



Ron van der Oost, Waternet

Mai Thao Nguyen, Waterproef Laboratorium

Toine Bovee, RIKILT

# REA-toets voor analyse van estrogene activiteit in de watercyclus

**De aanwezigheid van hormoonverstorende stoffen in het oppervlaktewater vormt nog steeds een punt van zorg voor waterbeheerders en drinkwaterbedrijven. Omdat chemische analyses van watermonsters op hormoonverstorende stoffen erg duur zijn, is het aantrekkelijker om eerst het potentiële hormonale effect van het totale mengsel te toetsen met bioassays. De ER-CALUX voor estrogene activiteit is in Nederland de meest bekende test om dit onderzoek uit te voeren. Een andere test voor het detecteren van estrogene activiteit is de REA-bioassay. Deze is gebaseerd op genetisch gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan estrogene stoffen een groen fluorescerend eiwit produceren. Waterproef, het laboratorium van Hollands Noorderkwartier en Waternet, implementeerde, optimaliseerde en valideerde de toets voor wateranalyses volgens de regelgeving van de Europese Unie. De test blijkt concentraties onder de 1 ng estradiol-equivalenten (EEQ) per liter water te kunnen aantonen, wat betekent dat de watermonsters kunnen worden getoetst aan de voorlopige richtlijnen voor oppervlakte- en drinkwater.**

**D**e effecten van estrogene stoffen op waterdieren, zoals de vervrouwelijking van mannetjes vissen, worden alleen in wateren met een hoge belasting van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of industriële effluënten waargenomen. Toch vormt de aanwezigheid van deze stoffen bij waterbeheerders en drinkwaterbedrijven nog steeds een punt van zorg.

Het is daarom belangrijk om een goede monitoringstrategie voor deze groep stoffen te ontwikkelen. Het meest efficiënt is om eerst het totale effect van alle hormoonverstorende stoffen in het water te meten met een bioassay. Pas als dat effect hoger is dan bepaalde grenswaarden voor drinkwater, oppervlaktewater of afvalwater is het relevant om chemische analyses uit te voeren naar de stoffen die het effect veroorzaken.

Het best onderzochte hormoonverstorende effect wordt veroorzaakt door stoffen met een estrogene activiteit. Er zijn verschillende testen bekend waarmee dit onderzoek kan worden uitgevoerd, waarvan de ER-CALUX en de REA-test het best gekarakteriseerd zijn. Aan het implementeren van ER-CALUX-testen op eigen laboratoria zijn licentiekosten verbonden. De REA (RIKILT yeast

Estrogen bioAssay), die gebruik maakt van genetisch gemodificeerde gistcellen, is echter vrij verkrijgbaar<sup>1)</sup>. Als deze gistcellen worden blootgesteld aan stoffen met een estrogene activiteit, produceren ze een groen fluorescerend eiwit, dat gemakkelijk kan worden gedetecteerd en geanalyseerd met een fluorometer.

Het doel van het hier beschreven onderzoek is om de toepasbaarheid van REA voor de analyse van watermonsters te toetsen. Hiervoor is eerst een extractieprocedure ontworpen en geoptimaliseerd. Daarna is de analyse gevalideerd volgens een Europees protocol voor bioassays, waarbij herhaalbaarheid, detectiegrenzen, specificiteit en stabiliteit werden getoetst. Tenslotte is de estrogene activiteit van een aantal watermonsters uit de beheergebieden van Hollands Noorderkwartier en Waternet bepaald met de REA-test.

## Protocol voor de REA-analyse van watermonsters

De protocollen voor de extractie van watermonsters en de uitvoering van de REA-test zijn respectievelijk overgenomen van KWR Watercycle Research Institute en RIKILT en gemodificeerd door Waterproef.

## Extractie van watermonsters

De hormoonverstorende stoffen worden uit watermonsters geëxtraheerd met SPE (Solid Phase Extraction) en Oasis HLB-kolommen, die polaire en apolaire stoffen binden. Bij de SPE-extractie wordt een liter water over de kolom geleid, die na drogen drie maal geëluëerd wordt met aceton. Het totale extract wordt ingedampd en in DMSO opgelost.

## Uitvoering van de REA-test

De gistcellen worden geënt op platen met selectief medium, die enkele maanden kunnen worden bewaard. Een kolonie van deze selectieve agar plaat wordt overnacht in vloeibaar medium geïncubeerd bij 30°C. Voor het uitvoeren van de meting wordt de gistsuspensie toegevoegd aan monsterextracten en standaarden in DMSO. Na 0 uur en na 20-24 uur incubatie worden de fluorescentie en de optische dichtheid gemeten.

## Resultaten REA-validatie-onderzoek

De eigenschappen van de REA-test voor de analyse van watermonsters zijn gevalideerd aan de hand van de Europese richtlijnen, zoals vastgelegd in EC Decision 2002/657<sup>2)</sup>.

## Dosis-respons

Er werden dosis-respons curven bepaald

van vijf estrogene stoffen: 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2), diethylstilbestrol (DES), mestranol (MES) en  $\beta$ -zearalanol (ZEA). Uit de curves (zie afbeelding 1) kon de relatieve estrogene potentie (REP) ten opzichte van E2 worden bepaald met de verhouding tussen de concentraties die de helft van het maximale effect veroorzaakten (EC50). De REP-waarden kwamen goed overeen met de waarden die eerder RIKILT publiceerde (zie tabel).

**Extractie efficiëntie**

De efficiëntie van de eerder beschreven SPE-extractieprocedure is met verschillende oplosmiddelen getest voor de vijf estrogene stoffen E2, EE2, DES, MES en ZEA. De recoveries van deze stoffen waren het hoogst na elutie met aceton, respectievelijk 90, 95, 87, 85 en 56 procent. Deze opbrengsten zijn, met uitzondering van ZEA, zeer goed.

**Detectielimiet**

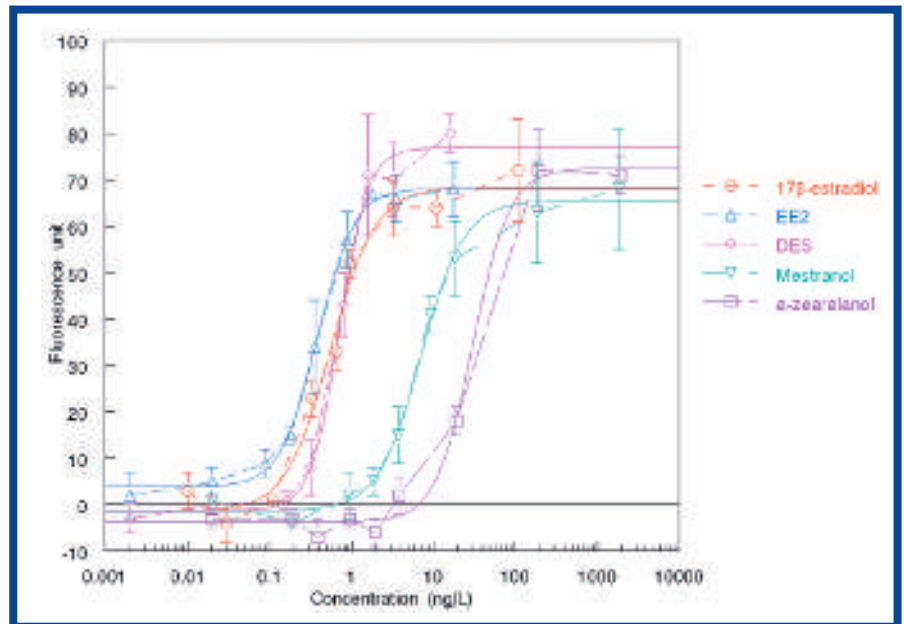
De detectielimiet van de analyse is vastgesteld met de REA-analyse van 20 blanco watermonsters en 100 watermonsters met daarin de vijf stoffen met estrogene activiteit (E2, EE2, DES, MES en ZEA) die in verschillende weken waren geëxtraheerd en geanalyseerd. Met behulp van deze analyses werden bovendien de beslissingsgrens (CC $\alpha$  = gemiddelde van de blanco + 2.33\*sd blanco) en het detectievermogen (CC $\beta$  = CC $\alpha$  + 1.64\*sd 'estrogen' monsters) van de test bepaald. De resultaten staan in afbeelding 2. De uitslagen voldeden aan de criteria die aan CC $\alpha$  en CC $\beta$  worden gesteld. De detectielimiet van de analyse werd vastgesteld op 0,3 ng estradiol-equivalenten per liter water. De voorgestelde richtlijnen voor ecologische risico's in oppervlaktewater (Waterdienst) en humane risico's van drinkwater (RIVM) zijn respectievelijk 1 en 7 EEQ/L water. De detectiegrens van de REA-test is dus ruim voldoende om normoverschrijdingen aan te tonen.

**Reproduceerbaarheid**

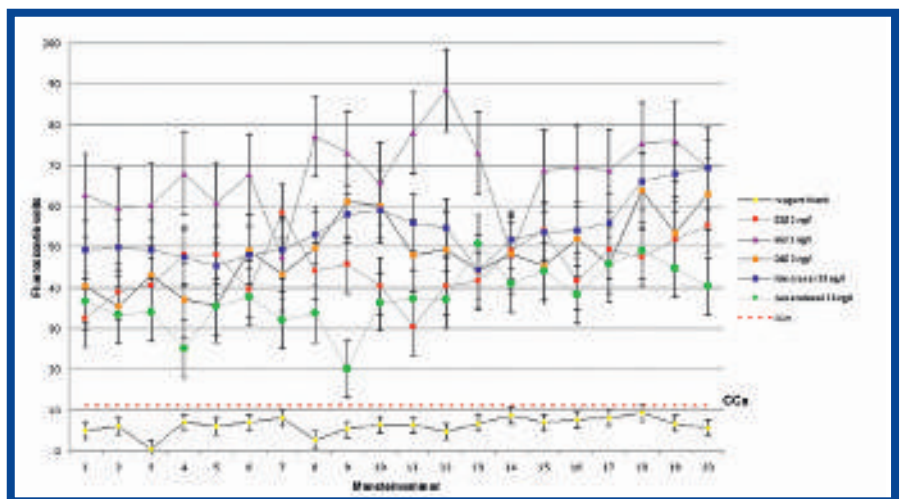
De reproduceerbaarheid van de REA-analyse van watermonsters is met en zonder toevoeging van de vijf estrogene stoffen onderzocht. Zes series van 20 monsters werden alle op drie verschillende dagen geëxtraheerd en geanalyseerd. De dosis-responscurves kwamen qua vorm en helling goed overeen. De standaarddeviatie van de maximale respons bedroeg negen procent. De standaarddeviatie van extracten van monsters met gehalten juist boven de detectielimiet bedroeg minder dan 20 procent, terwijl de standaarddeviaties van de triplo metingen van hetzelfde monster minder dan vijf procent waren. De extractie en de REA-test zijn dus goed reproduceerbaar.

**Relatieve estrogene potenties van vijf estrogene stoffen.**

component	EC50 Waterproef	REP Waterproef	REP RIKILT
E2	0,56	1,00	1,00
EE2	0,38	1,47	1,20
DES	0,73	0,77	1,00
MES	7,03	0,08	0,11
ZEA	30,61	0,02	0,03



Afb. 1: REA-dosis-responscurves voor vijf estrogene stoffen.



Afb. 2: Resultaten van het validatieonderzoek met 20 blanco en 100 analyses van water waaraan estrogene stoffen waren toegevoegd.

**Specificiteit en storingen**

De specificiteit van de REA is getoetst door toevoeging van hoge concentraties testosteron (androgeen) en progesteron (progestageen). Deze toevoegingen hadden in de blanco en in de met lage dosis estrogene aangevulde monsters geen effect op de REA-respons (zie afbeelding 3). De test is dus specifiek voor estrogene activiteit.

**Stabiliteit**

De estrogene activiteit van een watermonster met estradiol dat bij 4°C werd bewaard, bleef gedurende vier weken constant. Hoewel dit alleen voor estradiol

is onderzocht, is dit een indicatie dat watermonsters voor langere tijd gekoeld kunnen worden bewaard tot de analyse. Bij Waterproef wordt er echter naar gestreefd om de analyse van watermonsters binnen een week uit te voeren.

**Vergelijking Waterproef en RIKILT**

Een serie monsters die zowel door Waterproef als door RIKILT werden opgewerkt en geanalyseerd, liet een goede overeenkomst tussen de beide laboratoria zien. In elf van de 16 monsters werd een vergelijkbare estrogene activiteit gevonden. Doordat RIKILT een kleiner watervolume extraheerde kon Waterproef in vijf monsters die bij RIKILT onder de detectiegrens lagen, wel een effect meten.

**Estrogene activiteit van rwzi-effluënten en deconjugatie**

Er zijn monsters verzameld van twaalf rwzi's in het beheergebied van Waternet en Hollands Noorderkwartier. In negen van de twaalf rwzi-effluënten (Wervershoof, Zaandam, Alkmaar, Amsterdam West, Maarsse, Beverwijk, Geestmerambacht,

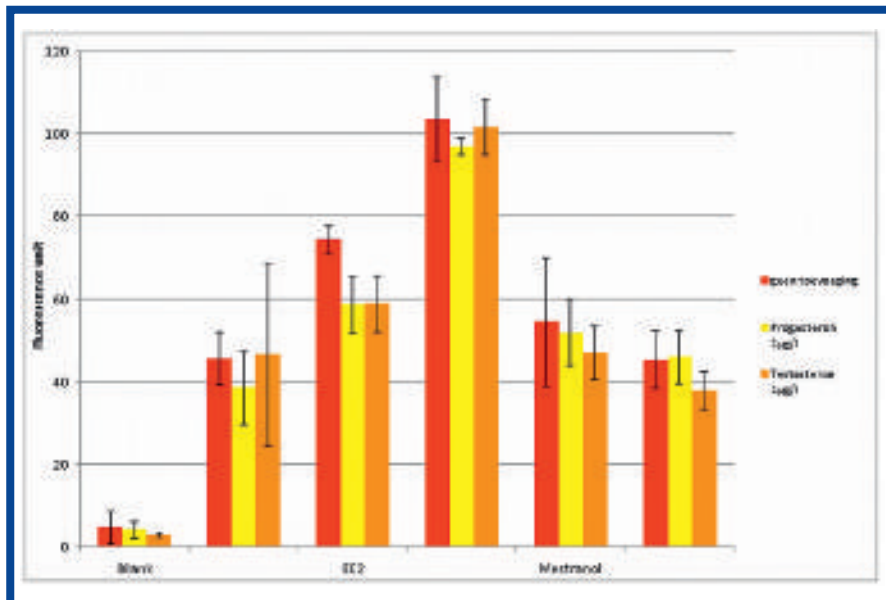
Horstermeer en Blaricum) lag de estrogene activiteit onder de detectiegrens van 0,3 ng EEQ/L. In drie effluënten (Amsterdam Westpoort, Amstelveen en Den Helder) werden estrogene activiteiten gemeten van respectievelijk 1, 4 en 11 ng EEQ/L. Voor deze extracten moesten verdunningen worden ingezet omdat ze onverdund cytotoxisch waren (de groei van de gistcellen werd meer dan 25 procent geremd). Door de hogere verdunning waren de detectiegrenzen voor deze monsters iets hoger, maar dat bleek in de praktijk geen beperking te zijn.

Vaak wordt verondersteld dat het estrogene effect van praktijkmonsters lager is doordat de estrogene stoffen gebonden zijn aan andere stoffen ('conjugatie'), waardoor de estrogene activiteit lager wordt. Estradiol wordt door dieren (via urine) grotendeels als conjugaat uitgescheiden. Om dit te onderzoeken is op alle rwzi-monsters een deconjugatiestap uitgevoerd (toevoeging van enzymen). De deconjugatie had in geen van de rwzi monsters een significant effect.

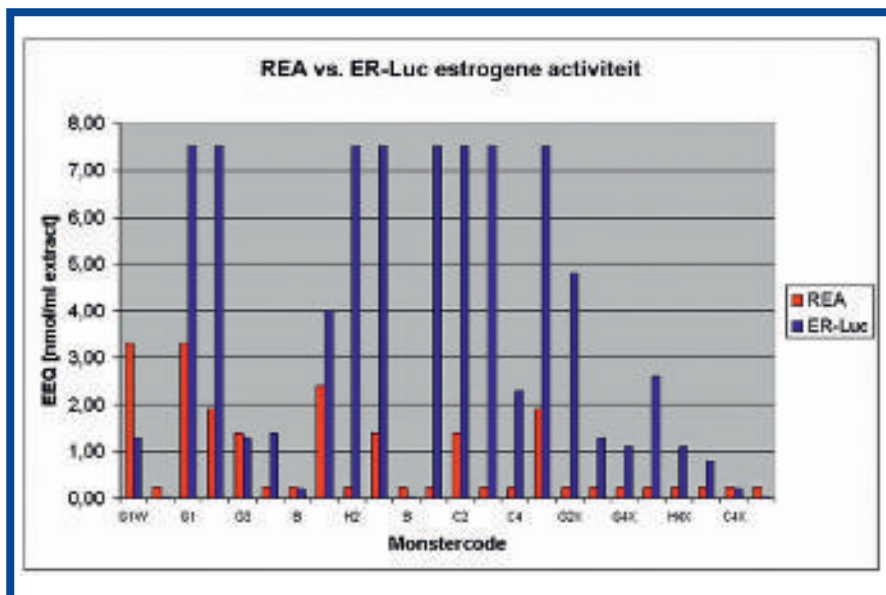
### Vergelijking tussen de REA- en ER-CALUX-test

De ER-CALUX is meest gebruikte test in Nederland om estrogene activiteit in watermonsters te bepalen. De test werkt volgens hetzelfde principe als de REA, met als belangrijkste verschillen dat de ER-CALUX wordt uitgevoerd met een kweek van humane borstkankercellen en dat geen fluorescerend eiwit maar een luciferase enzym wordt gevormd na blootstelling aan estrogene stoffen. Na toevoeging van luciferine wordt licht geproduceerd door de cellen. Een nadeel van deze cellen is dat ze gevoeliger zijn voor cytotoxiciteit, lastiger te kweken en duurder in gebruik zijn. Een nadeel van gistcellen is dat de gevoeligheid van de test lager is dan die van de ER-CALUX-cellen, maar de specificiteit is weer beter. Zo hebben gistcellen een minder actief hormoonmetabolisme dan dierlijke cellijnen, zodat de kans op inactiveren door omzettingen kleiner is. De kansen op vals-negatieve en vals-positieve uitslagen zijn daarom kleiner bij gistcellen. Aan de andere kant is het mogelijk dat sommige stoffen juist na omzetting een estrogene werking krijgen, wat weer een voordeel van cellijnen zou kunnen zijn. Gistcellen en celkweken worden als meest geschikte bioassays voor hormoonverstoring beschouwd<sup>3)</sup>.

Om de assays te vergelijken is een serie monsters onderzocht met zowel de ER-LUC (geanalyseerd op de universiteit van Wageningen met dezelfde cellijn als ER-CALUX) als de REA. Een serie van 24 monsters bestond uit een 20L watermonster, XAD-concentraten, POCIS passieve sampler extracten en blanco's. In afbeelding 4 is te zien dat de met ER-LUC vastgestelde gehalten gemiddeld hoger zijn dan die van de REA. 21 monsters geven met de ER-LUC een positieve respons, terwijl bij de REA-test acht monsters boven de detectiegrens komen. Zeven monsters zijn volgens ER-LUC hoger dan 1 ng EEQ/L, maar volgens de REA lager dan de detectiegrens. Het is onbekend



Afb. 3: Onderzoek naar de specificiteit en de verstoring van de REA-test door andere hormonen.



Afb. 4: Vergelijkend onderzoek tussen de REA- en de ER-LUC-test voor estrogene activiteit.

of deze zeven monsters vals positief zijn in de ER-LUC of vals negatief in de REA. Er is één monster waarbij de REA een hoger gehalte vaststelt dan de ER-LUC.

### Conclusies

De REA-test is gevalideerd voor de analyse van watermonsters volgens de regels van de Europese Unie. De efficiëntie van een SPE-opwerking met Oasis kolommen en aceton-elutie was voldoende. De gevoeligheid, reproduceerbaarheid, specificiteit en stabiliteit van de REA-test voldoen aan de gestelde eisen. Daarnaast is een goede overeenkomst gevonden met analyses van watermonsters tussen Waterproef en RIKILT. De conjugatie van estrogene lijkt geen rol te spelen in rwzi-effluënten, want een deconjugatiestap had geen effect op de estrogene respons. In vergelijking met de ER-CALUX is de REA-test minder gevoelig, maar de detectiegrens is voldoende laag om relevante concentraties in de watercyclus aan te tonen en deze te toetsen aan de richtlijnen.

### LITERATUUR

- 1) Bovee T. (2006). Development, validation and routine application of the in vitro REA and DR-CALUX reporter gene bioassays for the screening of estrogenic compounds and dioxins in food and feed. Academisch proefschrift Universiteit van Wageningen.
- 2) Nguyen M., R. van der Oost en T. Bovee (2011). Validation of the REA bioassay to detect estrogenic activity in the water cycle. *Toxicology in Vitro* 25, pag. 2003-2009.
- 3) Bovee T. en .. Pikkemaat (2009). Bioactivity-based screening of antibiotics and hormones. *J. Chrom. A* 1216, pag. 8035-8050.
- 4) Legler J., C. van den Brink, A. Brouwer, A. Murk, P. van der Saag, A. Vethaak en B. van der Burg (1999). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sciences* 48, pag. 55-66.