

## De hergebruiksmogelijkheden van water beoordelen met bioassays

*Astrid Reus (KWR), Roberta Hofman-Caris (KWR, Hogeschool Utrecht, Wageningen University & Research), Ron van der Oost (Waternet), Evelyn De Meyer (De Watergroep), Maaïke Hoekstra (Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier)*

**De watersector kent grote uitdagingen door waterschaarste. Het benutten van alternatieve waterbronnen en waterhergebruik zijn mogelijke oplossingen voor waterschaarste. Dit kan echter gezondheidsrisico's met zich meebrengen omdat vervuilende stoffen en ziekteverwekkers kunnen rondgaan en/of ophopen in (gedeeltelijk) gesloten waterketens. Bioassays kunnen inzicht geven in eventuele gevaren van vervuilende stoffen voor gezondheid en milieu. Ze kunnen worden toegepast voor de beoordeling van waterbronnen en om de effectiviteit van waterzuiveringsprocessen te onderzoeken. Hierdoor kunnen ze een rol spelen bij het nemen van beslissingen op dit gebied.**

Tijdens droge periodes, die steeds vaker voorkomen, wordt zoetwater uit grond- en oppervlaktewaterbronnen schaars. Naar verwachting zal de vraag naar drinkwater in Nederland in 2030 veel groter zijn dan in 2020 [1]. Het gebruik van alternatieve bronnen (regenwater en/of brak water), hergebruik (stedelijk en industrieel afvalwater) en andere manieren van waterbeheersing (minder snelle afvoer van regenwater, aanleg van grotere voorraden in de duinen of onder de Veluwe) zijn oplossingsrichtingen om in de toekomst beschikbaarheid van voldoende water van acceptabele kwaliteit voor mens, dier, natuur en landbouw te kunnen garanderen [1], [2].

Het benutten van alternatieve waterbronnen en waterhergebruik brengt mogelijk gezondheidsrisico's met zich mee. Vervuilende stoffen en ziekteverwekkers kunnen in watersystemen rondgaan en/of zich ophopen in (gedeeltelijk) gesloten waterketens. Inzicht in mogelijke gevaren voor gezondheid en milieu van vervuilende stoffen en ziekteverwekkers is nodig om eventuele gezondheidsrisico's te beheersen [3].

KWR heeft een raamwerk ontwikkeld als een eerste stap naar een gecombineerde inschatting van mogelijke gezondheidsrisico's van vervuilende stoffen en ziekteverwekkers in alternatieve bronnen en water(her)gebruikstoepassingen [4]. Voor een meer volledige risicobeoordeling kan voor vervuilende stoffen het advies zijn om bioassays toe te passen. Dit is vooral belangrijk als de samenstelling van het te beoordelen water niet (volledig) duidelijk is, als het water stoffen bevat waarvoor geen gegevens over schadelijkheid voor de gezondheid voorhanden zijn, of als onbekend is wat het effect van mengsels van stoffen is.

### Bioassays

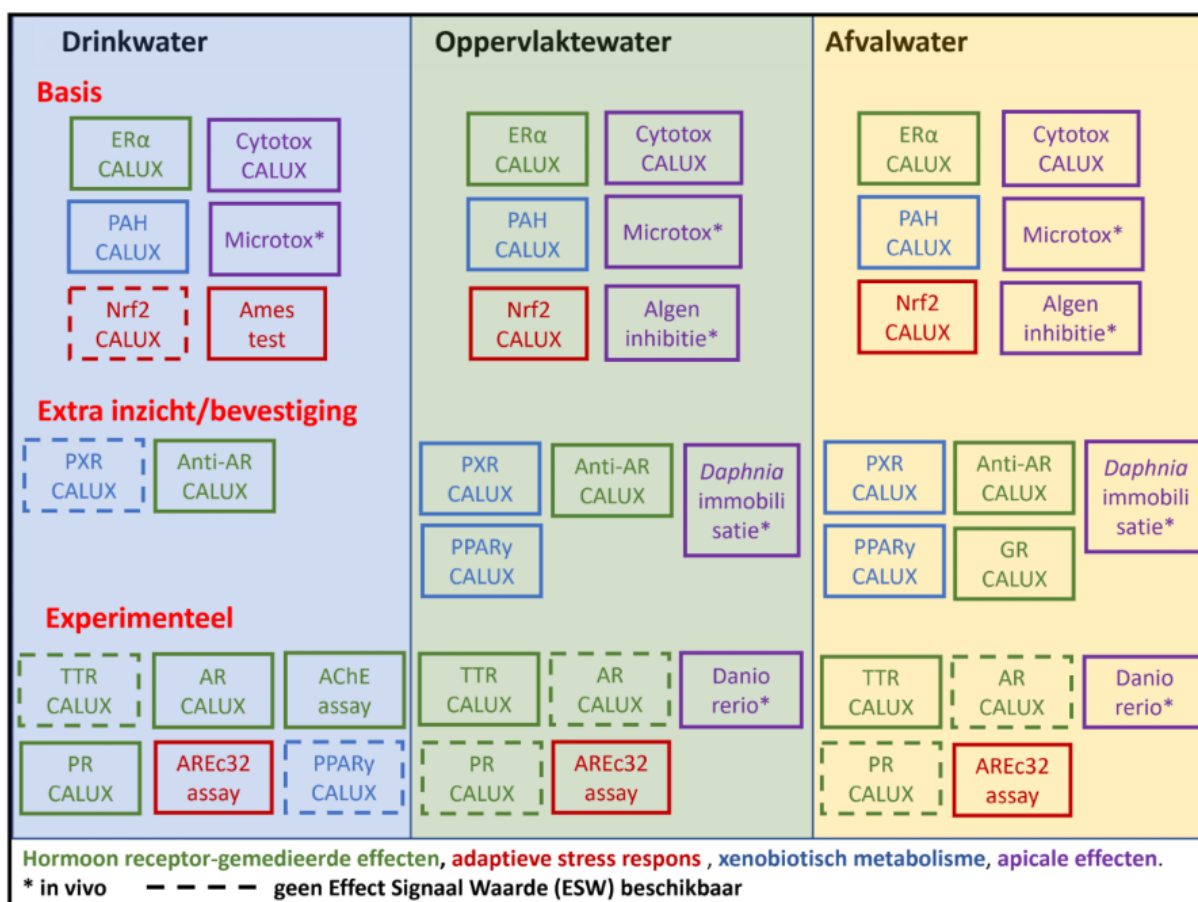
Het meten van de aanwezigheid en concentraties van stoffen kan inzicht geven in mogelijke gezondheidseffecten van vervuilende stoffen in water. Aangezien het om tienduizenden stoffen kan gaan en niet voor elke stof gegevens over de schadelijkheid van de gezondheid beschikbaar zijn, is het lastig om op deze manier mogelijke risico's voor de menselijke gezondheid en het milieu in te schatten. Bovendien is weinig bekend over de effecten van mengsels van stoffen. Bioassays, methodes die gebruik maken van cellen en bacteriën, zijn een effectief instrument om gezondheidseffecten van stoffen in water te onderzoeken. Bioassays meten namelijk het gezamenlijke effect van in het mengsel aanwezige stoffen, zonder dat er informatie beschikbaar hoeft te zijn welke stoffen aanwezig zijn en

bij welke concentratie. Bioassays worden al toegepast in de watersector, als aanvulling op de metingen van stoffen, voor de beoordeling van de kwaliteit van drinkwaterbronnen en de effectiviteit van waterzuiveringsprocessen.

### **Hulp bij keuze van geschikte bioassays**

Het kan uitdagend zijn om de juiste bioassays te kiezen, omdat stoffen verschillende voor mens en milieu nadelige effecten kunnen hebben. Daarnaast zijn er voor veel gezondheidsgerelateerde effecten verschillende bioassays beschikbaar. Het is handig om een basisset van bioassays te hebben als houvast voor de keuze van de meest geschikte bioassays. Wanneer voor verschillende locaties dezelfde bioassays worden gebruikt, geeft een basisset ook de mogelijkheid om waterkwaliteit van verschillende locaties of watertypen met elkaar te vergelijken.

In het project Toxiciteit van de Kennisimpuls Waterkwaliteit is een basisset van bioassays geselecteerd [5]. Voorbeelden van verschillende biologische effecten die in de Sleutelfactor Toxiciteit gemeten worden zijn effecten op de hormoonhuishouding (hormoonreceptor-gemedieerde effecten in afbeelding 1), het vermogen van cellen om zich aan stressfactoren aan te passen (adaptieve stressrespons), de omzetting van lichaamsvreemde stoffen (xenobiotisch metabolisme) en de vitaliteit van cellen (apicale effecten). Het is belangrijk dat een basisset uit zo min mogelijk bioassays bestaat (lagere kosten) en zoveel mogelijk verschillende soorten stoffen met verschillende effecten kan detecteren [5]. Er zijn specifieke basissets ontwikkeld voor verschillende watertypen (drinkwater, oppervlaktewater en afvalwater) (afbeelding 1).



Afbeelding 1. De set van bioassays die voor milieu (oppervlaktewater) of mens (drinkwater) relevante effecten van blootstelling aan chemische mengsels kunnen aantonen. Bioassays onder 'extra inzicht/bevestiging' zijn aanvullend op de basisset of kunnen gevonden effecten bevestigen. De 'experimentele' bioassays bevinden zich nog in de onderzoeksfase en kunnen in de toekomst toegevoegd worden aan de basisset of de set 'extra inzicht/bevestiging' [5]

De handreiking voor biologische effectmonitoring bij vergaande zuivering van rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI)-effluenten [6] geeft inzicht in de effectiviteit van de zuiveringsprocessen en risico's voor het ontvangende watermilieu. In deze handreiking zijn de ERα-CALUX, PAH-CALUX, PXR-CALUX, cytotox-CALUX en Microtox de aanbevolen bioassays, en in het geval van oxidatieve technieken, ook de p53-CALUX. Een 'Chemical Activated LUCiferase gene eXpression' (CALUX) is een bioassay die wordt ingezet om de aanwezigheid van (groepen van) stoffen met een bepaald gezondheidsgerelateerd effect aan te tonen. Bij overschrijding van de bijbehorende effectsignaalwaarde (ESW) kan een risico niet worden uitgesloten en is nader onderzoek nodig. Wanneer er geen ESW beschikbaar is (blokken met een gestippelde rand in afbeelding 1), wordt de bioassayrespons alleen getoetst aan assay-specifieke beoordelingscriteria (een twee-keer-verhoging ten opzichte van de basislijn wordt bv. beoordeeld als een mogelijk risico in de Ames-test).

Dit artikel beschrijft twee onderzoeken waarin sets bioassays zijn ingezet om verschillende watertypen te onderzoeken. In het eerste onderzoek is specifiek naar DNA-schade (genotoxiciteit) gekeken, voor het tweede onderzoek zijn de bioassays geselecteerd op basis van de Sleutelfactor Toxiciteit.

## Bioassays in de praktijk

### 'Bioassays voor waterkwaliteit in de circulaire economie'

In het programma 'Water in de Circulaire Economie (WiCE)' zijn zes verschillende bioassays gebruikt om DNA-schade (genotoxiciteit) te bepalen in verschillende watermonsters (regenwater en effluenten van RWZI's en een afvalwaterzuiveringsinstallatie (AWZI), al dan niet na additionele zuiveringsstappen. Van de gekozen bioassays (Ames-fluctuatietest, comet assay, micronucleus-test, umu-test, p53-CALUX en ToxTracker) is bekend dat ze verschillende werkingsmechanismen van genotoxiciteit meten. Meer informatie over de watermonsters en bioassays is te vinden in de rapportage van dat onderzoek [7].

*Tabel 1. Resultaten van watermonsters uit verschillende alternatieve bronnen en waterhergebruiktoepassingen in zes bioassays. Genotoxiciteit werd vastgesteld als ten minste één van de geteste condities een respons gaf op basis van de assay-specifieke criteria. Rood: genotoxiciteit waargenomen, oranje: geen eenduidige respons, groen: geen genotoxiciteit waargenomen. UF-RO: ultrafiltratie gekoppeld aan reverse osmose, O<sub>3</sub>: ozonbehandeling. De verwijzing naar A en B bij RWZI-effluent geeft aan dat het om twee verschillende locaties gaat [7]*

	Mutageniteit	Chromosomale schade		DNA schade respons		
	Ames	Comet	Micronucleus	umu	p53 CALUX	Outbacker
Regenwater	Green	Green	Orange	Green	Green	Green
Regenwater (na UF-RO)	Green	Green	Green	Green	Green	Green
RWZI A-effluent	Green	Red	Green	Red	Green	Green
RWZI B-effluent	Green	Green	Green	Red	Green	Green
RWZI B-effluent (na O <sub>3</sub> )	Green	Green	Green	Green	Green	Green
AWZI-effluent	Red	Green	Green	Red	Green	Green

De resultaten laten zien dat voor RWZI- en AWZI-effluent genotoxische effecten zijn gevonden; dit geldt mogelijk ook in het onbehandelde regenwatermonster. Deze genotoxische effecten voor RWZI- en AWZI-effluent komen overeen met de verwachting dat in deze monsters meer vervuilende stoffen aanwezig zijn dan in regenwater. Hierbij moet worden benadrukt dat de monsters gekozen zijn om verschillende waterkwaliteiten mee te kunnen nemen in het onderzoek, en dat voor risicobeoordeling meer gegevens nodig zijn (onder andere herhaling van metingen en gegevens over blootstelling). Ook moet worden benadrukt dat de gekozen monsters niet per definitie representatief zijn voor regenwater en RWZI- en AWZI-effluent in bredere zin, en dat uitkomsten per locatie en per seizoen kunnen verschillen.

Deze resultaten laten wel zien dat verschillen tussen watermonsters van verschillende kwaliteit inzichtelijk kunnen worden gemaakt. Na behandeling van regenwater met UF-RO en RWZI-B-effluent met ozon zijn bijvoorbeeld de niet-eenduidige en positieve responsen van respectievelijk de micronucleus-test en umu-test verdwenen.

Niet elk genotoxiciteitsbioassay geeft dezelfde respons. Dit wordt veroorzaakt door verschillen in werkingsmechanisme en in gevoeligheid en specificiteit van verschillende bioassays. Voor een inschatting van genotoxiciteit is het echter niet nodig om alle zes bioassays uit te voeren. In een volgend artikel wordt dieper ingegaan op de resultaten van de genotoxiciteitsmetingen [8].

### 'Sluiten van de watercyclus'

In het Topconsortium voor Kennis en Innovatie (TKI)-project 'Sluiten van de watercyclus' zijn verschillende bioassays uitgevoerd. Het ging om monsters uit een pilotopstelling voor de behandeling van RWZI-effluent met achtereenvolgens ozon, keramische membraanfiltratie, en filtratie over actieve kool [9]. De CALUX-bioassays zijn gekozen op basis van de Sleutelfactor Toxiciteit [5] en de handreiking voor biologische effectmonitoring bij vergaande zuivering van rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI)-effluenten [6].

Tabel 2. Resultaten van vijf watermonsters, voor en na behandeling met ozon en actieve kool, in CALUX-bioassays. Rood: milieurisico (en mogelijk ook een gezondheidsrisico voor de mens) kan niet worden uitgesloten, oranje: gezondheidsrisico voor de mens kan niet worden uitgesloten, maar het milieurisico is laag, groen: laag risico voor menselijke gezondheid en milieu, grijs: niet getest. Exp.: experiment, O<sub>3</sub>: ozonbehandeling, AKF: filtratiestap met actieve kool, KMF: keramische membraanfiltratie, WRK: IJsselmeerwater dat na voorbehandeling en duinfiltratie wordt gebruikt voor drinkwaterproductie [9]

	Cytotox-CALUX		Anti-AR-CALUX		ER $\alpha$ CALUX		Nrf2 CALUX		p53 CALUX		PAH CALUX		PXR CALUX	
	Cel-schade		Hormoonverstoring				Oxidatieve stress		DNA-schade		Omzetting van stoffen			
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
RWZI-effluent	Green	Green	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Yellow	Red	Red
Effluent na O <sub>3</sub>	Green	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Red	Red
Effluent na, O <sub>3</sub> KMF en AKF	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Yellow	Green	Red	Red
WRK	Grey	Green	Grey	Yellow	Grey	Green	Grey	Red	Grey	Green	Grey	Yellow	Grey	Green

De resultaten laten zien dat in RWZI-effluent de meeste effecten werden gevonden en dat voor een aantal bioassays het effect verminderde of verdween door de zuiveringsstappen. Hieruit kan worden geconcludeerd dat (een deel van) de vervuilende stoffen aanwezig in het RWZI-effluent worden verwijderd tijdens het zuiveringsproces. Uitzonderingen hierop zijn de Nrf-2-CALUX, de PXR-CALUX en gedeeltelijk de anti-AR-CALUX en de PAH-CALUX, waarvoor na de laatste zuiveringsstap een risico voor milieu en/of menselijke gezondheid niet kan worden uitgesloten. Hier geldt dat aanvullend onderzoek kan bevestigen of er inderdaad een risico is. De resultaten van het RWZI-effluent zijn na ozonbehandeling en actieve kool vergeleken met WRK-water. De kwaliteit van het vergaand gezuiverde RWZI-effluent is voor sommige biologische effecten beter dan (anti-AR-CALUX, PAH-CALUX), vergelijkbaar met (cytotox-CALUX, ER $\alpha$ -CALUX, Nrf2-CALUX, p53-CALUX) of slechter dan WRK-water (PXR-CALUX).

### Kansen en aandachtspunten bij het gebruik van bioassays

Het beschreven onderzoek laat zien dat bioassays kunnen worden ingezet voor alternatieve bronnen en water(her)gebruikstoepassingen. Ze kunnen de aanwezigheid van stoffen met een specifiek werkingsmechanisme in verschillende watertypen aantonen en de effectiviteit van een waterbehandelingsproces laten zien. Daarnaast kunnen bioassays worden ingezet om watermonsters te prioriteren voor verdere beoordeling en evaluatie. Met aanvullend onderzoek kunnen resultaten uit

de bioassays worden gekoppeld aan specifieke stoffen of stofgroepen. Kennis over de aanwezigheid en concentraties van specifieke stoffen en hun mogelijke risico's voor de gezondheid van mens en milieu is van belang bij het nemen van beslissingen over het inzetten en mogelijk extra zuiveren van alternatieve waterbronnen.

De beschikbare keuzehulp zijn nuttig voor de selectie van bioassays voor verschillende watertypen, waaronder afvalwater, oppervlaktewater en drinkwater. Dergelijke handreikingen voor de selectie van bioassays voor andere soorten watergebruik, met inbegrip van niet-drinkbaar gebruik zoals (sub)irrigatie, zijn nog niet beschikbaar. In deze gevallen kunnen de aanbevelingen worden gevolgd voor watertypes die vergelijkbaar zijn met het betreffende watergebruik (bijvoorbeeld oppervlaktewater in het geval van (sub)irrigatie), maar dit moet verder worden uitgewerkt. Op dit gebied zijn initiatieven gestart (bv. het TKI-project 'Borging van effluent RWZI voor glastuinbouwsector').

Toekomstig onderzoek is nodig om de toepassing van bioassays voor waterkwaliteitsbeoordeling uit te breiden, vooral als drinkwater de (her)gebruikstoepassing is. Dit omvat ' naar onderzoek naar bioassays en methoden voor het bepalen van nadelige effecten door blootstelling aan ziekteverwekkers en nadelige effecten van (mengsels van) vervuilende stoffen op het zenuwstelsel en afweersysteem, alsmede de interpretatie van de gegevens daarvan.

### Dankwoord

Dit onderzoek is gefinancierd uit het gezamenlijke onderzoeksprogramma Water in de Circulaire Economie (WiCE) van de Nederlandse waterbedrijven en het Vlaamse waterbedrijf De Watergroep, met bijdragen van Milou Dingemans (KWR, Universiteit Utrecht), Corine Houtman, Yvonne van Oorschot (Het Waterlaboratorium), Raymond Pieters, Laila Kuipers (Hogeschool Utrecht), Giel Hendriks, Remco Derr (Toxys), Jochen Kuckelkorn, Andrea Sehr (Umweltbundesamt, DE). Daarnaast is dit onderzoek gefinancierd uit het Topconsortium voor Kennis en Innovatie (TKI) Watertechnologie van het ministerie van Economische Zaken, met bijdragen van Ronald Koolen (Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier), Bram Martijn (voorheen PWN-T, nu Dunea), Martin Spruijt, Emmanuelle Prest (PWN-T) en Ruud van der Neut (PWN).

### Referenties

1. Leerdam, R.C. van, Rook, J.H., Riemer, L., Aa, N.G.F.M. van der (2023). *Waterbeschikbaarheid voor de bereiding van drinkwater tot 2030 - knelpunten en oplossingsrichtingen*. RIVM-briefrapport 2023-0005. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven.
2. Deltares. *Het Nationale Gieter Idee op de Veluwe*. <https://www.deltares.nl/expertise/onze-expertises/droogte/het-nationale-gieter-idee-op-de-veluwe>
3. Been, F. Dingemans, M. Koeman, N. Kools, S., Laak, T. ter (2023). 'Beoordeling chemische waterkwaliteit voor veilig hergebruik'. *H2O Water Matters*, juni 2023.
4. Hockin, A., Reus, A.A. Verschoor, A.M. (2020). *Water Wise - A decision support system for safe water use and reuse*. BTO rapport 2020.033. KWR Water Research Institute, Nieuwegein
5. Baat, M. de, Berg, S. van den, Pronk, T. (2022). *Het toepassen van bioassays binnen Nederland*. Deltafact, versie 1.0.
6. Ecofide (2023). *Handreiking voor het uitvoeren van biologische effectmonitoring bij vergaande zuivering van RWZI-effluenten*. Versie 0.8.

7. Reus, A. (2023). *Bioassays for water quality assessment in the circular economy*. KWR rapport 2023.043. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, juni 2023.
8. Reus, A., Houtman, C., Pieters, R., Hendriks, G., Kuckelkorn, J. (2024). 'Gebruik van bioassays om genotoxische activiteit te meten in alternatieve bronnen'. *H2O-Online*, 1 juli 2024. <https://www.h2owaternetwerk.nl/vakartikelen/gebruik-van-bioassays-om-genotoxische-activiteit-te-meten-in-alternatieve-bronnen>
9. Hofman, R. Siegers, W. Harmsen, D., Reus, A. (2023). *Sluiten van de watercyclus, Synergistisch effect van de combinatie van O3 en CMF*. KWR rapport 2023.026, KWR Water Research Institute, Nieuwegein.
9. Hofman, R. Siegers, W. Harmsen, D., Reus, A. (2023). *Sluiten van de watercyclus, Synergistisch effect van de combinatie van O3 en CMF*. KWR rapport 2023.026, KWR Water Research Institute, Nieuwegein.