI-effluent om te leiden naar een andere RWZI in de nabijheid. In deze studie is niet naar de macrofaunagemeenschap als geheel gekeken maar alleen naar de groep van vlokreeften (Gammaridae). Bij een werkende RWZI werd de bovenstroomse vlokreeft-populatie gedomineerd door *Gammarus fossarum*, terwijl benedenstrooms met name de minder gevoelige *Gammarus roeseli* werd aangetroffen. Ook de totale dichtheid van de vlokreeften was bovenstrooms veel hoger dan benedenstrooms. Na het stopzetten van de RWZI nam benedenstrooms zowel de dichtheid van *G. fossarum* als de totale dichtheid van de vlokreeften toe. Milieuverontreinigingen zijn echter niet de enige factor die dergelijke veranderingen in de populatiedynamiek van soorten kunnen veroorzaken. De sluiting van de RWZI kan ook leiden tot veranderingen in de nutriëntenbelasting, zuurstofgehalten en/of stroomsnelheden van de beek en ook deze factoren kunnen leiden tot veranderingen in de macrofaunagemeenschap. In het betreffende onderzoek is echter ook gekeken naar meer specifieke effecten, zoals de geslachtsverhouding van vlokreeften in het veld. Zo was, bij een werkende RWZI, het aandeel vrouwelijke vlokreeften op de benedenstroomse locatie opvallend laag en nam dit aandeel toe na de stopzetting. Daarnaast bleek het aandeel ei-dragende vrouwtjes bij een werkende RWZI benedenstrooms lager te zijn dan bovenstrooms en ook de broedselgrootte was lager. Vergelijkbare verschillen werden ook aangetoond in 28-daagse *in situ* en laboratorium experimenten, waaruit tevens bleek dat de benedenstroomse locatie tot een verhoogde sterfte leidde (43-58% t.o.v. 22-31% op de referentielocatie), die na het stopzetten van de RWZI niet meer werden aangetroffen. Ten slotte werden deze resultaten ondersteund door onderzoek met de slak *Potamopyrgys antipodarum*. Ook in dit geval werden bij een werkende RWZI effecten in zowel *in situ* als laboratorium-experimenten vastgesteld (sterfte, broedselgrootte), die na het stoppen van de RWZI niet meer werden aangetroffen.

Effecten op aquatische levensgemeenschappen

In alle vier beschikbare studies zijn veranderingen in de macrofaunagemeenschap vastgesteld als gevolg van een verbeterde zuivering (of het stopzetten hiervan). Tussen de studies zijn er wel verschillen in de mate van effect en in de causale onderbouwing. Waar de ene studie hoogstens een licht effect ziet dat beduidend kleiner is dan dat van de reguliere zuiveringsprocessen op een RWZI (actief slib systeem en fosfaatverwijdering), onderbouwd een andere het vastgestelde effect op populaties door laboratorium en *in situ* experimenten. In zijn algemeenheid lijken veranderingen met name op te treden bij soorten, die als gevoelig te boek staan zoals haften, kokerjuffers en steenvliegen en lijken deze verschillen beter met gericht onderzoek dan vanuit routinematige monitoring vast te stellen. Ten slotte melden alle auteurs dat de bovenstroomse delen van het stroomgebied ook vanuit andere bronnen worden belast en dat de bestudeerde RWZI daarmee niet de enige factor is die de macrofaunapopulatie beïnvloedt (en in sommige gevallen wellicht ook niet de belangrijkste).

3 Conclusies



3.1 Conclusies uit literatuur

In deze beknopte literatuurstudie is bekeken of vergaande zuivering op RWZI's kan leiden tot positieve ontwikkelingen op in de ecologische waterkwaliteit. Momenteel zijn er voor twaalf RWZI's onderzoeksgegevens voorhanden. Bij drie van deze RWZI's ging het om het installeren of verbeteren van een actief-slibstelsysteem dan wel het beëindigen van de lozing van het RWZI-effluent. Bij de resterende negen RWZI's ging het om de vergaande zuiveringstechnieken poederkool (2*), granulair actief kool (4*), ozon (5*) en chloordioxide (1*). Bij drie van deze negen RWZI's is niet alleen onderzoek gedaan naar de verbeteringen in de kwaliteit van het RWZI-effluent zelf (chemisch en biologisch) maar ook naar de effecten in het ontvangende oppervlaktewater. Dit is een beperkt aantal, waarbij niet alleen de proefopzet maar ook de situatie in het ontvangende oppervlaktewater verschilt. Hierdoor is het niet mogelijk om de verschillende vergaande zuiveringstechnieken onderling te vergelijken. Tegelijkertijd laten de onderzoeksgegevens van vergaande zuiveringen op RWZI's ook een aantal overeenkomsten zien:

1) Macrofauna reageert positief op vergaande zuivering

Bij alle drie op dit aspect onderzochte RWZI's is een positief effect op de macrofaunagemeenschap op benedenstroomse locaties aangetroffen. Deze verbetering betrof in alle drie gevallen een toename in macrofaunagroepen die als 'gevoelig' bekend staan, zoals haften, kokerjuffers en steenvliegen. Bij één van deze RWZI's werd geconcludeerd dat deze verbetering in de orde-grootte van één EKR-klasse zou kunnen liggen (in dit geval van ontoereikend naar matig). In één van de andere twee RWZI's werd juist geconcludeerd dat de verbetering vrij klein was en dat de RWZI niet langer de dominante factor op de macrofaunagemeenschap was maar dat ook andere factoren (zoals habitat en bovenstroomse belasting) een rol spelen.

2) De gezondheidstoestand van vissen verbetert door vergaande zuivering

Bij alle drie op dit aspect onderzochte RWZI's is een positief effect op de gezondheidstoestand van vissen vastgesteld. De uitgevoerde onderzoeken zijn divers van aard en daarom moeilijk onderling te vergelijken maar in zijn totaliteit is vastgesteld dat vergaande zuiveringen kunnen leiden tot i) een lagere bioaccumulatie van milieuvreemde stoffen; ii) verbeteringen van de groeisnelheid en iii) een afname van histopathologische afwijkingen, stressproteïnen, genotoxische effecten, vitellogenine (als indicator voor oestrogene effecten en kans op intersex) en enzymen betrokken bij de afbraak van milieuvreemde stoffen (cytochrom P₄₅₀). In één studie wordt melding gemaakt van een duidelijke verandering in de visgemeenschap aangezien tijdens de ozon-behandeling het aantal modderkruipers benedenstrooms sterk toenam. Waar parameters als bioaccumulatie, vitellogenine en genotoxische effecten een directe link met milieuverontreinigingen hebben, concluderen de onderzoekers ook dat causale relaties tussen vergaande zuivering en andere effecten zoals verbeterde groei in veldpopulaties of de genoemde toename van het aantal modderkruipers moeilijk zijn te leggen. Net zoals bij de macrofaunagemeenschap werd opgemerkt, concluderen de onderzoekers ook voor de visgemeenschap dat deze door vele factoren wordt beïnvloed en dat RWZI-effluent niet altijd de enige of meest dominante factor behoeft te zijn.

3) Vergaande zuivering kan verder tot een verlaging van toxiciteit, hormoonverstoring, genotoxiciteit en neurotoxiciteit leiden

Naast deze effecten op de levensgemeenschappen van macrofauna en vissen in het ontvangende oppervlaktewater tonen verschillende studies aan dat vergaande zuivering kan leiden tot

- een afname van de toxische effecten op organismen, die aan RWZI-effluent worden blootgesteld
- een afname van de effecten in allerlei *in vitro* testen met cellijnen (zoals oestrogene effecten, genotoxiciteit, neurotoxiciteit en de effecten van PAK's of dioxine-achtige stoffen). Dit betreft met name onderzoek aan RWZI-effluent maar ook in ontvangend oppervlaktewater is een verbetering aangetoond.

4) De lokale situatie bepaalt de omvang van deze effecten

De belangrijkste kanttekening is dat deze effecten niet altijd even duidelijk zijn en/of niet altijd worden aangetoond. Dat kan met allerlei oorzaken te maken hebben. Zo blijken sommige reguliere RWZI's met een actiefslib-systeem al een zodanig goede effluentkwaliteit op te leveren dat sommige negatieve effecten, die bij andere RWZI's wel worden aangetroffen, hier niet aanwezig zijn. In andere gevallen (met name bij vergaande oxidatie) wordt soms een toename van bepaalde negatieve effecten in het RWZI-effluent vastgesteld. Voor studies die de situatie in het ontvangende oppervlaktewater bestudeerden spelen nog weer andere factoren een rol, zoals de mate van verdunning van het effluent maar ook zaken als bovenstroomse emissies, de mate van eutrofiering of de habitatgesteldheid. De invloed van deze aspecten verschilt per effectparameter. Bij een effect als hormoonverstoring zullen RWZI's vaak tot de belangrijkste emissies behoren, waardoor vergaande zuivering dit effect ook effectief kan verkleinen. Dit is anders als men bijvoorbeeld naar de macrofaunagemeenschap kijkt. In zo'n situatie kunnen periodieke emissies van bijvoorbeeld gewasbeschermingsmiddelen in bovenstroomse delen het verwachte effect van vergaande zuivering ook weer te niet doen.

3.2 Extrapolatie naar de Nederlandse situatie

Om te beoordelen of bovenstaande conclusies ook op de Nederlandse situatie toepasbaar zijn, is nagegaan in hoeverre de aangetroffen biologische effecten overeenkomen. Dit is als volgt samen te vatten:

1) De in de literatuur beschreven effecten van RWZI effluent op *in vitro* en *in vivo*⁶ assays komen voldoende met de Nederlandse situatie overeen om extrapolaties naar de Nederlandse situatie te ondersteunen

Ook in Nederland worden biologische effectmetingen in toenemende mate toegepast om de ecotoxicologische effecten van RWZI-effluenten te beoordelen. Alhoewel de specifieke testen kunnen verschillen van de methoden, die in de bestudeerde literatuur zijn toegepast, komen de bestudeerde (achterliggende) werkingsmechanismen goed overeen. Zo is er ook in het merendeel van de thans bestudeerde Nederlandse RWZI-effluenten sprake van oestrogene effecten. Dergelijke effecten worden niet alleen in het RWZI-effluent maar ook in het benedenstroomse oppervlaktewater aangetroffen en dat niet alleen via *in vitro* assays maar ook in de daar aanwezige vissen (landelijke LOES⁷-onderzoek; Gerritsen et al., 2003; Vethaak et al., 2002). Daarnaast wordt er ook in Nederland onderzoek gedaan naar effecten op andere werkingsmechanismen. Onderzoek in het beheergebied van Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (Rutgrink, 2019) laat bijvoorbeeld zien dat blootstelling aan RWZI-effluent niet alleen tot verhoogde oestrogene effecten leidt maar ook tot verhoogde anti-androgene, antibiotica en glucocorticosteroïde effecten; wederom effecten die ook in de literatuur worden beschreven. Ook onderzoek in het beheergebied van Rijn-Oost wijst in die richting (Adeco, 2018). Verder blijkt blootstelling aan Nederlands RWZI-effluent ook tot effecten in de Microtox-test en tot verhoogde sterfte van watervlooien en vlokreeften te leiden (Van der Oost, 2016; Van der Oost & Ecofide, 2019; Ecofide, 2019). Ook deze effecten zijn vanuit de buitenlandse literatuur bekend.

⁶ *In vitro* assays betreffen biologische effectmetingen op basis van cellijnen. Bij *in vivo* assays is sprake van biologische effectmetingen met hele organismen.

⁷ LOES = Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen

Er zijn zeker ook verschillen. Zo is er in Nederland in relatie tot RWZI-effluenten nog nauwelijks onderzoek gedaan naar de bioaccumulatie in organismen en naar de gezondheidstoestand van vissen. Desondanks zijn de overeenkomsten voldoende groot om te veronderstellen dat de in de literatuur aangetroffen effecten van RWZI-effluenten ook op de Nederlandse situatie toepasbaar zijn. Een recent voorbeeld hiervan betreft een onderzoek naar de effecten van RWZI-effluent op de macrofauna. Onderzoekers van de Universiteit van Amsterdam (mond. mededeling M. de Baat) constateerden dat dit effect duidelijk was te kwantificeren aan de hand van een specifieke parameter namelijk de SPEAR_{organic}-index. Ook dit komt overeen met meerdere buitenlandse onderzoeken, zoals Ashauer (2016) en Johnson et al (2019).

2) De in de literatuur beschreven effecten van vergaande zuivering komen voldoende met de Nederlandse situatie overeen om extrapolaties naar de Nederlandse situatie te ondersteunen

Het effect van vergaande zuiveringstechnieken op *in vitro* en *in vivo* assays is in Nederland in beperkte mate onderzocht. Tegelijkertijd laten de drie beschikbare voorbeelden (PACAS, Groote Lucht [STOWA, 2018a,b] en onderzoek bij de RWZI van Aarle-Rixtel) zien dat vergaande zuivering veelal tot lagere effecten in *in vitro* en *in vivo* assays leidt. Dit komt overeen met bovenstaande conclusies op basis van de literatuur, aangezien ook in de literatuur is beschreven dat de verschillende vergaande zuiveringstechnieken tot meetbare reducties van de effecten in *in vitro* en *in vivo* assays leiden.

Als voorbeeld is gekeken naar oestrogene effecten, omdat die in de meeste effluenten sterk zijn verhoogd, relevant zijn voor de ecologie en goed tussen studies vergeleken kunnen worden, ook als de gebruikte testmethoden verschillen. Vanuit de buitenlandse literatuur blijkt dat verschillende vergaande zuiveringstechnieken de oestrogene effecten aanvullend met 70-90% kunnen verlagen (o.a. Abegglen et al, 2009; Baynes et al, 2012; Stalter et al, 2010b; Triebkorn et al, 2017). Ook in de Nederlandse pilotstudies bij de RWZI's van Aarle-Rixtel en Groote Lucht werden aanvullende verwijderingspercentages van 70 tot >90% aangetoond.

3) Ook in Nederland valt te verwachten dat vergaande zuivering tot positieve ontwikkelingen op de aquatische levensgemeenschap in het ontvangende oppervlaktewater kan leiden

Alhoewel extrapolaties altijd onzekerheden kennen is de verwachting dat implementatie van vergaande zuivering op Nederlandse RWZI's zal leiden tot:

- lagere concentraties van milieuverontreinigingen in het ontvangend oppervlaktewater, leidend tot lagere bioaccumulatie van deze stoffen in organismen (vissen)⁸.
- lagere ecotoxicologische effecten in *in vitro* en *in vivo* assays in ontvangend oppervlaktewater.
- positieve ontwikkelingen op aquatische levensgemeenschappen (met name op populaties van gevoelige macrofauna soorten als haften en kokerjuffers en op de gezondheidstoestand van vissen).

Hierbij gelden de volgende twee kanttekeningen:

- deze verwachtingen zijn gebaseerd op de aanname dat vergaande zuivering in Nederland met name wordt geïmplementeerd op RWZI's, waar het effluent van één of meerdere RWZI's óf een aanzienlijk (>50%) deel van het debiet in het ontvangende oppervlaktewater uitmaakt óf de benedenstroomse wateren substantieel beïnvloedt.
- de sterkte van de verwachte verbeteringen zal per RWZI verschillen. Het effect wordt groter naarmate de effecten meer gerelateerd zijn aan stoffen waar RWZI's een grote emissiebron van vormen en andere ecologische stuurfactoren zo goed mogelijk op orde zijn.

⁸ Dit kan ook bijdragen aan het realiseren van een goede chemische toestand, bijvoorbeeld voor prioritaire stoffen als PFOS en gebromeerde vlamvertragers waar de biotanorm in vis momenteel geregeld wordt overschreden.

Verwachte ecologische effect van de toepassing van vergaande zuivering in Nederland







Er zijn altijd mitsen en maren bij het veralgemeniseren van literatuurgegevens. Desondanks leidt de uitgevoerde beknopte literatuurstudie tot een positief beeld over het verwachte ecologische effect van de toepassing van vergaande zuiveringstechnieken op effluent van Nederlandse RWZI's. Concreet wordt verwacht dat in het ontvangend oppervlaktewater

- a) de **concentraties van milieuverontreinigingen zullen dalen**, leidend tot lagere bioaccumulatie van deze stoffen in organismen als vissen. Dit geldt voor allerlei medicijnresten maar ook voor een breder spectrum aan milieuvreemde stoffen
- b) de **toxiciteit zal afnemen**. Dit geldt voor allerlei toxicologische effecten op een diversiteit aan organismen, zoals sterfte of een lagere voortplanting bij ongewervelde dieren als watervlooien en vlokreeften maar ook het verminderd optreden van hormoonverstorende effecten zoals vervrouwelijking bij mannelijke vissen
- c) de **aquatische levensgemeenschappen herstellen**. Dit geldt met name voor de populaties van gevoelige macrofauna soorten als haften en kokerjuffers (dit zijn belangrijke taxa bij de KRW-scores) en voor de gezondheidstoestand van vissen.

4 Achterliggende gegevens per RWZI

In de afgelopen jaren is er in de wereld op meerdere RWZI's onderzoek gedaan naar de ecologische effecten van vergaande zuivering van RWZI-effluent. Aangezien soms meerdere onderzoeken op eenzelfde installatie zijn uitgevoerd, zijn de resultaten hieronder per RWZI beschreven. Naast onderzoek aan vergaande zuiveringstechnieken als poederkool en ozon, zijn er ook een aantal onderzoeken beschikbaar over de ecologische effecten van een RWZI-upgrade met minder vergaande technieken. Als dergelijke onderzoeken aanvullend inzicht geven in de relatie tussen concentraties aan verontreinigingen, ecotoxicologische effecten in *in vitro* of *in vivo* bioassays en in de daaraan gekoppelde ecologische effecten in het ontvangend watersysteem, zijn ook deze studies hieronder samengevat.

Bij het samenvatten van de resultaten is een onderscheid gemaakt in chemische analyses (alleen kort besproken), *in vitro* assays met cellijnen, enzymatische of morfologische effecten in blootgestelde organismen, ecotoxicologische effecten in bioassays en effecten op aquatische levensgemeenschappen. Aan het einde van iedere beschrijving per RWZI zijn de bevindingen kwalitatief samengevat in een kleurenschema. Hierbij is met name gelet op parameters die op een verschil (positief of negatief) duiden. In vrijwel alle onderzoeken zijn er namelijk ook onderzoekstechnieken of parameters toegepast, die uiteindelijk weinig verschil laten zien. Soms zijn de oorzaken hiervan nader onderzocht, maar in het algemeen geven deze resultaten weinig aanvullend inzicht in de vraag of vergaande zuivering tot positieve effecten op de ecologie in het ontvangende oppervlaktewater kan leiden. In deze kwalitatieve beoordeling is het onderstaande kleurenschema gehanteerd. Het onderscheid tussen een lichte en donkere kleur groen dan wel oranje is gebaseerd op de sterkte van het effect. In principe is bij statistisch significante effecten de donkere kleur gehanteerd en bij andere verschillen, die toch als betekenisvol worden gezien de lichte kleur.

	Niet onderzocht of niet vast te stellen
	Vergaande zuivering gaf geen verschil
	Vergaande zuivering verkleint de effecten licht
	Vergaande zuivering verkleint de effecten
	Vergaande zuivering versterkt de effecten licht
	Vergaande zuivering versterkt de effecten

RWZI van Swindon, Engeland

Bron: Johnson et al (2019); Pottinger et al (2011)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

Deze RWZI zuivert het afvalwater van de stad Swindon met ca. 220.000 inwoners. De RWZI is in 1991 uitgerust met een actief slib systeem en in 1999 met een extra stap gericht op het verwijderen van fosfaat. In 2008 is de RWZI uitgebreid met een full-scale granulair actief-kool installatie (deze pilot werd in 2014 beëindigd). De RWZI loost op de relatief kleine rivier Ray, waardoor benedenstreams van de RWZI tot zo'n 80% van het debiet uit gezuiverd effluent kan bestaan (met name in de zomerperiode).

Uitgevoerd onderzoek

In de eerste jaren van de full-scale granulair actief-kool installatie is er onderzoek gedaan naar de gevolgen voor de chemische waterkwaliteit en naar de gevolgen voor de lokaal aanwezige stekelbaarzen (Grover et al. 2011;

Pottinger et al. 2011a; Pottinger et al. 2011b). Verder is er geen gericht onderzoek naar de ecologische effecten van deze full-scale installatie uitgevoerd. Vanaf 1977 wordt de macrofauna in de rivier Ray echter wel routinematig gemonitord op één bovenstroomse en twee benedenstroomse locaties. In de huidige studie (Johnson et al., 2019) is bestudeerd in hoeverre de trends in zowel de chemische waterkwaliteit als de macrofauna zijn te correleren aan de drie upgrades van de RWZI (1991: actief slib systeem; 1999: fosfaat verwijdering; 2008: granulair actief-kool). Voor alle drie de locaties waren over de periode 1977 – 2014 ten minste 36 macrofauna inventarisaties beschikbaar, waarbij er in meerdere jaren twee keer is bemonsterd.

Resultaten

De benedenstroomse waterkwaliteit vertoonde over deze periode merkbare verbeteringen. Met name de installatie van het actief slib systeem in 1991 leidde tot een duidelijke verbetering van de zuurstof-, BZV en ammonium-concentraties. Ook het opstarten van fosfaat-verwijdering in 1999 leidde tot een duidelijke verbetering in de benedenstroomse fosfaatconcentraties. Ten opzichte van deze twee aanpassingen leidde het granulair actief-kool systeem niet tot een noemenswaardige verbetering van de algehele waterkwaliteit, maar deze routinematige monitoring omvatte geen metingen aan specifieke milieuverontreinigingen. Pilot-onderzoek in 2008 toonde echter aan dat de granulair actief-kool installatie wel leidde tot een verlaging van bijv. de concentraties van oestrogen-actieve stoffen.

De veranderingen in de macrofaunagemeenschap kwamen goed overeen met deze veranderingen in de algemene chemische waterkwaliteit. De sterkste verbetering in de macrofaunagemeenschap begint in 1991 als gevolg van de verbeterde zuurstof- en verlaagde BZV- en ammonium-concentraties. Ook in de periode na 1999 zijn er een aantal macrofauna families, die weer in de benedenstroomse delen worden aangetroffen, maar de verbeteringen in de macrofaunagemeenschap zijn minder sterk. Ten opzichte hiervan heeft het in bedrijf stellen van het granulair actief-kool systeem niet geleid tot vergelijkbare verbeteringen van de macrofaunagemeenschap. De onderzoekers concluderen dat dit komt door een verschuiving in de dominante stuurfactoren. Waar de RWZI in 1991 de dominante stuurfactor was, is die invloed in de loop der tijd afgenomen en heden ten dage niet langer de enige relevante stuurfactor. Momenteel wordt de macrofaunagemeenschap niet alleen door de RWZI beïnvloed maar ook door factoren als de habitatstructuur, zuurstofgehalten, de aanwezigheid van waterplanten en de belasting van bovenstroomse delen uit bijvoorbeeld agrarisch landgebruik. Het ecologisch effect van het verder verlagen van de milieubelasting uit de RWZI hangt dan tevens af van de mate waarin de andere factoren beperkend zijn. Ondanks de conclusie dat de RWZI niet langer de dominante factor is, stellen de onderzoekers tijdens de proef met granulair actief-kool ook enkele kleinere veranderingen vast, die op een verder herstel duiden. Zo werd vastgesteld dat de SPEAR_{organic}-index (deze index is specifiek gevoelig voor de aanwezigheid van organische contaminanten) ten tijde van de granulair actief-kool installatie iets toenam (van gemiddeld 10 naar 20%). Ook in de dichtheden van individuele macrofauna families werden opvallend hoge waarden in de periode na 2008 vastgesteld (bijv. voor kokerjuffers en watermijten). Het is echter moeilijk om te concluderen in hoeverre dit nu een causaal effect van het granulair actief-kool systeem is. Het kan ook duiden op een langzame trend van continue verbeteringen in de waterkwaliteit sinds 1991.

Naast dit macrofauna onderzoek is ook onderzocht of de granulair actief-kool installatie tot een verandering in de van nature aanwezige driedoornige stekelbaarzen leidt. Uit dit onderzoek bleek dat na het in bedrijf stellen van de granulair actief-kool behandeling de groeisnelheid van de dieren duidelijk hoger was dan in het voorafgaande jaar⁹. Tegelijkertijd kon niet worden uitgesloten dat deze effecten niet ook (deels) door andere effecten, zoals verhoogde zuurstofconcentraties of veranderde voedselbeschikbaarheid zijn veroorzaakt.

Conclusie

Over een periode van 40 jaar (>1977) zijn de grootste verbeteringen in de macrofaunagemeenschap van de rivier Ray terug te voeren op het opstarten van een actief slibstelsysteem in 1991 en, in mindere mate, fosfaatverwijdering in 1999. Ten opzichte hiervan leidde een full-scale pilot met granulair actief-kool (periode 2008-2014) niet tot vergelijkbare sterke verbeteringen. Desondanks nam de SPEAR_{organic}-index (specifiek gevoelig voor de aanwezigheid van organische contaminanten) in 2008-2014 toe (van ca. 10 naar 20%) en vertoonde ook verschillende families van kokerjuffers en watermijten opvallend hoge dichtheden. De onderzoekers concluderen dat het RWZI-effluent momenteel niet langer de dominante stuurfactor op de macrofauna is, zoals dat in 1991

⁹ Dit werd ondersteund door veranderingen in de RNA/DNA verhouding.

wel het geval was. Andere factoren zoals habitat, waterplanten, agrarisch landgebruik bovenstrooms spelen ook een rol en kunnen (mede) beperkend zijn voor een verder herstel.

Blootstelling aan effluent						Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			Populatie
			Cel	Morf.	Tox			Cel	Morf.	Tox	
GAK											

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;

GAK: Granulair Actief Kool

RWZI Langwiese, Ravensburg, Duitsland

Bronnen: Henneberg & Triebkorn (2015); Maier et al (2016); Peschke et al (2016; 2019); Thellmann et al (2015, 2017); Triebkorn et al (2017); Wilhelm et al (2018)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

De RWZI is gebouwd om het afvalwater van 170.000 inwoner equivalenten te behandelen en is één van de grotere RWZI's, die op de rivier Schussen loost. In totaal ontvangt deze rivier het effluent van 20 RWZI's en meer dan 100 riooloverstorten. Tot 2013 was deze RWZI uitgerust met een biologisch actiefslib zuiveringsproces en een chemische defosfateringsstap, waarna het afvalwater ten slotte over een zandfilter (met flocculatie) werd geleid. In september 2013 is de RWZI uitgebreid met een full-scale poederkool installatie. Deze werd voor het zandfilter geplaatst.

Noot. Het bij RWZI Langwiese uitgevoerde onderzoek maakte onderdeel uit van een drietal opvolgende projecten (SchussenAktiv, SchussenAktivplus en SchussenAktivplus+; Triebkorn et al, 2017). In deze projecten is ook onderzoek gedaan naar de RWZI van Eriskirch (zie hieronder). Daarnaast is er door dezelfde onderzoeksgroep gekeken naar de RWZI's van Ebingen en Lautlingen (Thellmann et al., 2015). Bij deze RWZI's werd ruim 20 jaar geleden een poederkoolinstallatie geplaatst, primair om de sterke kleuring van het effluent (textielindustrie) te verminderen. Ondanks het feit dat er momenteel geen effecten worden vastgesteld, is dit onderzoek hier niet verder beschreven omdat er geen direct vergelijkbare resultaten uit de situatie vóór de plaatsing van de poederkoolinstallaties bekend zijn.

Uitgevoerd onderzoek

Op de RWZI Langwiese zijn zeer veel verschillende onderzoeken uitgevoerd. Deze zijn samengevat in het eindrapport (Triebkorn et al, 2017) en ondertussen ook deels in verschillende artikelen gepubliceerd. In het onderzoek is niet alleen naar de ecotoxicologische effecten gekeken maar is ook aandacht besteed aan allerlei technische aspecten, kosten, bacteriële samenstelling, antibiotica resistentie en een groot pakket chemische analyses. In het ecotoxicologische onderzoek is een combinatie gemaakt van laboratorium experimenten, experimenten in doorstroom aquaria met RWZI-effluent of oppervlaktewater en experimenten in het oppervlaktewater zelf (*in situ*).

Als effectparameters is in zowel RWZI-effluent als oppervlaktewater gekeken naar verschillende *in vitro* testen (dioxine-achtige activiteit, genotoxiciteit, hormoonverstoring) en ecotoxicologische testen (Early Life Stage [ELS] testen met zebravis-larven alsmede chronische toxiciteit voor de slak *Potamopyrgus antipodarum*, de oligochaete worm *Lumbriculus variegatus* en kroos). Ook is gekeken naar de effecten op de macrofauna. Hierbij is specifiek gekeken naar eventuele effecten bij vlokreeften en tevens gekeken naar de macrofaunagemeenschap als geheel. In beide gevallen zijn er telkens meerdere inventarisaties uitgevoerd, zodat eventuele effecten van de poederkoolzuivering van temporele variaties onderscheiden konden worden. Binnen het onderzoek aan vlokreeften (Gammariden) is gekeken naar effecten op het eiwit Hsp70 (stress inductie), de vruchtbaarheid van vrouwelijke dieren en de seks-ratio in het veld alsmede naar het vóórkomen van verschillende soorten Gammarus in het ontvangende oppervlaktewater. Ten slotte zijn er ook allerlei visstudies uitgevoerd. Hierbij is gebruik gemaakt van beekforel (doorstroomaquaria met oppervlaktewater) en regenboogforel (doorstroomaquaria met oppervlaktewater en kooi-studies in oppervlaktewater) maar is ook naar de inheemse visfauna gekeken. Onderzochte parameters zijn hierbij bioaccumulatie, histopathologie, glycogeen, stressproteïnen (Hsp70), genotoxiciteit (micronuclei), EROD-activiteit¹⁰ en vitellogenine gehalten.

¹⁰ Maat voor een keten van effecten, die beginnen met de binding aan de Ah-receptor en uiteindelijk kunnen leiden tot groeivertraging en reproductiestoringen.

Resultaten

Gelet op het doel van deze literatuurstudie zijn vooral de effecten op de macrofauna en vissen uitgebreider samengevat. Voor de effecten op *in vitro* testen en het ecotoxicologische onderzoek zijn de belangrijkste bevindingen kort weergegeven.

Chemische analyses

De vergaande zuivering met poederkool leidde tot een significante verlaging van de concentraties van stoffen als benzotriazolonen (o.a. 1H, 4-methyl, 5-methyl), diclofenac, carbamazepine, sulfamethoxazol en metoprolol. Deze verlaging werd in zowel het RWZI-effluent als het ontvangend oppervlaktewater vastgesteld. De bereikte aanvullende verwijdering varieerde tussen de 60-90% afhankelijk van de stof.

In vitro testen

In het RWZI-effluent leidt de poederkoolinstallatie tot een afname van de genotoxiciteit (SOS-chromotest), effecten van dioxine-achtige stoffen (H4IIE-luc assay) en oestrogeniteit (YES-assay; E-screen). De anti-oestrogene effecten namen echter toe (YAES-assay), terwijl androgene en anti-androgene effecten al in het reguliere effluent nauwelijks werden aangetroffen.

Voor de effecten van dioxine-achtige stoffen werd deze verlaging door de poederkool-dosering ook in het oppervlaktewater van de benedenstroomse locatie vastgesteld. Voor genotoxiciteit en oestrogeniteit konden geen conclusies getrokken worden omdat deze effecten voorafgaand aan de poederkoolinstallatie al niet in het oppervlaktewater werden aangetroffen dan wel doordat de effecten op de bovenstroomse controle locaties te veel in de tijd varieerden.

Ecotoxicologische effecten

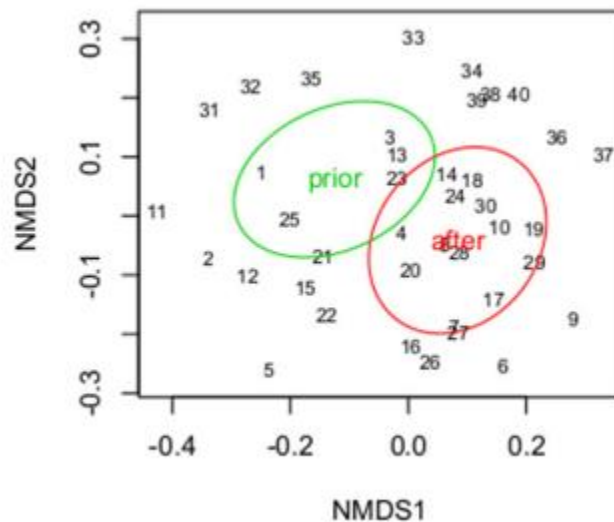
In de zebavis ELS-test werd vastgesteld dat ook in het reguliere zuiveringsproces ecotoxicologische effecten op de jonge, zich ontwikkelende larven effectief werden gereduceerd (vergelijking influent-effluent). Ten opzichte hiervan kon de vergaande zuivering met poederkool niet tot een hele duidelijke verbetering leiden maar er was wel sprake van een lichte verbetering in de hatching van de eieren. In het ontvangende oppervlaktewater waren de effecten van de vergaande zuivering duidelijker en werd op benedenstroomse locaties een significante verbetering vastgesteld door de vergaande zuivering met poederkool. Dit verschil in effect ten opzichte van het RWZI-effluent werd volgens de auteurs mogelijk veroorzaakt door een "stapeling van effecten", waarbij ook bovenstrooms gelegen emissiebronnen (waaronder enkele RWZI's) hebben kunnen bijdragen aan het ecotoxicologisch effect op de zebavislarven. In de chronische test met de slak *Potamopyrgys antipodarum* bleek blootstelling aan het reguliere RWZI-effluent tot een lager aantal embryo's te leiden, terwijl de poederkool behandeling dit embryotoxisch effect liet afnemen (17-24% meer embryo's).

In het oppervlaktewater werd ook gekeken naar de groei van kroos en de voortplanting van de slak *P. antipodarum* en de oligochaete worm *L. variegatus*. Voor geen van de organismen werd een verschil tussen de boven- en benedenstroomse locaties vastgesteld en leidde de poederkoolbehandeling dan ook niet tot veranderingen.

Macrofauna

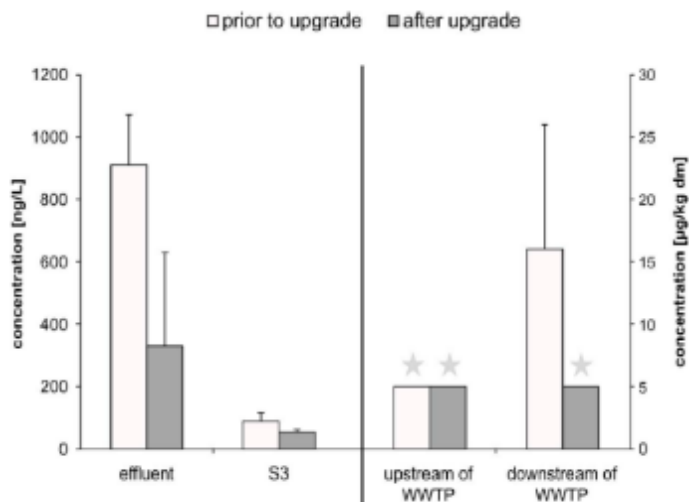
De analyses van het Hsp70 eiwit waren erg variabel, waardoor er geen significante verschillen tussen de locaties werden aangetroffen en ook niet als gevolg van de poederkool installatie. Wel werden in benedenstrooms blootgestelde vlokreeften hogere gehalten aan PFOS en PBDE's vastgesteld in vergelijking met een bovenstroomse locaties (alleen voorafgaand aan de poederkoolinstallatie onderzocht). Ook in de seks-ratio van de vlokreeften op boven- en benedenstroomse locaties werden verschillen vastgesteld. Op de benedenstroomse locatie was deze ratio, voorafgaand aan de installatie van de poederkoolzuivering, in het voordeel van vrouwtjes verschoven (significant meer dan de enigszins scheve verhouding die ook van nature kan voorkomen). Direct na de installatie van de poederkoolzuivering is nog twee keer eenzelfde scheve verhouding vastgesteld maar in de vijf daarna volgende inventarisaties werd dit niet meer vastgesteld. Dergelijke effecten zijn ook uit ander onderzoek onder meer gecontroleerde omstandigheden bekend en komen overeen met de *in vitro* testen (E-screen), die aantoonde dat de poederkoolinstallatie leidde tot een verlaging van de concentratie aan oestrogeen-actieve stoffen in zowel effluent als de benedenstroomse locatie. Daarnaast werd een vergelijkbaar verschil in de vruchtbaarheid (aantal juveniele) van de vrouwelijke dieren vastgesteld. In de periode voorafgaand aan de poederkoolbehandeling was de vruchtbaarheid op de benedenstroomse locatie lager dan bovenstrooms, terwijl dit verschil bij een werkende poederkoolinstallatie niet langer werd vastgesteld.

Ook in de macrofaunagemeenschap werden verschillen gevonden. Zo was in de periode voorafgaand aan de vergaande zuivering met poederkool het totaal aantal taxa op de benedenstroomse locaties lager dan op de bovenstroomse locaties. Na de installatie van de poederkoolzuivering was het aantal taxa benedenstrooms iets toegenomen en was er geen significant verschil meer met het aantal taxa op de bovenstroomse locatie. De toename was vooral te zien in 'gevoelige' macrofauna soorten als haften, steenvliegen, enkele waterkevers (*Elmidae*) en kokerjuffers. Ook in een multivariate-analyse van de macrofaunagemeenschappen bleek dat de monsters, die voorafgaand aan de vergaande zuivering met poederkool waren genomen, duidelijk verschilden van de macrofaunamonsters, genomen na de installatie van de vergaande zuivering met poederkool. In bijgaand figuur is dit geïllustreerd door de positie van de monsters genomen voorafgaand aan de vergaande zuivering met een groene cirkel te markeren, terwijl de monsters genomen tijdens de vergaande zuivering met poederkool in de rode cirkel zijn gelegen. De geringe overlap tussen beide cirkels duidt op een significante verandering van de macrofaunagemeenschap als gevolg van de vergaande zuivering met poederkool.



Vis

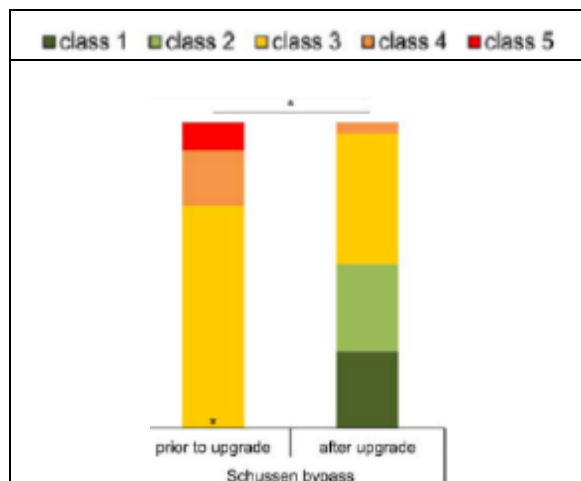
In overeenstemming met de chemische analyses in water bleek ook uit de bioaccumulatie in blootgestelde regenboogforel dat een aanvullende zuivering met poederkool de milieubelasting verlaagd. Zo waren de diclofenac en PFOS concentraties in vissen na het in bedrijfstellen van de vergaande zuivering met poederkool significant lager (zie onderstaand figuur).



Gehalte van diclofenac in spieren van uitgehangen regenboogforel nemen af door poederkool dosering (rechterdeel van figuur; linkerdeel is diclofenac in water monsters; S3 is een locatie benedenstrooms)

Verder werd ook in de van nature aanwezige gestippelde alver een verlaging van de PFOS-gehalten vastgesteld. Ook uit andere parameters bleek dat vissen, blootgesteld tijdens de vergaande zuivering met poederkool, minder nadelige effecten ondervonden in vergelijking met de reguliere situatie. De effecten verschilden tussen soorten en per jaar en werden ook niet altijd vastgesteld. Desondanks werden er bij de histopathologie van zowel gestippelde alver als gekooide regenboogforellen minder afwijkingen in lever, kieuwen en nieren aangetroffen, en waren er indicaties dat de energiereserve (glycogeen gehalte, regenboogforel) toe nam en de gehalten aan stressproteïnen (in doorstroomsystemen met zowel regenboogforel als beekforel) afnamen.

Histopathologie in lever van beekforel in een benedenstroom gelegen bypass locatie. De histopathologie is in vijf klassen beoordeeld, waarbij de donker groene kleur voor de minst aangetaste situatie staat en de rode kleur voor de meest aangetaste situatie staat. Links is de situatie in de reguliere situatie; rechts de histopathologische beoordeling van vissen tijdens de vergaande zuivering met poederkool.



Voor stoffen met een dioxine-achtige werking lieten de uitgevoerde *in vitro* testen (H4IIE-luc) zien dat de reguliere zuiveringstechnieken al een groot deel van de activiteit verwijderden. Waar deze verwijdering niet volledig was, bleek de aanvullende zuivering met poederkool de activiteit verder te verlagen tot waarden lager dan de detectiegrens. Dit effect was ook terug te zien in de EROD-activiteit¹¹ in levercellen van blootgestelde vissen. In gekooide regenboogforellen voorafgaand aan de vergaande zuivering met poederkool was de EROD-activiteit op de benedenstroomse locatie namelijk significant hoger dan op de referentielocatie bovenstrooms én op de benedenstroomse locatie na het in bedrijf stellen van de poederkool-zuivering. Eenzelfde verlaging van de EROD-activiteit werd ook vastgesteld in beekforel en regenboogforellen, die voorafgaand en na het opstarten van de vergaande zuivering in doorstroom systemen aan het oppervlaktewater werden blootgesteld. Ook op genotoxische parameters (micronuclei in bloedcellen van gekooide regenboogforellen) werd eenzelfde effect vastgesteld: voorafgaand aan de aanvullende zuivering met poederkool was de frequentie waarmee micronuclei in bloedcellen van forellen op de benedenstroomse locatie werden aangetroffen significant hoger dan op bovenstroomse locaties. Na de installatie van het poederkoolsysteem was de frequentie afgenomen en werd ook dit verschil tussen boven- en benedenstroomse locaties niet langer aangetroffen.

Naast deze effecten op EROD en genotoxiciteit is ook gekeken naar de vitellogenine (Vtg) gehalten in beekforel en regenboogforel. Hier waren de verschillen kleiner (weinig tot geen inductie van Vtg tijdens het reguliere zuiveringsproces) en trad een grote variatie tussen de jaren op die de interpretatie bemoeilijkte. In gekooide regenboogforellen werden voorafgaand aan de vergaande zuivering met poederkool geen verhoogde Vtg-gehalten vastgesteld en was er dan ook geen verlaging door de vergaande zuivering met poederkool vast te stellen. In de doorstroomsystemen werden in zowel regenboogforel als beekforel wel verhoogde Vtg-gehalten vastgesteld en bleek tevens dat deze verhoogde Vtg-gehalten na de installatie van het poederkoolsysteem weer afnamen.

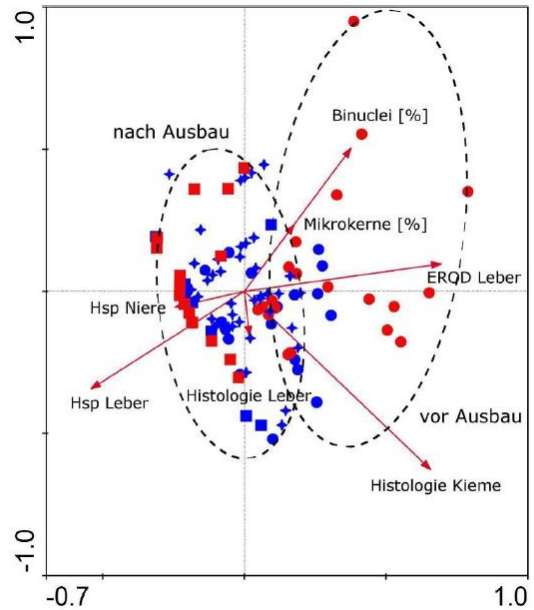
Multivariate-analyses

Terwijl voor sommige parameters eenduidige en significante effecten werden vastgesteld, was het beeld voor andere parameters meer variabel en werden er soms 'indicaties' van verbeteringen als gevolg van de vergaande zuivering met poederkool aangetroffen. Om de verschillen meer integraal te beoordelen zijn er verschillende multivariate-analyses uitgevoerd. Voor het onderzoek aan oppervlaktewater laten deze over het algemeen zien dat de monsters voorafgaand aan de poederkool-behandeling afwijken van de monsters tijdens de poederkool-behandeling.

Dit is in onderstaand figuur geïllustreerd voor het onderzoek aan gekooide regenboogforellen.

¹¹ Maat voor een keten van effecten, die beginnen met de binding aan de Ah-receptor en uiteindelijk kunnen leiden tot groeivertraging en reproductiestoringen.

Multivariate analyse van al het onderzoek uitgevoerd aan de boven- en benedenstreams in kooien blootgestelde regenboogforellen (bovenstreams: blauwe markering; benedenstreams: rode markering). De drie symbolen (cirkel, ster, vierkant) geven opeenvolgende jaren aan (2012/13, 2013/14 en 2014/15). Met name door de opvallende resultaten met de micronuclei, EROD en histopathologie liggen de onderzoeksgegevens voorafgaand aan de vergaande zuivering met poederkool aan de rechterkant van het figuur (cirkel "vor Ausbau") terwijl de resultaten verzameld tijdens de vergaande zuivering aan de linkerkant zijn gepositioneerd (cirkel "nach Ausbau"). De geringe overlap tussen beide illustreert dat er een significant verschil tussen beide situaties is.



Conclusie

In het onderzoek dat zich op het effluent zelf richtte bleek dat de extra poederkool-zuivering niet alleen tot lagere concentraties van een groot aantal stoffen leidde maar ook tot een afname in het effect van dioxine-achtige stoffen, genotoxiciteit en oestrogeniteit (*in vitro*). Daarnaast hadden blootgestelde vissen een betere gezondheidstoestand (histopathologie) en namen de ecotoxicologische effecten in zebrafish-larven en slakken af door de poederkoolbehandeling.

Ook in het oppervlaktewater werden positieve effecten van de poederkoolbehandeling vastgesteld. Naast dalende concentraties van milieuverontreinigingen in zowel het oppervlaktewater als in vissen, nam de activiteit van dioxine-achtige stoffen af in zowel *in vitro*-assays als in vissen en nam in blootgestelde vissen de gezondheidstoestand (histopathologie) en energievoorraad toe terwijl de genotoxiciteit en stressproteïnen juist afnamen. Ook in de ELS-test met zebrafish-larven werd een afname van de ecotoxiciteit vastgesteld als gevolg van de vergaande zuivering met poederkool.

Ten slotte werden er ook op de macrofaunagemeenschap verbeteringen door de vergaande zuivering met poederkool vastgesteld. Zo bleken de eerder aangetroffen veranderingen in de seks-ratio en de lagere vruchtbaarheid van vlokreeften op benedenstroomse locaties te verdwijnen en nam zowel het totaal aantal macrofauna taxa als het aantal gevoelige macrofaunasoorten benedenstreams toe.

	Blootstelling aan effluent				
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		
			Cel	Morf.	Tox
PAK					

	Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			Populatie
			Cel	Morf.	Tox	

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;

PAK: poederkool

RWZI Eriskirch, Ravensburg, Duitsland

Bronnen: Giebner et al (2018); Henneberg & Triebkorn (2015); Maier et al (2016); Triebkorn et al (2017)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

De zuivering is opgezet voor 40.000 inwonerequivalenten en is in de reguliere toestand gebaseerd op een biologische actiefslib-zuivering met P-verwijdering en een zandfiltratie. Als vergaande zuivering is via een pilot-installatie onderzoek gedaan aan de effecten van ozon gevolgd door ofwel zandfiltratie, ofwel granulaire actief kool dan wel een combinatie van beide.

Uitgevoerd onderzoek

Ook op deze RWZI zijn meerdere onderzoeken uitgevoerd, zoals samengevat in het eindrapport (Triebkorn et al, 2017) en ondertussen ook deels in verschillende artikelen gepubliceerd. Op hoofdlijn werd eenzelfde aanpak

gekozen als bij de RWZI Langwiese door zoveel mogelijk verschillende onderzoekstechnieken toe te passen (laboratorium testen maar ook doorstroomsystemen on site), waarmee de resultaten elkaar kunnen aanvullen. Het onderzoek is echter minder grootschalig opgezet dan bij RWZI Langwiese. Zo is in veel onderzoeken een vergelijking gemaakt tussen het reguliere effluent (biologische zuivering plus zandfiltratie) en het *gezamenlijke* effluent van de vergaande zuiveringstechnieken ozon en granulair actief kool. Op een beperkt aantal parameters (zoals chemische analyses) werd wel een onderscheid tussen de verschillende vergaande zuiveringstechnieken gemaakt. Het effluent van de pilot-installatie werd niet op de rivier Schussen geloosd, waardoor er geen onderzoek in het oppervlaktewater is uitgevoerd.

In het onderzoek is gekeken naar verschillende *in vitro* testen (dioxine-achtige activiteit, mutageniteit en hormoonverstorende effecten), ecotoxicologische testen (Ames-test, chronische testen met zebra-vis-larven en slakken) en enzymatische en histopathologische effecten in vissen, blootgesteld in doorstroomaquaria (EROD-activiteit en vitellogenine in regenboogforel).

Resultaten

Chemisch

De vergaande zuivering leidde tot een significante verlaging van de concentraties van stoffen als 1H-benzotriazol, diclofenac, sulfamethoxazol en carbamazepine. Voor diclofenac werd ook in regenboogforellen vastgesteld dat de vergaande zuiveringstechnieken tot een lagere bioaccumulatie leidden. Voor PFOS werd vastgesteld dat met name de toepassing van actief kool tot een verlaging van de concentraties in water leidt.

In vitro testen

In RWZI-effluent leiden de vergaande zuiveringstechnieken tot een afname van de effecten van dioxine-achtige stoffen (H4IIE-luc assay) en oestrogeniteit (YES-assay; E-screen). De behandeling met ozon bleek de mutageniteit van het afvalwater te verhogen. Daarnaast bleek het granulair actief kool de anti-oestrogene effecten (YAES-assay) te verhogen, terwijl ozon deze juist liet afnemen. Androgene en anti-androgene effecten werden in het reguliere effluent al nauwelijks aangetroffen en dus kon er geen conclusie over de effectiviteit van vergaande zuivering op deze parameters worden getrokken.

Ecotoxicologische effecten

In de zebra-vis ELS-test werden geen effecten van het effluent vastgesteld. Dit betrof zowel het reguliere effluent als het effluent van de vergaande zuiveringstechnieken. In de chronische test met de slak *Potamopyrgys antipodarum* bleek blootstelling aan het reguliere effluent tot een lager aantal embryo's te leiden, terwijl de verschillende vergaande zuiveringstechnieken dit ecotoxicologisch effect nog iets versterkten.

Vis

In het gezamenlijke RWZI-effluent van de toegepaste vergaande zuiveringstechnieken werd een verbetering van de gezondheidstoestand (histopathologie) van regenboogforellen vastgesteld. Daarnaast bleken ook de mutagene effecten (micronuclei in erythrocyten) af te nemen. Voor stoffen met een dioxine-achtige werking lieten de uitgevoerde *in vitro* testen zien dat de vergaande zuivering deze effecten verkleint. Dit effect was ook terug te zien in de EROD-activiteit in levercellen van blootgestelde vissen. De EROD-activiteit was verhoogd bij blootstelling aan het reguliere effluent en lager bij blootstelling aan het effluent dat met de vergaande zuiveringstechnieken was behandeld.

Naast dit effect op EROD is ook gekeken naar de vitellogenine (Vtg) gehalten in beekforel en regenboogforel. Hier waren de verschillen kleiner (weinig tot geen inductie van Vtg voorafgaand aan de vergaande zuivering) en trad een grote variatie tussen de jaren op waardoor er geen effect van de vergaande zuivering kon worden vastgesteld.

Conclusie

De toegepaste vergaande zuiveringstechnieken (ozon en granulair actief-kool) bleken niet alleen de concentraties van allerlei milieuverontreinigingen te verlagen (in RWZI-effluent én in vissen) maar ook tot lagere effecten te leiden van dioxine-achtige en oestrogene stoffen, zoals die in *in vitro* assays werden vastgesteld. Overigens werden er in sommige andere assays juist hogere effecten na de vergaande zuivering vastgesteld. Dit betrof bijvoorbeeld een verhoging van de mutageniteit door ozon. De RWZI Eriskirch leidde in vergelijking met de RWZI Langwiese in zijn algemeenheid tot minder ecotoxicologische effecten. Wel werd vastgesteld dat de afname van

de effecten van dioxine-achtige stoffen door de vergaande zuivering niet alleen in *in vitro* assays optrad maar ook in blootgestelde vissen kon worden aangetoond. Ook mutagene effecten in vissen bleken af te nemen.

Blootstelling aan effluent						Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			Populatie					
			Cel	Morf.	Tox						
Ozon											
GAK											
Beide											

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten; GAK: Granulair Actief-kool; Beide: blootstelling vond plaats aan het gezamenlijke effluent van beide technieken

RWZI Wüeri, Regensdorf, Zwitserland

Bron: Abegglen et al (2009), Ashauer (2016) & Bundschuh et al (2011), Stalter et al (2010a)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

Als onderdeel van het onderzoeksprogramma "Strategie Micropoll" heeft een consortium onder leiding van EAWAG meerdere jaren onderzoek gedaan aan de RWZI Wüeri, die tijdelijk was voorzien van een extra, full-scale zuivering met ozon. Deze RWZI behandelt huishoudelijk (15.000 i.e.) en industrieel (10.000 i.e.) afvalwater met een combinatie van een actief slib systeem en vergaande nutriëntenverwijdering gevolgd door zandfiltratie. Het RWZI-effluent wordt geloosd op de Furtbach-beek, waarbij het debiet ongeveer wordt verdubbeld.

Uitgevoerd onderzoek

Naast allerlei meer technisch gericht onderzoek is er ook op allerlei manieren naar de aanwezigheid en effecten van milieuverontreinigingen gekeken. De resultaten hiervan zijn samengevat door Abegglen et al (2009) en gedeeltelijk ook in aparte publicaties verschenen (Ashauer; 2016 & Bundschuh et al, 2011a; 2011b). Er is onderzoek gedaan aan de ecotoxicologische effecten in zowel geëxtraheerd als onbehandeld RWZI-effluent. Hierbij is gekeken naar effecten in de Microtox, algentest, YES-assay (oestrogene effecten), AchE-remmingstest (Acetylcholine esterase; gericht op insecticiden) en Umu-test (genotoxiciteit) (alle testen zijn uitgevoerd met geëxtraheerde monsters) en naar standaard testen met watervlooien, algen, kroos en zebravis-eieren in onbehandeld RWZI-effluent. Daarnaast zijn een aantal niet-standaard testen toegepast zoals onderzoek naar de voedselconsumptie van vlokreeften, testen met oligochaete wormen, muggenlarven en slakken en een Early Life Stage (ELS) test in doorstroomaquaria met regenboogforellen.

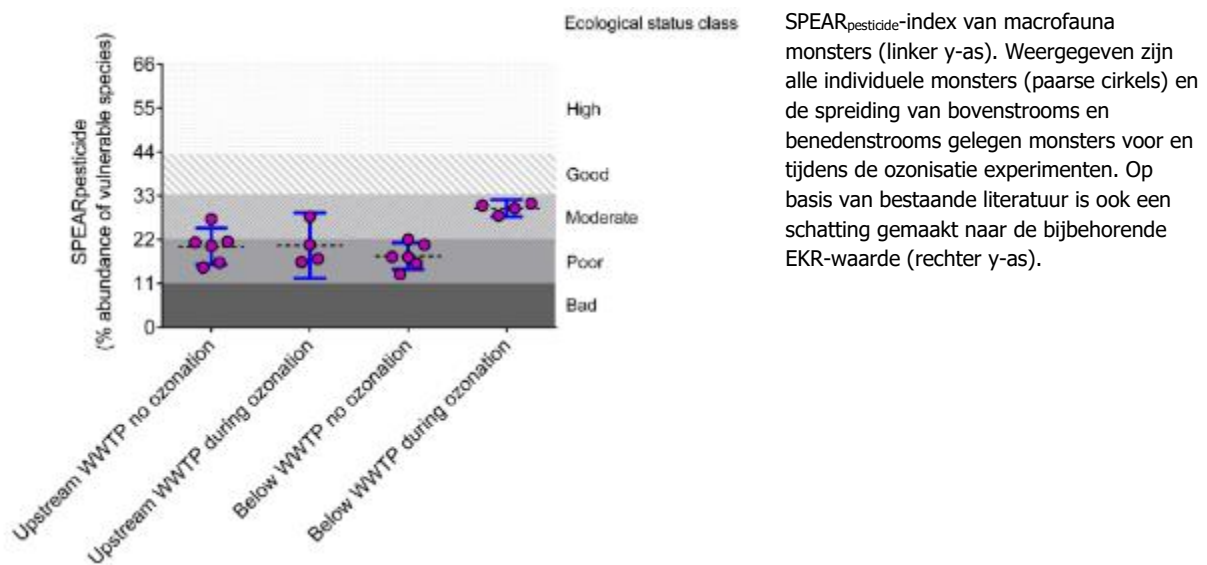
Naast dit onderzoek aan het RWZI-effluent zelf zijn er ook verschillende studies in het ontvangende oppervlaktewater uitgevoerd. Zo zijn er op twee boven- en twee benedenstreams gelegen locaties inventarisaties uitgevoerd van diatomeeën, macrofauna en vissen. Ook zijn er *in-situ* testen met vlokreeften (*Gammarus fossarum*) uitgevoerd, waarbij vlokreeften gedurende 7 dagen in kooitjes werden blootgesteld aan het oppervlaktewater.

Resultaten

De ozon-behandeling leidde tot een significante vermindering van de circa 50 geanalyseerde microverontreinigingen. Sommige stoffen werden niet langer aangetroffen en voor anderen waren de concentraties duidelijk verlaagd. Er waren echter ook stoffen (zoals jodiumhoudende röntgencontrastmiddelen) die relatief slecht werden verwijderd.

Verder leidde de ozon-behandeling tot een significante afname van de ecotoxicologische effecten (Microtox en algen-test), oestrogene effecten (YES-assay), AchE-remming en genotoxiciteit (Umu-test) in effluentmonsters. Verder werden er significante verbeteringen in een aantal niet-standaard testen vastgesteld. Zo bleek de voedselconsumptie van vlokreeften door de ozon-behandeling te verbeteren en werd de inductie van vitellogenine in larven van de regenboogforel blootgesteld aan het reguliere RWZI-effluent niet langer aangetroffen. Er werden overigens ook enkele nadelige effecten van de ozon-behandeling vastgesteld (op regenboogforellen en een oligochaete worm) maar die effecten werden door de aanvullende zandfiltratie weer tenietgedaan.

Uit de veldinventarisaties bleek dat het kwaliteitsoordeel over de diatomeeën niet verbeterde door de vergaande zuivering met ozon. Daar kunnen meerdere oorzaken aan ten grondslag liggen zoals de variatie in de tijd die dergelijke beeksystemen van nature kenmerkt, de al aanwezige belasting bovenstrooms of het feit dat de diatomeeën wellicht op andere factoren reageren dan de milieuverontreinigingen, die door de ozon-behandeling zijn verwijderd. Wel werden er verbeteringen in de macrofaunapopulatie vastgesteld. Deze verbeteringen betroffen vooral een toename van het aantal gevoelige soorten (van 18 naar 30%), terwijl het totaal aantal soorten ongeveer gelijk bleef en ook de som-parameter IBGN geen verschil liet zien. Gevoelige soorten zijn hierbij gedefinieerd door de SPEAR-index, gericht op effecten van pesticiden. Het lijkt daarmee dat soorten die gevoelig zijn voor pesticiden ook gevoelig zijn voor de in RWZI-effluent aanwezige microverontreinigingen. In de literatuur over de SPEAR-index is ook de relatie met de EKR-waarde onderzocht. De aangetroffen toename van het aantal gevoelige soorten, betekent dat de EKR-score waarschijnlijk 1 klasse toeneemt (van in dit geval ontoereikend naar matig; zie onderstaand figuur). Een aantal jaren na het stopzetten van de ozon-behandeling lag het aantal gevoelige macrofauna soorten weer op het oude niveau.



Ook de *in-situ* testen met vlokreeften gaven aan dat de ozon-behandeling de negatieve effecten op de macrofauna deed afnemen. In de reguliere situatie zonder ozon bleek de voedselconsumptie van vlokreeften op benedenstroomse locaties zo'n 50-90% lager te liggen dan op bovenstroomse locaties en ook de dichtheid was benedenstrooms ca. 75% lager. Tijdens de ozon-behandeling werd deze significante afname van voedselconsumptie niet langer vastgesteld.

Verder kwam uit de visinventarisaties een duidelijk verschil naar voren, aangezien tijdens de ozon-behandeling de dichtheid van modderkruipers in de benedenstroomse locaties veel hoger was dan in de jaren ervoor. Gelet op de enkelvoudige waarneming is onduidelijk of dit een causaal verband vormt met de vergaande zuivering met ozon dan wel duidt op jaarlijkse variatie door allerlei andere factoren.

Conclusie

Uit het zeer uitgebreide onderzoek blijkt dat de full-scale ozon-behandeling niet alleen de concentraties van veel stoffen laat afnemen maar dat dit ook leidt tot een afname in de ecotoxicologische effecten in het effluent (*in vitro* en *in vivo*) en het ontvangende watersysteem. Daarnaast bleek ook de macrofaunagemeenschap in het veld te herstellen, waarbij dit herstel op ordegrootte werd geschat op één EKR-klasse. Ook in de vispopulatie benedenstrooms traden veranderingen op, waarbij vooral de dichtheid aan modderkruipers sterk toenam tijdens de ozon-behandeling.

	Blootstelling aan effluent				
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		
			Cel	Morf.	Tox
Ozon					

	Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			Populatie
			Cel	Morf.	Tox	
Ozon						

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;

RWZI's Käppalaverket (in Käppala) en Kungsängsverket (in Uppsala), Zweden

Bron: Beijer et al (2017)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

De RWZI van Käppala is ingericht op 700.000 inwoner equivalenten en verwerkte tijdens de experimenten in 2013 huishoudelijk en industrieel afvalwater van 403.000 i.e. uit 11 gemeenschappen rondom Stockholm. De zuivering bestaat uit een actief slibinstallatie met chemische fosfaatverwijdering en een zandfiltratie. Lozing vindt plaats in de Baltische zee.

De RWZI van Uppsala is ontwikkeld voor 200.000 i.e. en behandelde ten tijde van de experimenten (2014) 149.000 i.e. van huishoudelijke afvalwater en 20.000 i.e. vanuit industriële bronnen. Ook deze RWZI bestaat uit vijf stappen: voorbehandeling, primaire sedimentatie (incl. chemische precipitatie), biologische zuivering, chemische P-verwijdering en een nabezinkingsstap. Het effluent wordt geloosd op de rivier Fyris.

In beide RWZI's zijn experimenten uitgevoerd met granulair actief kool en ozon als vergaande zuiveringstechniek. Bij de RWZI van Käppala werd het met ozon behandelde afvalwater ook over een zandfilter geleid, terwijl bij de RWZI in Uppsala zowel de granulair actief kool als ozon behandeling juist vooraf werd gegaan door een extra zandfiltratie stap.

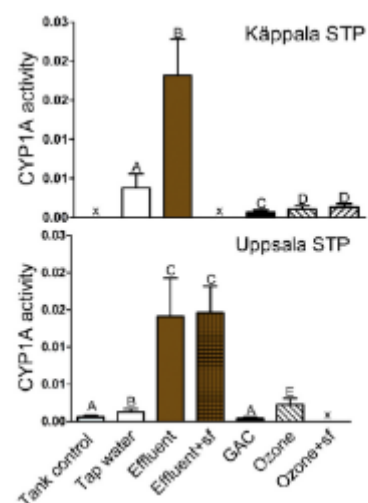
Uitgevoerd onderzoek

Naast chemische analyses van ca. 100 medicijnresten zijn er ook vierdaagse blootstellingsproeven met juveniele regenboogforellen uitgevoerd (13-18 cm). Bij de RWZI van Käppala zijn de effecten van verschillende behandelingen met elkaar vergeleken namelijk kraanwater als negatieve controle, standaard effluent als positieve controle en granulair actief-kool, ozon en ozon gevolgd door zandfiltratie als vergaande zuiveringstechnieken. De experimenten bij de RWZI van Uppsala volgde eenzelfde opzet met wederom de volgende vijf bemonsterde waterstromen: kraanwater, regulier effluent, regulier effluent aanvullend behandeld via zandfiltratie, granulair actief kool en ozon. Na een blootstelling van vier dagen is gekeken naar de EROD-activiteit (gekoppeld aan het enzym complex Cyp1a en indicatief voor de afbraak van milieuverontreinigingen) in kieuwen en naar genetische markers om verhoogde activiteit van genen vast te stellen. Deze geactiveerde genen leiden vervolgens tot de aanmaak van eiwitten betrokken bij metaal blootstelling (methallothioneinen) en oxidatieve stress (stressproteïne HSP70 en Superoxide dismutase).

Resultaten

Uit de chemische analyses blijkt dat, ten opzichte van het reguliere effluent, de concentraties medicijnresten door zowel de granulair actief kool als de ozon-doseringen met een aanvullende 87-95% worden verlaagd. Tevens blijken beide behandelingen bij beide RWZI's de significante toename van de EROD-activiteit en de inductie van Cyp1-enzymen door regulier RWZI-effluent weer tot op het controle niveau van kraanwater terug te kunnen brengen.

Activiteit van het enzym Cyp1A in de RWZI's van Käppala (boven) en Uppsala (onder). De witte balken is de activiteit in twee controle behandelingen. De licht bruine balk betreft het reguliere effluent en de donker bruine balk het effluent van de zandfiltratie in Uppsala. Vervolgens zijn de Cyp1A activiteiten gepresenteerd bij blootstelling aan het effluent van de behandeling met granulair actief kool (GAC), ozon en ozon plus zandfiltratie (Käppala).



Verder citeren de auteurs aanvullend onderzoek rondom de RWZI van Uppsala waaruit blijkt dat deze verhogingen van EROD en cyp1-enzymen ook zijn vastgesteld in regenboogforellen, die op een benedenstroomse locatie in kooien in de rivier Fyris zijn blootgesteld.

Blootstelling aan het RWZI-effluent van beide RWZI's bleek verder niet te leiden tot een inductie van andere enzymen, zoals metallothioneinen, stress proteïne HSP70 en Superoxide Dismutase. De vergaande zuiveringen hadden hier dan ook geen aanvullend effect op.

Conclusie

Uit veldonderzoek met gekooide regenboogforellen blijkt dat er benedenstrooms de RWZI van Uppsala verhoogde gehalten aan EROD en Cyp1 enzymen worden aangetroffen. Deze enzymen horen tot het cytochroom P₄₅₀ complex en zijn indicatief voor blootstelling aan een verhoogde afbraak van allerlei milieuvreemde stoffen in gewervelde dieren. Uit experimenten met regenboogforellen in doorstroomaquaria blijkt een blootstelling van 4 dagen aan regulier effluent van beide RWZI's al tot een inductie van deze enzymen te leiden. De vergaande zuivering met zowel granulair actief kool als ozon blijkt deze inductie te voorkomen.

Blootstelling aan effluent						Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	In vitro	In vivo			Conc	In vitro	In vivo			Populatie
			Cel	Morf.	Tox			Cel	Morf.	Tox	
GAK											
Ozon											

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;

GAK: Granulair Actief Kool;

RWZI Knivsta in Zweden

Bron: Pohl et al (2018)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

De zuivering is ontwikkeld voor een capaciteit van 13.000 inwoner-equivalenten, bestaande uit vooral huishoudelijk afvalwater en daarnaast enig industrieel afvalwater. De zuivering omvat vijf stappen: i) voorbehandeling, ii) primaire sedimentatie (incl. chemische sedimentatie, FeCl), iii) biologische zuivering, iv) secundaire sedimentatie en v) nogmaals FeCl-dosering flocculatie en sedimentatie om fosfaat te verwijderen. In 2015 is deze RWZI tijdelijk uitgebreid met een full-scale ozon behandeling. Eventuele residuen van ozon werden opgevangen met klei-partikels.

Uitgevoerd onderzoek

Naast het analyseren van ruim 100 verschillende medicijnresten werden 1-jaar oude zebravissen in doorstroom aquaria gedurende 21 dagen blootgesteld aan het oorspronkelijke RWZI-effluent, het effluent uit de aanvullende ozon-behandeling en aan kraanwater als controle. Bij de blootgestelde dieren werd gekeken naar de omvang van de reproductie (aantal eieren) en naar effecten op celniveau. Zo is gekeken naar de activiteit van de genen voor Cyp1a (onderdeel van het cytochroom P₄₅₀ systeem, indicatief voor afbraak van milieuvreemde stoffen), oestrogeniteit en vitellogenine in mannelijke vissen.

Resultaten

Gemiddeld over de 24 aangetroffen medicijnresten leidde de ozon-behandeling tot een aanvullende verwijdering van 77%. Verder leidde de ozon-behandeling ook tot een toename in de gen-activiteit voor Cyp1A, oestrogeniteit en vitellogenine, waarbij alleen de toename van de vitellogenine ook statistisch significant was. Dit effect van ozon is eerder vastgesteld en heeft waarschijnlijk te maken met de vorming van afbraakproducten en/of de aanwezigheid van anti-androgeen werkende stoffen.

Daarnaast leidde de ozon-behandeling tot een verdubbeling van de reproductie van de zebravissen ten opzichte van zowel de kraanwater controle als het niet met ozon-behandelde effluent. Ten opzichte van de kraanwater controle leidde blootstelling aan het niet met ozon behandelde effluent echter niet tot een afname van de reproductie. Daarmee lijkt er geen sprake van toxische effecten, die dan door ozon verkleind zouden kunnen worden wat weer tot een hogere reproductie kan leiden. Het lijkt meer waarschijnlijk dat deze verhoogde reproductie in het met ozon-behandelde effluent is gekoppeld aan een verstoring van het hormoonstelsel in bredere zin.

Conclusie

De ozon-behandeling leidde tot een aanvullende afname in de concentraties van 24 verschillende medicijnresten (met gem. 77%). Daarnaast leidde de ozon-behandeling tot een stijging van de vitellogenine-gehalten (indicatief voor oestrogene effecten) en een verdubbeling van de reproductie. De verdubbeling van de reproductie lijkt een positief effect. In het niet met ozon behandelde effluent was echter geen sprake van toxische effecten op de reproductie (die dan door ozon verkleind zouden kunnen worden). De toename van vitellogenine duidt op een verstoring in het hormonale systeem, die mogelijk ook de reproductie heeft gestimuleerd. Deze effecten kunnen veroorzaakt worden door afbraakproducten in de ozon-behandeling of bijvoorbeeld complexe interacties met de aanwezigheid van stoffen met een anti-androgene werking. Daarom zijn deze effecten als negatief beoordeeld.

Blootstelling aan effluent						Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	In vitro	In vivo			Conc	In vitro	In vivo			Populatie
			Cel	Morf.	Tox			Cel	Morf.	Tox	
Ozon											

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;

RWZI Neuss, Duitsland

Bron: Stalter et al (2010b)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

In de RWZI van Neuss wordt het afvalwater met een actief slib systeem en een daaropvolgende sedimentatiestap gezuiverd. Dit effluent van de reguliere zuivering is vervolgens gebruikt om in een pilot-opstelling de effecten van twee vergaande zuiveringstechnieken te onderzoeken. Enerzijds werd gekeken naar het effect van een vergaande zuivering met ozon, waarbij de ozon-behandeling werd gevolgd met een aanvullende zandfiltratie-stap. Anderzijds is er gekeken naar het effect van poederkool en ook bij deze behandeling werd het effluent over een aanvullend zandfilter geleid.

Uitgevoerd onderzoek

Bij het onderzoek is gekeken naar de effecten in vier waterstromen, namelijk het reguliere effluent, effluent behandeld met ozon, effluent behandeld met ozon en aanvullende zandfiltratie en effluent behandeld met poederkool en aanvullende zandfiltratie. Vervolgens is in doorstroomsystemen gekeken naar de ecotoxicologische effecten op kroos, dansmuggen (chironomiden) en wormen (oligochaeten), naar oestrogene effecten in de YES-assay en via een reproductie test met een slak en werd via een Comet-assay op het hemolymfe van de driehoeksmossel gekeken naar de effecten van mogelijke aanwezige reactieve stoffen (DNA-schade).

Resultaten

Er werden geen significante verschillen in de groei van kroos en de groei en reproductie van dansmuggen vastgesteld. De ozon-behandeling bleek wel een negatief effect op de voortplanting van wormen te hebben, waarbij dit effect na de aanvullende zandfiltratie niet langer werd vastgesteld. Daarnaast bleek de ozon-behandeling ook het vóórkomen van DNA-schade bij de driehoeksmossel te vergroten, en wederom werd dit effect na de aanvullende zandfiltratiestap niet vastgesteld. De behandeling met poederkool leidde in vergelijking met het reguliere effluent tot een significante afname van de DNA-schade. De YES-assay toonde aan dat zowel ozon, ozon met zandfiltratie als poederkool de oestrogene activiteit van het reguliere effluent significant verlaagde en wel met 86, 91 en 75% respectievelijk. Deze verlaging van de oestrogene activiteit werd ook waargenomen in de reproductietest met de slak, aangezien de reproductie van de slak in alle drie behandelingen significant lager was dan in het reguliere effluent (17-30%).

Conclusie

In het uitgevoerde onderzoek is gekeken naar de effecten van ozon (al dan niet met aanvullende zandfiltratie) en poederkool door een aantal standaard testen uit te voeren op de verschillende effluentmonsters. Er werd enerzijds geconcludeerd dat ozon kan leiden tot een toename van de ecotoxicologische effecten (voortplanting van wormen en DNA-schade in driehoeksmossel) en anderzijds dat de aanvullende zandfiltratie deze nadelige effecten weer verwijderd. De behandeling met poederkool leidde tot een significante daling van de DNA-schade. Daarnaast toonde de YES-assay aan dat zowel ozon, ozon met zandfiltratie als poederkool de oestrogene activiteit van het reguliere effluent significant verlaagde en werd dit effect bevestigd in een reproductietest met een slak.

Blootstelling aan effluent					
	Conc	In vitro	In vivo		
			Cel	Morf.	Tox
PAK					
Ozon					

Blootstelling in ontvangend systeem					
Conc	In vitro	In vivo			Populatie
		Cel	Morf.	Tox	

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;
PAK: Poederkool;

RWZI in Engeland (naam van RWZI niet gespecificeerd)

Bron: Baynes et al (2012)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

De onderzochte RWZI had een omvang van 60.500 i.e. en behandelde vrijwel uitsluitend (>90%) huishoudelijk afvalwater. De zuivering omvatte een primaire sedimentatie stap, een actief slib proces gericht op nitrificatie (incl. FeCl dosering voor fosfaatverwijdering), nabezinking en ten slotte zandfiltratie. De hydraulische verblijftijd (11 uur) was relatief kort. De vergaande zuiveringstechnieken zijn in proefinstallaties toegepast. Het effluent van de zandfiltratie werd hierbij aanvullend behandeld met chloordioxide of met granulair actief kool (GAK).

Uitgevoerd onderzoek

Het onderzoek richtte zich op de verwijdering van hormoonverstorende stoffen en de effecten hiervan op de inductie van vitellogenine en intersex in blankvoorn (juvenile dieren en volwassenen mannetjes), die beide gedurende 6 maanden werden blootgesteld. Er zijn zes waterstromen onderzocht. Naast drinkwater en bovenstrooms rivierwater als controles zijn de effecten onderzocht van het effluent van het actief slib proces na de nabezinking, het zandfilter, de chloordioxide behandeling en de behandeling met granulair actief kool. Bij de volwassen dieren is gekeken naar de inductie van vitellogenine (indicatief voor hormoonverstorende effecten) en de ontwikkeling van gonaden en intersex.

Resultaten

Chemisch werden de hoogste concentraties (estron, 17 β -estradiol en 17 α -ethynylestradiol) aangetroffen in het effluent van het actief slib proces en de zandfiltratie bleek deze concentraties ongeveer te halveren. In beide vergaande zuiveringsstappen werden de concentraties verder verlaagd, waarbij het effect van de ClO₂ behandeling iets sterker was dan dat van het GAK (extra verlaging t.o.v. zandfilter met ca. 70 resp. 55%). De *in vitro* YES-bioassay bevestigde dit verloop in concentraties en bij zowel de granulair actief-kool als de chloordioxide behandelingen werden geen oestrogene effecten meer vastgesteld. Ook in de blootgestelde blankvoorns werden oestrogene effecten vastgesteld, aangezien de vitellogenine gehalten in zowel het effluent van het actief slib proces als het zandfilter significant waren verhoogd (met resp. een factor 59 en 17 tov de controle). In overeenstemming met de chemische concentraties en de *in vitro* YES-assay werden er geen verhoogde vitellogenine gehalten vastgesteld in vissen, die aan het effluent van beide vergaande zuiveringstechnieken werden blootgesteld. Ten slotte bleek het effluent van het actief slib proces ook intersex bij mannelijke blankvoorns te induceren (ovotestis). Dit effect werd niet meer vastgesteld na de zandfiltratie en (logischerwijs) ook niet na de behandeling met GAK. Opvallend genoeg werd wel een lichte stijging van intersex vastgesteld na de behandeling met ClO₂. Dit kan met de vorming van transformatieproducten of de aanwezigheid van anti-androgene stoffen te maken hebben. In de test met juvenile vissen werd intersex alleen vastgesteld bij dieren die aan het effluent van het actief slib proces werden blootgesteld. Dit effect was zo sterk dat na een aanvullende blootstelling van zes maanden alle mannelijke vissen intersex vertoonden.

Conclusie

Beide vergaande zuiveringstechnieken GAK en ClO₂ leiden tot een verdere verlaging van de concentraties hormoonverstorende stoffen. Deze verlaging werd bevestigd in *in vitro* YES-bioassays en ook in de blootgestelde blankvoorns (afwezigheid van vitellogenine inductie). Dat de verhoogde vitellogenine gehalten ook tot intersex kunnen leiden werd bevestigd in de blankvoorns blootgesteld aan het effluent uit het actief slib proces. Het zandfilter bleek de inductie van vitellogenine al zover te verlagen dat hier geen intersex meer bij werd vastgesteld. Het effect van de vergaande zuiveringstechnieken op intersex was daardoor moeilijk vast te stellen. Wel werd een lichte toename bij ClO₂ vastgesteld, wellicht als gevolg van transformatieproducten.

Blootstelling aan effluent					Blootstelling in ontvangend systeem						
	Conc	In vitro	In vivo			Conc	In vitro	In vivo			Populatie
			Cel	Morf.	Tox			Cel	Morf.	Tox	
GAK											
ClO ₂											

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;

RWZI Boulder, Colorado, USA

Bron: Barber et al (2012)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

Deze RWZI betrof een relatief simpele installatie met een biologisch druppelfilter, die in 2007 werd omgezet naar een actief slib systeem. Deze upgrade had als primair doel om de stikstof verwijdering te verbeteren, maar leidde ook tot een verbeterde verwijdering van hormoonverstorende stoffen. De hydraulische verblijftijd nam van 11 naar 25 uur toe. De RWZI behandelde afvalwater van ongeveer 100.000 inwoners van de stad Boulder. Ongeveer 70% hiervan is huishoudelijk afvalwater. De rest is een mengsel van afvalwater uit commerciële en industriële activiteiten.

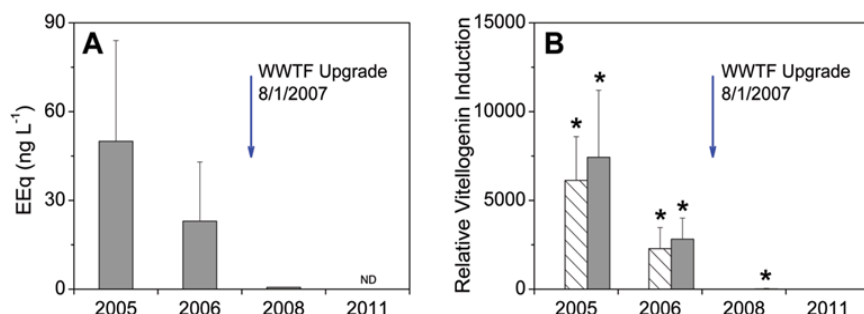
Actief slib wordt tegenwoordig niet als vergaande zuivering maar als standaard behandeling gezien. Toch is het uitgevoerde onderzoek relevant omdat de studie de hele effectketen van concentraties naar ecologische effecten beschouwd. Er zijn weinig redenen om aan te nemen dat een nieuwe verhoging van de zuiveringsefficiëntie niet tot een vergelijkbare cascade van effecten kan leiden (waarbij de sterkte van de verschillende effecten natuurlijk wel kan verschillen).

Uitgevoerd onderzoek

Naast de concentraties van allerlei stoffen, waaronder oestrogene stoffen als oestron en 17 β -oestradiol, heeft het onderzoek ook gekeken naar de effecten op 1-jaar oude mannelijke vissen (Fathead minnows; *Pimephales promelas*) door deze in doorstroom-aquaria gedurende 28 dagen bloot te stellen. Zowel voor als na de aanpassing is gekeken naar de effecten van het RWZI-effluent, het rivierwater bovenstrooms en een 50:50 mengsel van beide (benedenstrooms bestaat de rivier voor 30-80% uit effluent). Aan het einde van de blootstelling is gekeken naar de macro- en microscopische ontwikkeling van de gonaden en de vorming van vitellogenine.

Resultaten

Door het installeren van het actief slib systeem zijn de concentraties van oestrogene stoffen (oestron en 17 β -oestradiol) significant gedaald (niet langer meetbaar in het effluent; >99% verwijdering). Dit geldt overigens niet voor alle stoffen. In de jaren voor de aanpassing (<2007) veroorzaakte het RWZI-effluent een snelle en sterke endocriene verstoring, zoals een sterke inductie van vitellogenine, verschillende macro- en microscopische veranderingen in de gonaden en een afname van de sperma-hoeveelheden.



Figuur A betreft de concentratie oestradiol equivalenten in het effluent met de datum waarop het actief slib systeem operationeel is geworden. Figuur B betreft de vitellogenine inductie in de drie behandelingen, waarbij de gehalten zijn uitgedrukt als relatieve verhoging ten opzichte van de referentie. De grijze balken geven de gegevens voor het effluent en de gearceerde balken die van het 1:1 mengsel van effluent en de referentie (dit mengsel is indicatief voor de benedenstroomse situatie).

De effecten werden in zowel 2005 als 2006 vastgesteld, maar de mate waarin was in 2006 lager, mede doordat ook de concentraties aan hormoonverstorende stoffen in 2006 lager was. De auteurs verwijzen naar aanvullend onderzoek waaruit blijkt dat vissen, die op de benedenstroomse locatie zijn gevangen (*White suckers, Catostomus commersoni*), ook allerlei tekenen van hormoonverstoring vertonen, zoals intersex en toegenomen vitellogenine niveaus.

Na de installatie van het actief slib systeem namen niet alleen de concentraties van verschillende stoffen af, maar verdween ook de sterke inductie van vitellogenine en zijn ook geen macro- of microscopische effecten in de gonaden vastgesteld. Helaas is er in dit onderzoek niet gekeken naar het herstel van de vispopulatie in het veld.

Conclusie

De installatie van een actief slib systeem heeft geleid tot een verlaging van de concentraties van allerlei (maar niet alle) hormoonverstorende stoffen, waaronder een aantal oestrogene stoffen. In de situatie voor de aanpassing veroorzaakte het effluent een snelle en sterke endocriene verstoring, zoals een sterke inductie van vitellogenine en een afname van de sperma-hoeveelheden. Vergelijkbare effecten werden ook vastgesteld in vissen, die op een benedenstroomse locatie zijn gevangen.

Na de installatie van het actief slib systeem werden deze endocriene effecten niet langer vastgesteld in de 28-daagse experimenten. Verificatie hiervan in de veldpopulatie heeft niet plaats gevonden.

Blootstelling aan effluent						Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			Populatie
			Cel	Morf.	Tox			Cel	Morf.	Tox	
ASB											

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;

ASB: Actief Slib Behandeling;

RWZI Kitchener, Ontario, Canada

Bron: Hicks et al (2017)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

In de periode 2012-2013 werd deze RWZI grootschalig ge-amoveerd. Het oude actief slib systeem was gericht op BOD verwijdering en de behandeling van 120.000 m³ per dag, terwijl de nieuwe versie op N-verwijdering (nitrificatie) was ontworpen. Dit werd onder meer bewerkstelligd door de aeratie te verbeteren en de slibverblijftijd te verhogen, zoals dat bij de huidige Nederlandse RWZI's standaard is.

Uitgevoerd onderzoek

Het onderzoek heeft zich vooral gericht op de vraag of deze aanpassing van de RWZI ook leidt tot een daling van de intersex, zoals die veelvuldig in natuurlijke vispopulaties benedenstrooms deze RWZI zijn vastgesteld. Hiertoe werden negen locaties (3 referenties; 3 benedenstrooms een kleine RWZI maar bovenstrooms RWZI Kitchener¹² en 3 locaties benedenstrooms RWZI Kitchener) meerdere jaren onderzocht. Op alle locaties werden Rainbow darter (Noord-Amerikaanse regenbooggrondel, *Etheostoma caeruleum*) verzameld. Het onderzoek richtte zich op de histologie van de gonaden (voorkomen en ernst van de intersex in mannelijke vissen). Ter ondersteuning werden chemische analyses aan effluent uitgevoerd en werd de YES-assay toegepast als maat voor het totale effect van alle oestrogene stoffen. Het aandeel effluent benedenstrooms is niet gespecificeerd, maar kan wellicht in de achterliggende literatuur worden achterhaald.

Resultaten

De RWZI aanpassingen leidde tot een significant hogere verwijdering van de geneesmiddelen ibuprofen en naproxen, maar een stof als carbamazepine bleef slecht verwijderd te worden. Ook de totale activiteit aan oestrogene stoffen daalde significant door de RWZI-aanpassing (YES-assay: van 18 ng/l E2eq naar <2 ng/l

¹² Deze kleine RWZI is tijdens de studie niet aangepast.

E2eq). De benedenstroomse vispopulatie reageerde snel op deze verbeterde effluent kwaliteit. Zo nam de aanwezigheid van intersex bij vissen op de tweede benedenstroomse locaties binnen een jaar af van 100% tot 29%. Op de eerste locatie benedenstrooms trad ook een significante verbetering op maar dat gebeurde meer geleidelijk over enkele jaren. Na drie jaar was het vóórkomen van intersex bij vissen op beide locaties tot respectievelijk 9 en 14% gedaald. Dit zijn percentages die ook op de drie referentie locaties werden aangetroffen.

Conclusie

De aanpassing van de RWZI (van een BOD-gerichte actief slib behandeling naar een meer op nitrificatie gerichte actief slib behandeling) heeft geleid tot lagere concentraties in het effluent, een lagere respons aan oestrogene stoffen in de YES-assay en een verbetering in de vispopulaties benedenstrooms (zowel de frequentie van voorkomen als de sterkte van intersex nam af). Voor de aanpassing kwam intersex op de benedenstroomse locaties bij 70-100% van de vissen voor. Enkele jaren na de aanpassing is dit tot <10% gedaald en zijn er geen verschillen meer met de bovenstroomse locaties.

Blootstelling aan effluent						Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	In vitro	In vivo			Conc	In vitro	In vivo			Populatie
			Cel	Morf.	Tox			Cel	Morf.	Tox	
ASB											

Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Morf.: morfologische effecten; Tox: toxische effecten;
ASB: Actief Slib Behandeling;

RWZI van de Wallernhausen, Duitsland

Bron: Harth et al (2019)

Reguliere zuivering en toegepaste vergaande technieken

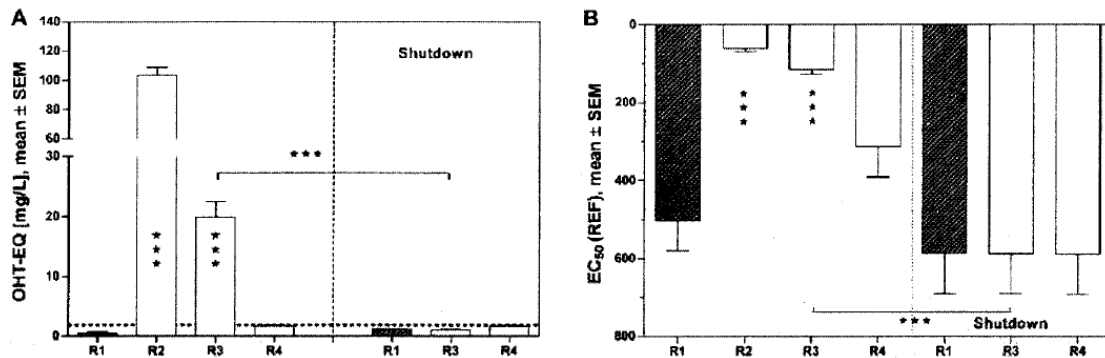
In dit onderzoek is niet gekeken naar het effect van een vergaande zuiveringstechniek maar naar het beëindigen van de RWZI-lozing als geheel. De RWZI van Wallernhausen loosde op de Rambach, een relatief kleine beek waardoor het aandeel RWZI-effluent benedenstrooms ook vrij hoog was (ca. 50% bij gemiddelde afvoer). De RWZI dateerde van 1987 en was met 1.300 i.e. vrij klein. De zuivering bestond uit een mechanisch en een biologisch deel en kende een hydraulische verblijftijd van maar liefst 8,6 dagen. Gezien de kleine omvang bleek het effectiever om de RWZI op te heffen en het ongezuiverde afvalwater om te leiden naar een grotere RWZI in de nabijheid.

Uitgevoerd onderzoek

De effecten van de RWZI op het ontvangende oppervlaktewater zijn bestudeerd door zowel het RWZI-effluent als boven- en benedenstroomse locaties met elkaar te vergelijken in zowel de situatie met een werkende RWZI als na het beëindigen van de RWZI-lozing. Er zijn zes monsternamen campagnes vóór en vier na het beëindigen van de lozing uitgevoerd. Naast het verminderen van de emissies van milieuverontreinigingen en nutriënten kan het beëindigen van de lozing ook op andere manieren tot ecologische effecten leiden zoals door een vermindering van de stroomsnelheid. Aanvullend op het ecologisch onderzoek in het oppervlaktewater is daarom ook veel aandacht besteed aan het beoordelen van de ecotoxicologische effecten door laboratoriumonderzoek te combineren met actieve en passieve monitoring in het veld gericht op de vlokreeft *Gammarus fossarum* en de slak *Potamopyrgus antipodarum*. Daarnaast is ook gekeken naar de Microtox-test voor ecotoxicologische effecten en naar verschillende Yeast-assays om (anti) estrogene en androgene effecten te beoordelen. In de meeste gevallen is hierbij gewerkt met SPE-extracten. Alleen de antagonist testen zijn met ruw water uitgevoerd.

Resultaten

Uit het onderzoek met de *in vitro* Yeast-testen blijkt dat er in het RWZI-effluent sprake is van een verhoogde estrogene, anti-estrogene en anti-androgene activiteit. Ook op de eerste benedenstroomse locatie (100m) werd een verhoogde activiteit vastgesteld. Na het stopzetten van de RWZI-lozing verdwijnen deze effecten op de benedenstroomse locatie en zijn er geen verschillen meer met de bovenstroomse referentielocatie. Ditzelfde beeld werd gevonden in de Microtox-test. Ook in dit geval zijn er in zowel het RWZI-effluent als de eerste benedenstroomse locaties effecten vastgesteld, die na het stopzetten van de RWZI-lozing verdwijnen.



A: Anti-oestrogene activiteit voor (links van de streep) en na (rechts van de streep) het stopzetten van de RWZI-lozing. B: Toxiciteit in de Microtox-test voor en na het stopzetten van de RWZI-lozing. EC₅₀-waarde is uitgedrukt als concentratiefactor (lagere waarde is een hogere toxiciteit). R1=100m bovenstrooms gelegen referentie; R2=RWZI-effluent; R3=100m benedenstrooms gelegen locatie en R4=2,4 km benedenstrooms gelegen. Significante verschillen zijn met * aangegeven.

De *in situ* experimenten met de vlokreeft *G. fossarum* lieten een significant verhoogde sterfte op de benedenstroomse locatie zien (43-58% t.o.v. 22-31% op de referentielocatie) en ook in het laboratorium werd deze verhoogde sterfte aangetroffen. Na het beëindigen van de RWZI-lozing werd deze verhoogde sterfte niet meer aangetroffen. De sterfte in de *in situ*- en laboratorium- experimenten met de slak *P. antipodarum* liet dezelfde trends zien: verhoogde sterfte op de eerste benedenstroomse locatie die na het beëindigen van de RWZI-lozing verdwijnt.

Ten slotte zijn er ook in de veldpopulaties verschillen vastgesteld. Bij een werkende RWZI werd de bovenstroomse vlokreeftpopulatie gedomineerd door *Gammarus fossarum*, terwijl benedenstrooms met name de minder gevoelige *Gammarus roeseli* werd aangetroffen. Ook de totale dichtheid van de vlokreeften was bovenstrooms veel hoger dan benedenstrooms. Na het beëindigen van de RWZI-lozing nam zowel de dichtheid van *G. fossarum* als de totale dichtheid van de gammariden benedenstrooms toe. Dergelijke veranderingen in de populatiedynamiek van soorten hoeven niet door (alleen) de veranderde concentraties aan milieuverontreinigingen te zijn veroorzaakt. Ook veranderingen in bijvoorbeeld de nutriëntenbelasting, zuurstofgehalten en/of stroomsnelheden kunnen daar aan bijdragen. In het huidige onderzoek is echter ook gekeken naar meer specifieke effecten, zoals het aandeel eidragende vrouwtjes en de broedselgrootte. Bij een werkende RWZI was zowel het aandeel eidragende vrouwtjes als de broedselgrootte benedenstrooms lager dan bovenstrooms. Dit bleek uit zowel de 28-daagse *in situ* experimenten, laboratorium experimenten als uit de veldinventarisatie en wederom bleken de effecten op beide parameters te verdwijnen na het beëindigen van de RWZI-lozing. Ook in de *in situ* en laboratorium experimenten met de slak *P. antipodarum* werden bij een werkende RWZI effecten op de broedselgrootte vastgesteld. Deze effecten werden ondersteund door de resultaten van chemische analyses, die ook dalende concentraties (81,5%) lieten zien na het stopzetten van de RWZI-lozing.

Conclusie

Uit het onderzoek blijkt dat de RWZI tot merkbare ecotoxicologische effecten op de benedenstroomse locatie leidt, waarbij de effecten verdwijnen zodra de RWZI-lozing werd beëindigd. De effecten zijn vastgesteld in *in vitro* testen gericht op (anti)estrogene en androgene activiteit en de Microtox-test, maar ook in laboratorium en *in situ* experimenten met de vlokreeft *Gammarus fossarum* en de slak *Potamopyrgus antipodarum*. In dit geval waren de effecten zichtbaar in de overleving alsmede in een gewijzigd aandeel vrouwelijke dieren en een verminderde broedselgrootte. Ook in het veld waren effecten op de vlokreeften-populatie zichtbaar, aangezien het aandeel en de dichtheid van *G. fossarum* benedenstrooms veel lager was dan bovenstrooms (benedenstrooms domineerde de minder gevoelige *G. roeseli*) en ook dit verschil verdween door het stopzetten van de RWZI-lozing.

Blootstelling aan effluent				
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
			Cel	Morf.
Stop				

Blootstelling in ontvangend systeem					
	Conc	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		Populatie
			Cel	Morf.	

Stop: effect van beëindigen van RWZI-lozing bestudeerd; geen vergaande zuiveringstechniek

Tox: toxische effecten; Cel: effecten op cellulair niveau (veelal enzymatisch); Organismen: morfologische effecten op orgaan niveau of gehele organisme;

5 Referenties



- Abegglen C, B Escher, J Hollender, S Koepke, C Ort, A Peter, H Siegrist, U von Gunten, S Zimmermann, M Koch, P Niederhauser, M Schärer, C Braun, R Gälli, M Junghans, S Brocker, R Moser & D Rensch (2009). Ozonung von gereinigtem Abwasser. Schlussbericht Pilotversuch Regensdorf. EAWAG.
- ADeco (2018). Effectonderzoek gericht op microverontreinigingen in het oppervlaktewater in het beheergebied van Rijn-Oost.
- Ashauer, R (2016). Post-ozonation in a municipal wastewater treatment plant improves water quality in the receiving stream. *Environ Sci Eur* 28:1.
- Barber LB, AM Vajda, C Douville, DO Norris & JH Writer (2012). Fish endocrine disruption responses to a major wastewater treatment facility upgrade. *Environ. Sci. Technol*, 46: 2121-2131.
- Baynes A, C Green, E Nicol, N Beresford, R Kanda, A Henshaw, J Churchley & S Jobling (2012). Additional treatment of wastewater reduces endocrine disruption in wild fish - A comparative study of tertiary and advanced treatments. *Environ. Sci. Technol*, 46: 5565–5573.
- Beijer K, B Björlenius, S Shaik, RH Lindberg, B Brunström & I Brandt (2017). Removal of pharmaceuticals and unspecified contaminants in sewage treatment effluents by activated carbon filtration and ozonation: Evaluation using biomarker responses and chemical analysis. *Chemosphere* 176: 342-351.
- Bundschuh M, R Pierstorf, WH Schreiber & R Schulz (2011). Positive effects of wastewater ozonation displayed by in situ bioassays in the receiving stream. *Environ Sci Technol* 45: 3774-3780.
- Ecofide (2019). Toepassing van de veldbioassay met vlokreeften in het beheergebied van waterschap Hunze en Aa's. Rapport in voorbereiding.
- Gerritsen AAM et al. (2003). Oestrogene effecten in vissen in regionale wateren. RIZA-rapport 2003.019, Lelystad.
- Giebner S, S Ostermann, S Straskraba, M Oetken, J Oehlmann & M Wagner (2018). Effectivity of advanced wastewater treatment: reduction of *in vitro* endocrine activity and mutagenicity but not of *in vivo* reproductive toxicity. *Environ Sci Pollut Res* 25(5): 3965-3976.
- Harth FUR, C Arras, DJ Brettschneider, A Misovic, J Oehlmann, U Schulte-Oehlmann & M Oetken (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.
- Henneberg A & R Triebkorn (2015). Efficiency of advanced wastewater treatment technologies for the reduction of hormonal activity in effluents and connected surface water bodies by means of vitellogenin analyses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Environ Sci Eur* 27:22.
- Hicks KA, MLM Fuzzen, EK McCann, MJ Arlos, LM Bragg, S Kleywegt, GR Tetreault, ME McMaster & MR Servos (2017). Reduction of intersex in a wild fish population in response to major municipal wastewater treatment plant upgrades. *Environ Sci Technol* 51: 1811–1819.
- Johnson AC, MD Jürgens, FK Edwards, PM Scarlett, HM Vincent, P von der Ohe (2019). What Works? The influence of changing wastewater treatment type, including tertiary granular activated charcoal on downstream macroinvertebrate biodiversity over time. *Environ Toxicol Chem* *in press*.
- Maier D, M Benisek, L Blaha, F Dondero, JP Giesy, H-R Köhler, D Richter, M Scheurer & R Triebkorn (2016). Reduction of dioxin-like toxicity in effluents by additional wastewater treatment and related effects in fish. *Ecotox Environ Saf* 132: 47-58.
- Munz NA, FJ Burdon, D de Zwart, M Junghans, L Melo, M Reyes, U Schönenberger, HP Singer, B Spycher, J Hollender & C Stamm (2017). Pesticides drive risk of micropollutants in wastewater-impacted streams during low flow conditions. *Wat. Res.* 110: 366-377.

- Peschke K, J Burmester, M Hermann, H-R Köhler, K Reitter, M Scheurer, K Wurm & R. Triebkorn (2016). Reaktionen von Flohkrebse und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe. *Gwf-Wasser|Abwasser* 157 (4), 370–379.
- Peschke K, Y Capowiez, H-R Köhler, K Wurm & R. Triebkorn (2019). Impact of a wastewater treatment plant upgrade on amphipods and other macroinvertebrates: individual and community responses. *Front. Environ. Sci.* 7:64.
- Pohl J, B Björleinius, T Brodin, G Carlsson, J Fick, DGJ Larsson, L Norrgren & S Örn (2018). Effects of ozonated sewage effluent on reproduction and behavioral endpoints in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 200: 93-101.
- Pottinger TG, A Cook, MD Jürgens, G Rhodes, I Katsiadaki, JL Balaam, AJ Smith & P Matthiessen (2011). Effects of sewage effluent remediation on body size, somatic RNA: DNA ratio, and markers of chemical exposure in three-spined sticklebacks. *Environment International* 37: 158–169.
- Rutgrink A (2019). SIMONI onderzoek bij zuiveringen in 2018. Biologische effectmetingen voor de invloed van microverontreinigingen in effluentwater op het oppervlaktewater. Ingenieursbureau Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier.
- Stalter D, A Magdeburg, M Weil, T Knacker & J Oehlmann (2010a). Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Wat. Res.* 44: 439-448.
- Stalter D, A Magdeburg & J Oehlmann (2010b). Comparative toxicity assessment of ozone and activated carbon treated sewage effluents using an in vivo test battery. *Wat. Res.* 44: 2610-2620.
- STOWA (2018a). PACAS – Poederkooldosering in actiefslib voor verwijdering van microverontreinigingen. Stowa-rapport 2018-02.
- STOWA (2018b). Zoetwaterfabriek AWZI De Groote Lucht: Pilotonderzoek ozonisatie en zandfiltratie. Stowa-rapport 2018-46.
- Thellmann P, H-R Köhler, A Röbber, M Scheurer, S Schwarz, H-J Vogel & R Triebkorn (2015). Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies. *Environ Sci Pollut Res* 22: 16405-16416.
- Thellman P, K Greiner-Perth, S Jacob, M Knoll, M Schäfer, M Stängle, M Ziegler, M Scheurer, H-R Köhler & R Triebkorn (2017). Does waste water treatment plant upgrading with powdered activated carbon result in reduced water and sediment toxicity of the receiving stream? *Int Water Wastewater Treat* 3(2): doi <http://dx.doi.org/10.16966/2381-5299.141>
- Triebkorn R, P Thellmann, H-J Vogel & K Wurm (2014). Die Kläranlage Albstadt- Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992-Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie. *Korrespondenz Wasserwirtschaft* 7 (10): 587-593.
- Triebkorn R (Ed) (2017). Weitergehende Abwasserreinigung. Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Gemeinsamer Schlussbericht der Projekte SchussenAktiv, SchussenAktivplus und SchussenAktivplus+. Universität Tübingen.
- Van der Oost R (2016). Toxicologisch onderzoek invloed rwzi's op waterkwaliteit 2014-2015. Toepassing SIMONI-strategie. *Waternet Onderzoek & Advies*.
- Van der Oost R & Ecofide (2019). Doorontwikkeling SIMONI risicoanalyse van micro-verontreinigingen in RWZI-effluent. Vergelijking tussen extraheren met XAD, LVSPE en passive samplers. Rapport in voorbereiding.
- Vethaak AD et al (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands. Occurrence, Potency and Biological Effects. RIZA/RIKZ-rapport 2002.001, Lelystad/Den Haag.
- Wilhelm S, A Henneberg, H-R Köhler, M Rault, D Richter, M Scheurer, S Suchail & R Triebkorn (2017). Does wastewater treatment plant upgrading with activated carbon result in an improvement of fish health? *Aquat Toxicol* 192: 184-197.
- Wilhelm S, S Jacob, M Ziegler, H-R Köhler & R Triebkorn (2018). Influence of different wastewater treatment technologies on genotoxicity and dioxin-like toxicity in effluent-exposed fish. *Environ Sci Eur* 30:25.