

## Waterkwaliteit verbeteren met EDA: stand van de wetenschap

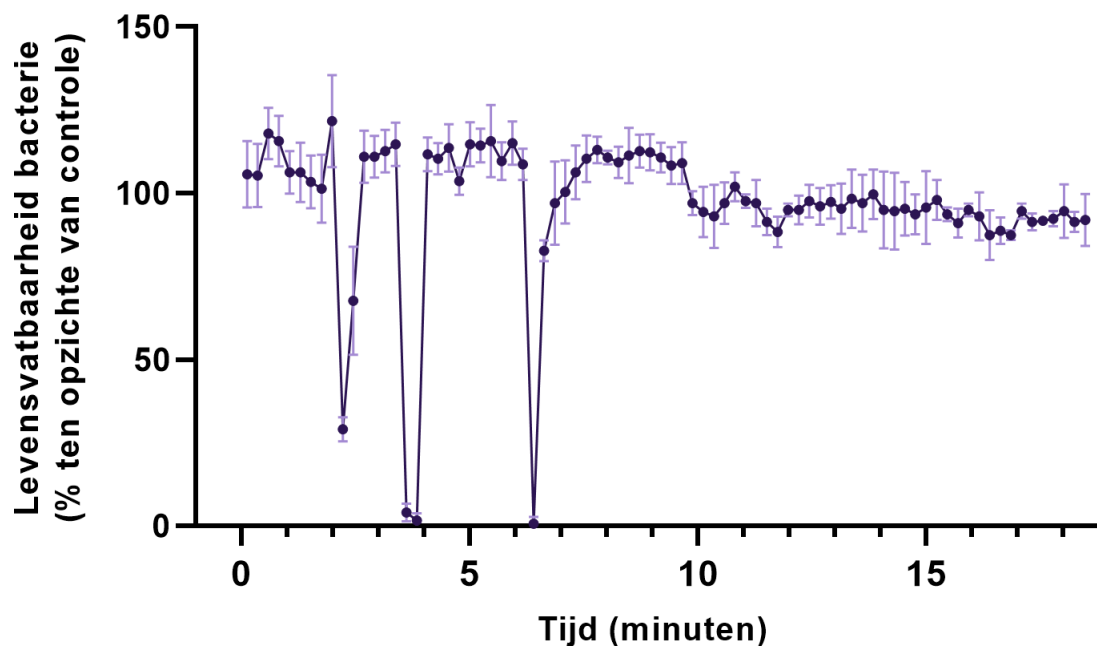
*Tim Jonkers (Vrije Universiteit Amsterdam), Tessa Pronk (KWR Water), Corine Houtman (Het Waterlaboratorium), Gerdien de Kloe (Aqualab Zuid), Bernard Bajema (Vitens), Timo Hamers (Vrije Universiteit Amsterdam) en Marja Lamoree (Vrije Universiteit Amsterdam)*

**In een recent georganiseerd webinar voor de watersector stond de techniek effect-directed analysis centraal. Genodigde sprekers vertelden over de inzet van biologische en chemische technieken om de waterkwaliteit te monitoren en ‘opkomende stoffen’ te identificeren. Onderwerpen in het programma varieerde van reeds geïmplementeerde screeningstechnieken tot aan recentelijk inzetbare ontwikkelingen uit de academische wereld. Afsluitend vond er een discussie plaats over het toegankelijk maken van EDA voor een breder publiek.**

Op 15 februari 2022 vond het webinar ‘Waterkwaliteit verbeteren met Effect-Gestuurde Analyse: Stand van de Wetenschap’ plaats, georganiseerd vanuit het project RoutinEDA van de Vrije Universiteit. Het doel van dit webinar was te illustreren hoe effect-directed analysis (EDA) kan bijdragen aan het oplossen van uitdagingen op het gebied van waterkwaliteit. Vijf genodigde sprekers – gelieerd aan waterbedrijven en de academische wereld – presenteerden over de inzet van effect-gebaseerde methoden (bioassays), chemische doelstoffenanalyse, suspect- en non-targetscreening, en recente succesvolle EDA-studies. De 92 deelnemers vertegenwoordigden onder meer zeventien waterschappen, vier universiteiten, zes waterlaboratoria en drie drinkwaterbedrijven.

### **Wat is EDA?**

Effect-directed analysis (EDA) is een techniek die biologische en chemische metingen combineert om ‘opkomende’ bioactieve stoffen te identificeren. Met behulp van vloeistofchromatografie worden componenten in een geconcentreerd watermonster gescheiden op basis van hun polariteit. Een gekoppelde fractiecollector verdeelt het gescheiden monster in een groot aantal fracties, waarop een specifieke bioassay wordt uitgevoerd. Een voorbeeld van een bioassay-chromatogram is weergegeven in afbeelding 1. Parallel hieraan wordt hetzelfde gescheiden monster chemisch gekarakteriseerd met behulp van een hogeresolutie-massaspectrometer. Iedere bioactieve fractie is gerelateerd aan een specifiek segment van het chemische chromatogram, waardoor het gemakkelijker wordt om de verantwoordelijke stof achter de bioassay-activiteit te achterhalen. Met behulp van de bioactieve fracties en suspect- en non-targetscreening wordt vervolgens getracht om tot nu toe onbekende stoffen te identificeren die tot gezondheidsrisico’s kunnen leiden voor mens en milieu.

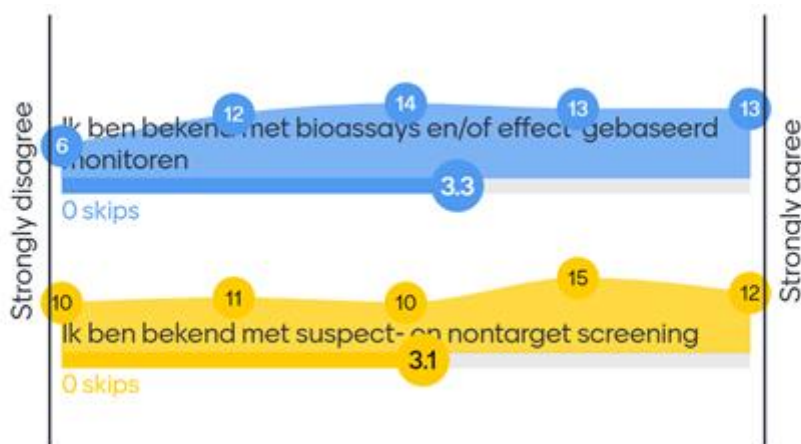


Afbeelding 1. Een bioassay-chromatogram waar ieder datapunt de bioassayrespons weergeeft na blootstelling aan een fractie, gebaseerd op data uit [1]. De levensvatbaarheid van de gebruikte bacteriestam *E. coli* FhuAT staat hier uitgedrukt tegen de chromatografische retentietijd. Afnames in het signaal wijzen op de aanwezigheid van antimicrobiële stoffen in desbetreffende fracties

### Programma webinar

Het webinar werd georganiseerd in het kader van het project RoutinEDA. RoutinEDA is ingebed in het CEC-partnership, een onderzoeksprogramma dat gefinancierd wordt door de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO), STOWA, TKI Watertechnologie en KWR. Het richt zich op de identificatie van opkomende stoffen in de watercyclus [2].

Voor aanvang van de presentaties werd de deelnemers gevraagd te reageren op een aantal stellingen en open vragen. De antwoorden gaven inzicht in de achtergrond van de deelnemers en hun (voor)kennis over EDA. Het merendeel van de respondenten gaf aan al bekend te zijn met de techniek EDA, terwijl EDA voor ruim een kwart (28%) nieuw was. De kennisverdeling over het gebruik van bioassays en effect-gebaseerd monitoren was vergelijkbaar met aanwezige kennis over suspect- en non-targetscreening (afbeelding 2). Daarnaast werd bij respondenten geïnformeerd naar hun werkveld. Veel deelnemers bleken betrokken bij onderzoek naar water(kwaliteit) (afbeelding 3).



Afbeelding 2. Schaalverdeling voor twee stellingen die belangrijk zijn in EDA: het gebruik van bioassays en van suspect- en nontargetscreening. Het aantal reacties staat uitgedrukt per stelling en schaal. De reacties en de afbeelding zijn verkregen met de software Mentimeter



Afbeelding 3. Wordenwolk als antwoord op de vraag ‘in welk werkveld bent u actief?’. Vaker ingevoerde begrippen zijn hier groter afgebeeld. Deze afbeelding is verkregen met de software Mentimeter

Het programma werd verzorgd door een vijftal sprekers: Tessa Pronk (KWR Water), Corine Houtman (Het Waterlaboratorium), Gardien de Kloe (Aqualab Zuid), Bernard Bajema (Vitens) en Tim Jonkers (Vrije Universiteit Amsterdam). Inhoudelijk verschoof het onderwerp van het monitoren van de waterkwaliteit met bioassays en chemische analyse, richting het gecombineerd gebruik van deze technieken in de toepassing van EDA met een aantal praktijkvoorbeelden.

### De combinatie van biologie en chemie

Tessa Pronk (KWR Water/Kennisimpuls Waterkwaliteit, Toxicologie) vertelde over het inbedden van bioassays voor het monitoren van de waterkwaliteit in de sleutelfactor toxiciteit 2 (SFT2). Bioassays hebben hier een aanvullende functie, naast metingen aan individuele chemicaliën. Bioassays (in het bioassay-spoor) meten de (mengsel)effecten van alle stoffen in water, waar chemische metingen (in het chemie-spoor) specifieke concentraties van een selectie van stoffen meten. Een samengestelde

set van bioassays – elk representatief voor een specifiek (toxisch) effect – wordt gebruikt om verschillende typen effecten in drinkwater, oppervlaktewater of afvalwater te meten. Op basis van dit resultaat wordt een van de vijf waterkwaliteitsklassen, op een kleurschaal van blauw tot rood, toegekend. Het bioassay-spoor is in SFT2 ingebed in het raamwerk van Driver, Pressure, Status, Impact, Respons (DPSIR). Dit raamwerk helpt niet alleen om via kleurklassen de status en impact van chemische vervuiling vast te stellen, maar biedt ook hulpmiddelen voor het achterhalen van oorzaken (drivers en pressures) en mogelijke maatregelen (respons). Alle hulpmiddelen zijn te vinden op de website van de SFT2 [3].

Met de tweede spreker, Corine Houtman (Het Waterlaboratorium), verschoof het onderwerp naar de combinatie van biologie en chemie. Het Waterlaboratorium (HWL) gebruikt een geïmplementeerd EDA-platform met een verscheidenheid aan bioassays om de sturende stoffen achter een bioassay-activiteit te achterhalen [4]. De opstelling en aanpak van HWL om EDA routinematig toe te passen is recentelijk gepubliceerd als H2O-vakartikel [4]. Op deze manier heeft het laboratorium aangetoond dat de stoffen androsteendion, testosteron en dihydrotestosteron bijdragen aan de androgene activiteit in influent en effluent van een Nederlandse rioolwaterzuivering. Verder werd stilgestaan bij de rol die EDA kan spelen voor waterschappen en waterlaboratoria. Dit lijkt situatieafhankelijk te zijn:

1. Wanneer geïnteresseerde partijen in het bezit zijn van een vloeistofchromatograaf en hogeresolutie-massaspectrometer, is de aanschaf van een fractiecollector (FractioMate) een relatief kleine investering. Wanneer bioassays niet intern worden uitgevoerd kunnen deze gemakkelijk worden uitbesteed. Het is bijvoorbeeld mogelijk om gefractioneerde platen gekoeld te bewaren, wat onder andere verzending mogelijk maakt. Een identificatieworkflow (suspect- en non-targetscreening) dient intern geïmplementeerd te worden.
2. Wanneer geïnteresseerden intern bioassays uitvoeren maar monsters niet chemisch kunnen karakteriseren, vraagt dit om een intensievere samenwerking. De uitkomsten van de bioassays bepalen namelijk de aanpak voor het identificeren van verantwoordelijke bioactieve stoffen.
3. Geïnteresseerden kunnen een EDA-studie volledig uitbesteden bij een laboratorium dat EDA-studies uitvoert.

### **Aanvullende chemische screeningstechnieken**

Gerdien de Kloe (Aqualab Zuid) sprak als volgende spreker over het gebruik van chemische screeningstechnieken om de waterkwaliteit te bepalen. Twee van de drie moederbedrijven van Aqualab Zuid gebruiken water uit de Maas om drinkwater van te maken. Met behulp van doelstofmethodes en suspectscreening wordt de kwaliteit van het Maaswater gemonitord. Tevens heeft Aqualab Zuid de wens om onderzoek te doen naar opkomende stoffen. Het laboratorium heeft in de afgelopen twee jaar veel chemische screeningsdata verzameld, gemeten in industrieel en huishoudelijk afvalwater, oppervlakte- en drinkwater. Vaak voorkomende chemische *features* (gemeten accurate massa's) in de Maas worden geannoteerd met behulp van de MassBank-spectrale bibliotheek en de CECscreen-lijst [5]. Hits worden geprioriteerd met de door Jonkers & Meijer et al. ontwikkelde TAQ-code [1]. Het aantreffen van deze features op andere locaties geeft een indicatie of een onbekende component een industriële, huishoudelijke of mogelijk natuurlijke afkomst heeft.

Met behulp van analytische standaarden is Aqualab Zuid bezig om de geprioriteerde onbekende componenten chemisch te confirmeren.

### **Recente EDA-studies uit de praktijk**

Met de laatste twee sprekers kwamen de biologische en chemische metingen verder samen, met voorbeelden van EDA-studies uit de praktijk.

Bernard Bajema (Vitens) vertelde hoe Vitens als drinkwaterbedrijf de taak heeft onderzoek te doen naar onbekende antropogene stoffen die de kwaliteit van het drinkwater kunnen bedreigen. Het Drinkwaterbesluit vraagt hiervoor een op risico gebaseerde aanpak. Non-targetscreening is een belangrijk middel in een risico-gebaseerd meetprogramma. Met het gebruik van non-targetscreening komen er veel onbekende stoffen aan het licht. Dit maakt het identificeren van deze onbekende stoffen tot een zeer omvangrijke klus. Vanuit het DOSSIER-Project, een samenwerking tussen Vitens, Deltares en de Vrije Universiteit Amsterdam (VU), is er een pilot-EDA-studie uitgevoerd. Hiervoor zijn watermonsters verkregen uit verschillende stadia van het zuiveringsproces. Met behulp van de gefractioneerde bioassayresultaten zijn er onbekende stoffen geprioriteerd, die vermoedelijk de lichtproductie remmen in bioluminescente *Aliivibrio fischeri*-bacteriën in de toegepaste bioassay. De huidige status van het onderzoek ligt bij het confirmeren van deze stoffen, wat nodig is om de toegekende identiteiten te bevestigen.

Als laatste spreker vertelde Tim Jonkers (Vrije Universiteit Amsterdam) over een EDA-studie gericht op de identificatie van antimicrobiële stoffen. Residuen van antibiotica zorgen voor nadelige milieueffecten en hebben mogelijk invloed op de resistentieontwikkeling van bacteriën. Om zulke antimicrobiële stoffen te identificeren is er een EDA-studie uitgevoerd op water, verkregen rondom waterzuiveringen; influent, effluent en oppervlaktewater. De antimicrobiële activiteit van deze monsters is bepaald met een antibiotica-bioassay, waarna alle monsters zijn gefractioneerd en chemisch zijn gekarakteriseerd. Met behulp van de resulterende bioassay-chromatogrammen is een aantal geannoteerde stoffen geprioriteerd, waaraan een deel van de activiteit ontleend kan worden. Onder de kandidaten bevond zich onder andere een metaboliet van een antibioticum, waarvan de biologische activiteit geconfirmeerd is. Recente ontwikkelingen in software, zoals het retentietijd-platform en MetFrag, leveren een verdere bijdrage in het prioriteren van belangrijke onbekende stoffen. Het retentietijd-platform schat een retentietijd op basis van de structuur van de geannoteerde stof en vergelijkt dit met de gemeten retentietijd. MetFrag simuleert het fragmentatiepatroon van een geannoteerde stof en vergelijkt dit met het gemeten fragmentatiespectrum van het feature (de gemeten accurate massa). Met het resultaat van beide tools kunnen vals-positieve stoffen sneller worden uitgesloten.

### **Discussie**

In de daaropvolgende open discussie konden deelnemers onderwerpen ter tafel brengen en vragen stellen. Zo werd er onder andere gesproken over het belang van het concentreren van watermonsters binnen EDA-studies. In de concentratiestap zorgt het gebruik van een kolom (zoals vastefase-extractie of passieve bemonstering) enerzijds voor specificatie binnen het chemisch domein. Anderzijds verhoogt het de gevoeligheid van zowel de biologische als chemische analyses en helpt het stoffen met heel lage concentraties in beeld te brengen. Ook werd stilgestaan bij het toegankelijk maken van EDA voor andere laboratoria. Zo werd deelnemers gevraagd naar mogelijke

knelpunten in de implementatie van EDA. Terugkerende punten waren de duur van EDA-studies en de bijbehorende kosten. Er vinden (binnen en buiten de academische wereld) volop ontwikkelingen plaats in het sneller en accurater identificeren van onbekende stoffen. Ook technische verbeteringen in het proces, zoals gebruik van de ontwikkelde fractiecollector FractioMate, dragen bij aan een kortere looptijd van deze studies. Met deze ontwikkelingen wordt de doorlooptijd van EDA-studies korter en goedkoper, wat EDA als techniek toegankelijker maakt voor een breder publiek.

### Verantwoording

Dit onderzoek wordt uitgevoerd in het kader van het programma 'Contaminants of Emerging Concern in the Watercycle', gefinancierd door het NWO-domein Toegepaste Technische Wetenschappen (TTW) onder het subsidienummer 15747 (RoutinEDA), in samenwerking met STOWA, TKI Watertechnologie en KWR. De auteurs verklaren dat er geen sprake is van belangenverstrengeling.

### Referenties

1. Jonkers, T.J.H. & Meijer, J. et al. (2022). 'High-Performance Data Processing Workflow Incorporating Effect-Directed Analysis for Feature Prioritization in Suspect and Nontarget Screening'. *Environmental Science & Technology* 56 (3), 1639-1651. DOI: 10.1021/acs.est.1c04168
2. <https://www.cec-partnership.nl/web/index.php/projects/routineda>, geraadpleegd op 16 februari 2022
3. <https://kiwk-tox.netlify.app/nl/bioassay-tool/>
4. Brekelmans, S., Sloopweg, T. Houtman, C. (2021). 'Effect Directed Analysis achterhaalt verantwoordelijke stoffen voor bioassayrespons'. *H2O-Online*, 7 oktober 2021.
5. Meijer, J. et al. (2021). 'An annotation database for chemicals of emerging concern in exposome research'. *Environment International*, 152, 106511.