

## Effect Directed Analysis achterhaalt verantwoordelijke stoffen voor bioassayrespons

*Sanne Brekelmans, Tineke Slootweg, Corine Houtman (Het Waterlaboratorium)*

**Wanneer in bioassays toxische effecten op de waterkwaliteit aangetoond worden, kan het Effect Directed Analysis (EDA)-platform achterhalen welke stoffen in het water hier de veroorzakers van zijn. Het EDA-platform draait nu zo'n vijf jaar bij Het Waterlaboratorium. Het platform is gekoppeld aan bioassays voor veel verschillende soorten effecten en is geschikt gemaakt voor toepassing in waterkwaliteitsmonitoring, bijvoorbeeld voor waterschappen, drinkwaterbedrijven en Rijkswaterstaat. Dit artikel bespreekt de toepasbaarheid van het EDA-platform en geeft voorbeelden van recente resultaten.**

Het gebruik van grote hoeveelheden chemicaliën door industrie en landbouw en het lozen van met chemische stoffen vervuild afvalwater zorgen voor een toenemende druk op de waterkwaliteit in Nederland. Verwijdering van chemische stoffen in rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) is vaak niet volledig, zodat ook via het effluent van gezuiverd afvalwater van huishoudens stoffen in het oppervlaktewater terecht komen [1]. Sommige stoffen zijn schadelijk voor het ecosysteem of kunnen bij inname van drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater een negatief effect hebben op de menselijke gezondheid. In de kaderrichtlijn water (KRW) is als doel gesteld om in 2027 een goede ecologische en chemische toestand te bereiken. Met een watersysteemanalyse worden de juiste middelen gekozen om dit doel te bereiken. Onderdeel van de watersysteemanalyse is het monitoren van de chemische waterkwaliteit. Monitoring is complex doordat naast de vele bekende stoffen ook veel nog onbekende, mogelijk toxische stoffen als vervuiling in water aanwezig zijn. Daarom gebruiken onder andere waterschappen, Rijkswaterstaat en drinkwaterbedrijven voor de monitoring van de waterkwaliteit steeds vaker bioassays om inzicht te krijgen in de omvang van de risico's van mengsels van stoffen voor ecosystemen en de menselijke gezondheid.

*In vitro* bioassays bestaan bijvoorbeeld uit bacteriestammen en cellijnen die, al dan niet door genetische modificatie, een meetbare respons geven wanneer ze blootgesteld worden aan chemische stoffen met een specifiek biologisch effect. Met bioassays kunnen ook (extracten van) watermonsters getest worden. De assays reageren dan op de actieve stoffen – zowel de bekende als de onbekende - die aanwezig zijn in het water. Daarmee geven bioassays een geïntegreerd beeld van de aanwezigheid van stoffen die biologische of gezondheidseffecten kunnen veroorzaken. Verschillende gezondheidkundige eindpunten, zoals verstoring van de hormoonhuishouding, genotoxiciteit, oxidatieve stress en cytotoxiciteit, kunnen worden gemeten met behulp van bioassays [2].

Voor de waterschappen is de Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit (ESF2) ontwikkeld. Deze wordt momenteel geoptimaliseerd in de kennisimpuls waterkwaliteit – toxiciteit (KIWK-Tox) [3]. Eén van de modules van de EFS-T is het toxicologiespoor, waarin de toxiciteit getoetst wordt met bioassays. In het najaar van 2021 zal vanuit het KIWK – Toxiciteit-project een website worden gelanceerd, waarin de kennis en tools van de ESF2 worden toegelicht en kunnen worden toegepast. Onderdeel hiervan is onder andere een keuzemodule voor de bioassays.

Omdat een positieve respons in een bioassay niet altijd duidt op een verhoogd gezondheidsrisico, wordt gebruik gemaakt van effect-sigitaalwaarden (ESW, oftewel 'trigger values') om de gemeten respons te kunnen duiden [4], [5]. Deze ESW geven de hoogte van de gemeten activiteit weer waarónder een risico voor de gezondheid of het milieu niet te verwachten is. Bij een overschrijding van de ESW kan een risico niet uitgesloten worden en wordt extra onderzoek aanbevolen.

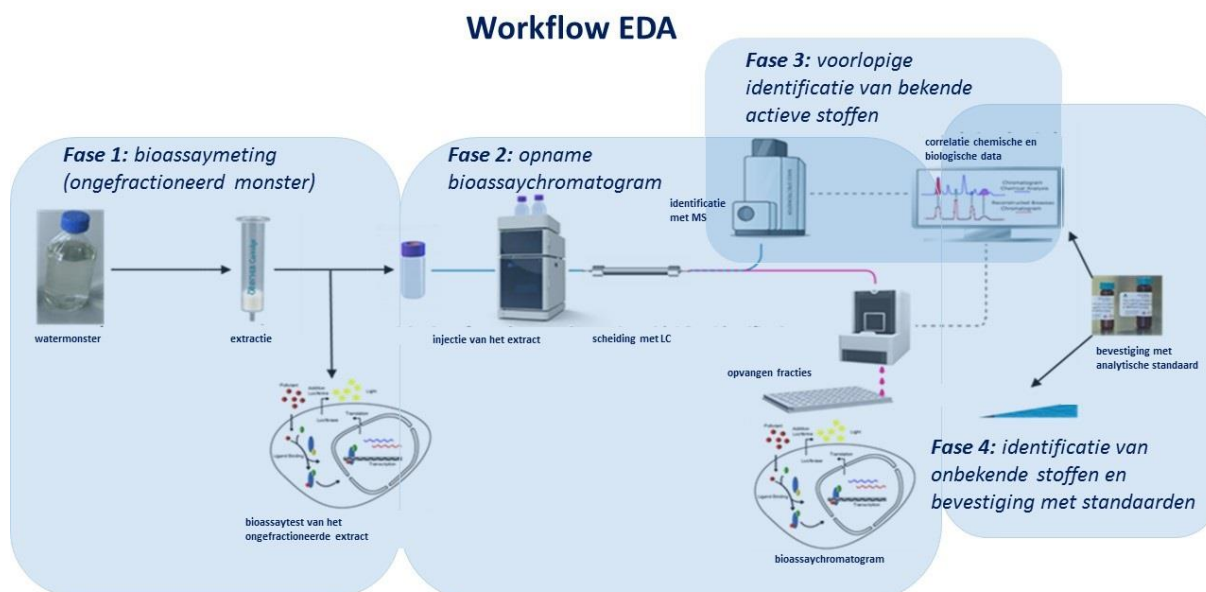
Bioassays tonen activiteit aan bij de aanwezigheid van stoffen met een bepaald biologisch effect, maar geven geen informatie over welke verbinding verantwoordelijk is voor een respons. De identiteit (naam en chemische structuurformule) is echter wel nodig voor de risicobeoordeling van een stof [6]. Bovendien kan op basis van alleen het bioassayresultaat niet vastgesteld worden of het om een enkele stof gaat die de gemeten activiteit veroorzaakt, of dat meerdere stoffen daaraan bijdragen. Om de identiteit van deze stof(fen) vast te stellen kan effectgestuurde analyse (Effect Directed Analysis; EDA) gebruikt worden.

EDA is een krachtig hulpmiddel om de drijfveren achter een bioassay-activiteit in complexe milieumonsters te achterhalen en te identificeren [6]. EDA combineert bioassays met chromatografische scheiding ('fractionering', het sorteren van stoffen naar hun polariteit) en vervolgens chemische analyse in de actieve fracties. Vroeger was de techniek erg arbeidsintensief en werden de veroorzakende stoffen lang niet altijd opgehelderd. In een samenwerking tussen de Vrije Universiteit en Het Waterlaboratorium (HWL) en met steun van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO), is recent een efficiënter 'hoge resolutie'-EDA-platform ontwikkeld [7]. Dit maakt gebruik van fractionering met hoge resolutie (in veel en zeer kleine fracties). In iedere fractie wordt gemeten met één of meerdere bioassays. De resultaten daarvan – zogenoemde bioassaychromatogrammen - kunnen direct gecorreleerd worden aan de parallel opgenomen massaspectrometrie (MS)-chromatogrammen. Hierdoor is het mogelijk om de precieze massa's van actieve verbindingen te achterhalen. Deze massa's zijn de sleutel tot het vaststellen van de stofidentiteit.

HWL heeft het EDA-platform in 2016 geïmplementeerd en daarna gevalideerd om ook buiten een academische setting, zoals voor waterbeheerders, overheden en de drinkwatersector, toegepast te worden [8]. Het EDA-platform past goed bij het gebruik van de vernieuwde EFS2 [9]. HWL koppelt steeds meer bioassays aan het EDA-platform, zodat naar steeds meer toxicologische eindpunten onderzocht kunnen worden. Dit vakartikel bespreekt de mogelijkheden van het EDA-platform voor waterbeheerders en drinkwaterbedrijven en belicht een aantal succesvolle toepassingen op (afval)watermonsters.

## **Methode**

De 'workflow' voor routinematige toepassing van het EDA-platform bestaat uit vier fases. Deze worden hieronder toegelicht en zijn schematisch weergegeven in afbeelding 1. Afhankelijk van de precieze onderzoeksvraag kunnen waterbeheerders of drinkwaterbedrijven bepalen welke van de vier fasen vereist zijn. Indien alleen een karakterisering van de actieve stoffen nodig is, kan volstaan worden met fase 1 en 2. Indien volledige identificatie van stoffen gewenst is, dienen ook fase 3 en soms ook 4 doorlopen te worden.



Afbeelding 1. Schematisch overzicht van de vier fases van het hoge resolutie-EDA-platform [8]

Fase 1 bestaat uit de bioassaymeting in extracten van ongefractioneerde watermonsters. Dit is de bioassaymonitoring zoals die al steeds vaker wordt toegepast in de watersector. Hiermee wordt het effect in de ongefractioneerde monsters bepaald. Vaak worden watermonsters getest met verschillende bioassays, om de eindpunten die het relevantst zijn voor waterkwaliteit in beeld te brengen. Zodra een bioassayrespons een ESW overschrijdt, is er mogelijk een risico. Als onbekend is welke stoffen het gemeten effect hebben veroorzaakt, start fase 2.

Fase 2 bestaat uit fractionering en opname van 'bioassaychromatogrammen' met behulp van hoge resolutie (HR)-vloeistofchromatografie (LC). De stoffen in het extract van het watermonster worden met een chromatografiekolom gescheiden naar polariteit. Ze worden opgevangen in 200 tot 300 kleine fracties, die vervolgens weer worden getest in de bioassay(s) waarin het ongefractioneerde monster respons gaf. De respons van elke fractie wordt geplott als functie van de retentietijd, wat resulteert in een bioassaychromatogram. Hierbij geven agonistische effecten een piek omhoog en antagonistische effecten een piek omlaag. MS-chromatogrammen worden tegelijkertijd met de fractionering opgenomen. Deze worden in fase 3 en 4 gebruikt voor identificatie van de stoffen.

Het bioassaychromatogram alleen levert al waardevolle informatie op; de retentietijd en het aantal pieken zeggen iets over de polariteit en het aantal stoffen dat bijdraagt aan een effect. Door fractionering kunnen ook agonistische en antagonistische stoffen uit elkaar gehaald worden, waarna ze in bioassaychromatogrammen te zien zijn als afzonderlijke pieken.

Bovendien kunnen watermonsters onderling vergeleken worden door bioassaychromatogrammen over elkaar te plotten. Hierdoor kan bijvoorbeeld de opbouw van activiteit voor en na zuiveringsstappen onderling vergeleken worden, zoals ook is te zien in afbeelding 2. Als verdere identificatie van de betrokken stoffen nodig is, start fase 3.

Fase 3 bestaat uit de voorlopige identificatie van bekende actieve stoffen. Van sommige stoffen is namelijk de retentietijd al bekend en is bovendien al aangetoond dat zij de onderzochte activiteit kunnen veroorzaken. Als op de bekende retentietijd van een dergelijke stof een piek in het bioassaychromatogram gevonden is, is dat al een aanwijzing dat deze stof in het monster aanwezig

kan zijn. Voor de overige pieken in het bioassaychromatogram worden door middel van chemische *targeted screening* de verantwoordelijke stoffen gezocht. Hiervoor worden de in fase 2 opgenomen MS-data vergeleken met MS-spectra in een stoffenbibliotheek. Een groot voordeel van EDA is dat alleen de MS-data in een kort tijdbestek van zes tot twaalf seconden rond de retentietijd van de bioassaypiek geïnterpreteerd hoeven te worden. In de gevallen dat er in de stoffenbibliotheek geen match gevonden wordt en het dus volledig onbekend is welke stoffen het opgemerkte bioassayeffect geven, wordt fase 4 gestart.

In fase 4, de meest arbeidsintensieve fase, wordt getracht op basis van de MS-data op de retentietijd van de piek in het bioassaychromatogram via verschillende stappen zelf een molecuulstructuur voor kandidaatstoffen af te leiden. Dit proces heet *non-targeted screening*. Wanneer een stof is gevonden die het gemeten effect mogelijk heeft veroorzaakt, wordt deze in zuivere vorm aangeschaft en getest in de bioassay om te controleren of deze daadwerkelijk het waargenomen effect geeft.

### **Toepassingen**

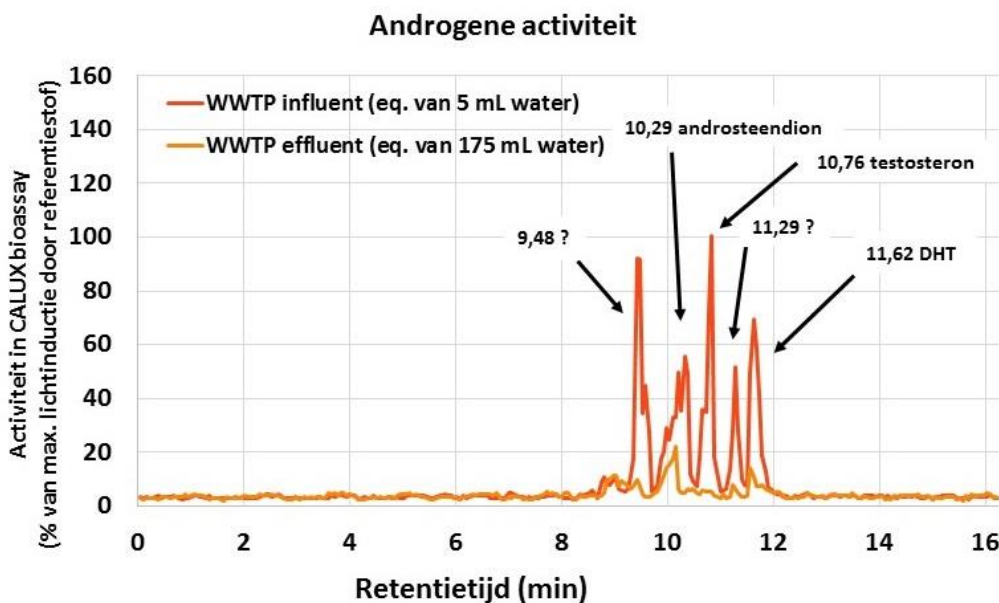
Het EDA-platform is inmiddels succesvol toegepast op RWZI-influenten en –effluenten, zuiveringsprocessen en oppervlaktewateren [10,] [11]. Een overzicht van de eindpunten die met het EDA-platform zijn onderzocht en de bioassays waaraan het platform is gekoppeld is te zien in tabel 1. Deze paragraaf brengt enkele voorbeelden van toepassing voor het voetlicht.

Tabel 1. Eindpunten waarvoor bioassays aan het EDA-platform zijn gekoppeld en toegepast

Eindpunt	Effect	Bioassay	Referentie
<i>Hormoonverstoring (agonistisch)</i>			
Androgene activiteit	Gelijk aan dat van het mannelijk geslachtshormoon testosteron	AR-CALUX AR-EcoScreen	[8, 10] [11, 12]
Glucocorticoïde	Gelijk aan dat van glucocorticoïde hormonen	GR-CALUX reporter gene assay	[8, 11]
Oestrogeen	Gelijk aan dat van het vrouwelijk geslachtshormoon 17β-estradiol	ERα-CALUX ER-Luc gene reporter assay	[8] [7, 11, 12]
Progestoogeen	Gelijk aan dat van het geslachts- en zwangerschapshormoon progesteron	PR-CALUX reporter gene assay	[10]
<i>Hormoonverstoring (antagonistisch)</i>			
Anti-androgeen	Remming mannelijk geslachtshormoon	Anti-AR CALUX	[8, 10]
Anti-progestoogeen	Remming zwangerschapshormoon	Anti-PR-CALUX	[10]
<i>Reactiviteit</i>			
Genotoxiciteit	DNA-schade	Luminescente Amestest P53-CALUX	[11] HWL, in voorber.
Cytotoxiciteit	Celbeschadiging	Cytotox-CALUX	[8, 10]
Adaptieve stressrespons	Oxidatieve stress	NRF2-CALUX	HWL, in voorber.

### **Voorbeeld 1: androgene activiteit in een RWZI**

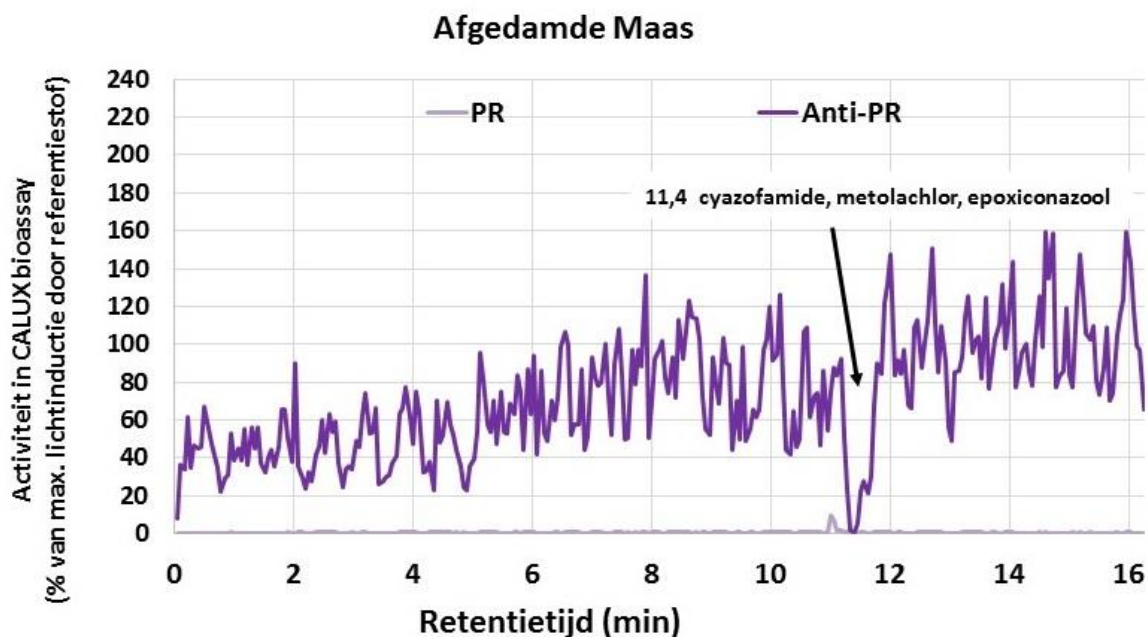
Afbeelding 2 toont het bioassaychromatogram van de androgene activiteit in het in- en effluent van een Nederlandse rioolwaterzuivering. Vijf pieken tonen de activiteit van (minstens) vijf verschillende androgene stoffen in het influent. Drie ervan konden in EDA-fase 3 en 4 geïdentificeerd worden. Het betreft de bekende mannelijke hormonen androsteendion, testosteron en dihydrotestosteron (DHT). In het effluent is alleen van androsteendion nog een kleine piek te zien. De overige actieve stoffen zijn dus tijdens de zuivering in de RWZI verwijderd of afgebroken.



Afbeelding 2. Bioassaychromatogram van androgene activiteit in RWZI-influent en -effluent. De pieken geven biologische activiteit aan van de verschillende bijdragende stoffen. Geïdentificeerde verantwoordelijke stoffen en hun retentietijden zijn aangeduid. Piekoppervlak is een maat voor de concentratie van de activiteit. Aangezien het effluent 35x geconcentreerder is getest dan het influent (175 mL effluent t.o.v. 5 mL influent) is de werkelijke afname in de zuivering nog groter dan in de afbeelding lijkt

### **Voorbeeld 2: anti-progestogene activiteit in de Afgedamde Maas**

Afbeelding 3 toont twee bioassaychromatogrammen van oppervlaktewater uit de Afgedamde Maas. De eerste (lichtpaars) is die van progestogene activiteit, de tweede (donkerpaars) die van de remming daarvan (anti-progestogene activiteit). In hetzelfde watermonster blijken beide activiteiten aanwezig. Door de fractionering zijn ze van elkaar gescheiden. Rond een retentietijd van 11 minuten is een klein piekje van progestogene activiteit te zien. In het ongefractioneerde monster was de progestogene activiteit niet opgemerkt; deze werd overschaduwed door de grotere anti-progestogene activiteit. Een kenmerkende negatieve piek van anti-progestogene activiteit is daarnaast te zien op een retentietijd van 11,40 minuten. Fase 3 en 4 van de EDA-workflow waren gericht op het ophelderen van de verantwoordelijke stoffen voor deze laatste piek. Op basis van de MS-data en de stoffendatabase en bevestiging met zuivere standaarden werd geconcludeerd dat de fungiciden cyazofamid, epoxiconazool en de herbicide metolachlor hebben bijgedragen aan de anti-progestogene activiteit.

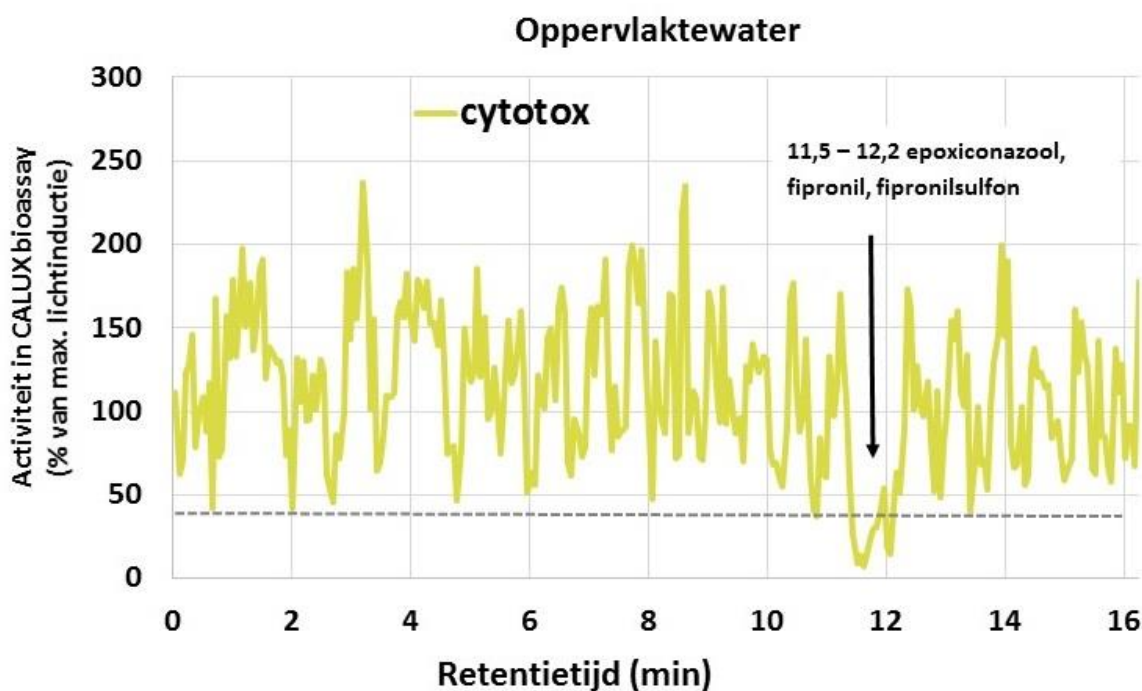


Afbeelding 3. Bioassaychromatogrammen van (anti-)progesterogene activiteit in een gefractioneerd oppervlaktewatermonster van de afgedamde Maas. Geïdentificeerde verantwoordelijke stoffen en hun retentietijd zijn aangeduid

### **Voorbeeld 3: cytotoxiciteit in oppervlaktewater**

In oppervlaktewater in het beheergebied van waterschap Hunze en Aa's was met bioassaymonitoring cytotoxiciteit vastgesteld. HWL kreeg van het waterschap het verzoek deze activiteit met EDA verder te onderzoeken. Na fractionering is een bioassaychromatogram voor cytotoxiciteit opgenomen (afbeelding 4). Het chromatogram voor dit effect geeft altijd veel biologische experimentele variatie, een negatieve piek tot beneden de grijze stippellijn duidt echter op cytotoxiciteit. Een dergelijke piek is waargenomen in het retentievenster van 11,5 tot 12,2 min.





Afbeelding 4. Bioassaychromatogram van cytotoxiciteit in het waterextract van waterschap Hunze en Aa's. Geïdentificeerde stoffen (volgens de overeenkomstige retentietijd) zijn aangeduid

Op basis van de MS-data in het retentievenster van de cytotoxiciteitspiek zijn vervolgens twaalf stoffen geïdentificeerd. Van vier daarvan is de cytotoxische activiteit met een zuivere standaard bevestigd in de cytotoxiciteitsbioassay. Het gaat om de bestrijdingsmiddelen tebuconazool (een fungicide), fipronil (een insecticide), fipronilsulfon (metabool van fipronil) en epoxiconazool (fungicide). Deze stoffen hebben derhalve bijgedragen aan de waargenomen cytotoxiciteit. Daarnaast zijn er nog zeven andere stoffen geïdentificeerd met dezelfde retentietijd als de cytotoxiciteit, maar waarvan onbekend is of zij cytotoxische activiteit vertonen in de cytotox-bioassay. Aanvullend onderzoek kan dit vaststellen door zuivere standaarden van deze stoffen te testen in de bioassay. Epoxiconazool was in het voorbeeld van de Afgedamde Maas ook aanwezig en daar geïdentificeerd als anti-progestoogeen. De stof heeft beide werkingen, cytotoxiciteit treedt op bij een hogere concentratie dan anti-progestoogeeniteit.

Deze voorbeelden zijn een kleine greep uit de toepassingen van het EDA-platform tot nu toe. Vaak leidt toepassing tot succesvolle identificatie van actieve stoffen. Soms blijven echter ook ongeïdentificeerde pieken over, zoals in voorbeeld 1. De succeskans van de identificatie zal in de nabije toekomst ongetwijfeld nog stijgen, aangezien de ontwikkelingen om de (interpretatie van) non-targeted screening te verbeteren snel gaan en hier ook in de Nederlandse watersector vol op wordt ingezet.

## Conclusie

Bioassays vinden steeds meer toepassing in de monitoring van chemische waterkwaliteit. Om vast te stellen of bioassayresponsen op een risico duiden, is identificatie van de actieve stoffen nodig. Het EDA-platform maakt de karakterisering en identificatie van biologische actieve stoffen in water mogelijk. Het platform is robuust en levert herhaalbare en consistente resultaten op tussen de



bioassaychromatogrammen en MS-data. De toepassing van het platform op oppervlakte- en afvalwatermonsters resulteerde al in de identificatie van stoffen met verschillende eindpunten, zoals estrogene, (anti)-androgene, (anti)-progestogene en glucocorticoïde activiteit.

EDA is een arbeidsintensief proces. Daarom is het EDA-platform modulair opgebouwd. Afhankelijk van de vraag of actieve stoffen met zekerheid geïdentificeerd dienen te worden of dat een karakterisering van de chemische eigenschappen volstaat, kunnen waterbeheerders of drinkwaterbedrijven ervoor kiezen om na hun reguliere bioassaymonitoring (fase 1 van het platform) alleen EDA-fase 2 of ook 3 en 4 uit te laten voeren.

Het EDA-platform kan ingezet worden voor onderzoek naar onbekende stoffen met een biologische activiteit in de watersector. Het is hiermee een krachtige hulp bij de duiding van bioassayresultaten. Dit zal de inzetbaarheid van bioassays als effectgerichte monitoring zeker kunnen vergroten.

### Dankwoord

Onderzoek gepresenteerd in dit artikel is uitgevoerd in opdracht van drinkwaterbedrijven Dunea en Waternet en waterschap Hunze en Aa's.

### Contact

Corine Houtman, Het Waterlaboratorium, J.W. Lucasweg 2, 2031 BE Haarlem.

[corine.houtman@hetwaterlaboratorium.nl](mailto:corine.houtman@hetwaterlaboratorium.nl)

### Referenties

1. Otálora, A. (2021). 'Emerging organic pollutants in aqueous environments: Detection, monitoring, and removal techniques'. *Journal of Science with Technological Applications* 2021, 10:92-153.
2. Schriks, M. et al. (2015). 'Selection criteria to select in vitro bioassays for implementation and use. Report for the research project DEMEAU, European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under Grant Agreement no. 308339. <http://demeau-fp7.eu/3>.
3. Kennisimpuls Waterkwaliteit. <https://www.kennisimpulswaterkwaliteit.nl/nl>
4. Oost, R. van der et al. (2017). 'SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I—model design and effect-based trigger values'. *Environmental toxicology and chemistry* 2017, 36(9):2385-2399.
5. Been, F. et al. (2021). 'Development of a Framework to Derive Effect-Based Trigger Values to Interpret CALUX Data for Drinking Water Quality'. *Water Research* 2021:116859.
6. Houtman, C.J., Legler, J., Thomas, K.V. (2011). 'Effect-Directed Analysis of Endocrine Disruptors in Aquatic Ecosystems'. In Brack, W. (ed.) *Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination*, vol. 15. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag; 2011: 237-266.
7. Jonker, W. et al. (2015). 'Rapid activity-directed screening of estrogens by parallel coupling of liquid chromatography with a functional gene reporter assay and mass spectrometry'. *J Chromatogr A* 2015, 1406:165-174.
8. Houtman, C.J. et al. (2020). 'High resolution effect-directed analysis of steroid hormone (ant)agonists in surface and wastewater quality monitoring'. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2020, 80:103460.
9. Posthuma, L. et al. (2019). 'Waterkwaliteit zonder toxiciteit'. *H2O-online*, 5 juni 2019

10. Houtman, C.J. et al. (2021). 'Characterisation of (anti-)progestogenic and (anti-)androgenic activities in surface and wastewater using high resolution effectdirected analysis'. *Environment International* 2021, 153:106536.
11. Zwart, N. et al. (2020). 'Identification of mutagenic and endocrine disrupting compounds in surface water and wastewater treatment plant effluents using high-resolution effect-directed analysis'. *Water Research* 2020, 168:115204.
12. Zwart, N. et al. (2018). 'High-Throughput Effect-Directed Analysis Using Downscaled in Vitro Reporter Gene Assays To Identify Endocrine Disruptors in Surface Water'. *Environmental Science & Technology* 2018, 52:11.