

Sleutelfactor Toxiciteit



Achtergronddocument Bemonstering en Monstervoorbewerking voor Effectmonitoring met Bioassays

Achtergrond document beschikbare kennis

Versie: 30 oktober 2021

Auteurs:

Milo de Baat (KWR)

Sanne van den Berg (WEnR)

Contact: milo.de.baat@kwrwater.nl

Datum: 30 oktober 2021

Bij verwijzing naar deze notitie graag de volgende gegevens gebruiken:

De Baat, M en Van den Berg, S.J.P. (2021). Achtergronddocument Bemonstering en Monstervoorbewerking voor Effectmonitoring met Bioassays. Achtergronddocument beschikbare kennis bij de sleutelfactor Toxiciteit. Kennis Impuls Water Kwaliteit.

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	2
Samenvatting.....	3
1. Inleiding.....	5
2. Keuzehulp bij bemonstering en monstervoorbewerking	6
3. Bemonstering strategieën	8
4. Opties voor monstervoorbewerking	10
4.1. Monsterbehoud en -opslag	10
4.2. Monsterfiltratie	10
4.3. Testen van onbewerkte watermonsters.....	12
5. Monsterextractiemethoden	13
5.1. Vaste-fase extractie (SPE).....	13
5.2. Passive sampling	13
5.3. Afvangen van vluchtige stoffen.....	14
6. Vaste-fase extractie (SPE) toegepast.....	15
6.1. SPE sorbentia.....	15
6.2. SPE procedure	15
6.3. Effect-recovery van SPE	17
7. Toedienen van monsters aan bioassays	18
Colofon.....	19
Referenties.....	20

Samenvatting

Bioassays zijn gevoelige screeninginstrumenten waarmee complexe mengsels van microverontreinigingen in watermonsters opgespoord kunnen worden, maar microverontreinigingen zijn vaak in lage concentraties aanwezig, vooral in drinkwater en (schoon) oppervlaktewater. Daarom moeten de monsters worden geconcentreerd voordat ze aan bioanalyse worden onderworpen. In dit achtergronddocument wordt een overzicht gegeven van vaak toegepaste bemonsteringsstrategieën en monstervoorbewerkingsopties en wordt een beslisboom voorgesteld om gebruikers te helpen bij het selecteren van geschikte bemonsteringsmethoden.

De bemonsteringsstrategie is afhankelijk van het doel van de bemonsteringscampagne en van de context van het monster. Als het doel van een bemonsteringscampagne bijvoorbeeld is de productkwaliteit van een drinkwaterbehandelingsinstallatie te beoordelen, om het effect in het behandelde productwater te vergelijken met een effect-sigitaalwaarde (ESW), dan hoeft alleen het productwater te worden verzameld. Als inzicht in kritische processen verkregen dient te worden, kan het nodig zijn monsters te nemen tijdens verschillende stappen van een behandelingsketen. Het type en het vereiste volume zullen afhangen van het monster; voor instromend en uitstromend afvalwater worden samengestelde monsters en kleinere volumes aanbevolen. Voor drinkwater en gezuiverd water zijn steekmonsters en grotere volumes daarentegen meer geschikt.

Zodra een watermonster is genomen, moet een aantal beslissingen over de voorbehandeling van het monster worden genomen. Monsters moeten bijvoorbeeld binnen 48 uur na de verzameling worden verwerkt, en in sommige gevallen zorgt aanzuren van de monsters voor een langere houdbaarheid. Hoewel in veel studies de monsters worden gefiltreerd voordat ze worden geconcentreerd, zijn er in de literatuur grote verschillen wat betreft het gebruikte type filter en de poriegrootte van het filter. Het wordt aangeraden watermonsters met een hoge troebelheid (5 NTU of meer) te filtreren met glasvezelfilters met een poriegrootte tussen 0,7 en 1,5 μm .

Gebruikelijke extractiemethoden zijn vaste fase extractie (SPE) en passieve bemonstering (passive sampling), waarbij SPE de meest gebruikte methode is om microverontreinigingen te concentreren vóór de bioanalyse. Het gebruik van onbehandelde watermonsters kan in bepaalde gevallen gewenst zijn maar gaat gepaard met onzekerheden, aangezien het effect van organische microverontreinigingen niet kan worden onderscheiden van dat van andere componenten in het water. In de literatuur zijn verschillende SPE-sorbentia gebruikt, en het is belangrijk een extractiemethode zonder blanco-effecten te kiezen, aangezien bij bioassays geen onderscheid kan worden gemaakt tussen effecten van een watermonster en effecten van onzuiverheden die het gevolg zijn van de verwerking van het monster. Enkele studies hebben de recovery van effecten door SPE geëvalueerd.

Aangezien er een aantal beslissingen moeten worden genomen met betrekking tot monstername, voorbehandeling en concentrering, is er een keuzehulp ontwikkeld om gebruikers door de belangrijkste stappen te leiden. Als eenmaal de definitieve voorbehandelings- en verwerkingsmethoden voor de monsters zijn gekozen, is het belangrijk dat dezelfde aanpak wordt gevolgd voor alle monsters die men wilt vergelijken. Het is belangrijk op te merken dat de informatie die wordt gebruikt ter ondersteuning van de beslissingen over monsterverwerking vaak gebaseerd is op gebruikerservaring en chemische analyseprotocollen, en dat er maar weinig studies

zijn waarin het effect van verschillende monsterverwerkingsopties op het biologische effect is onderzocht. Een van de minst gestandaardiseerde, maar zeer belangrijke voorbehandelingsstappen is monsterfiltratie. Daarvoor, maar bijvoorbeeld ook voor de beschreven passieve sampling technieken, is verder experimenteel werk nodig om de in dit achtergronddocument voorgestelde aanpak te valideren.

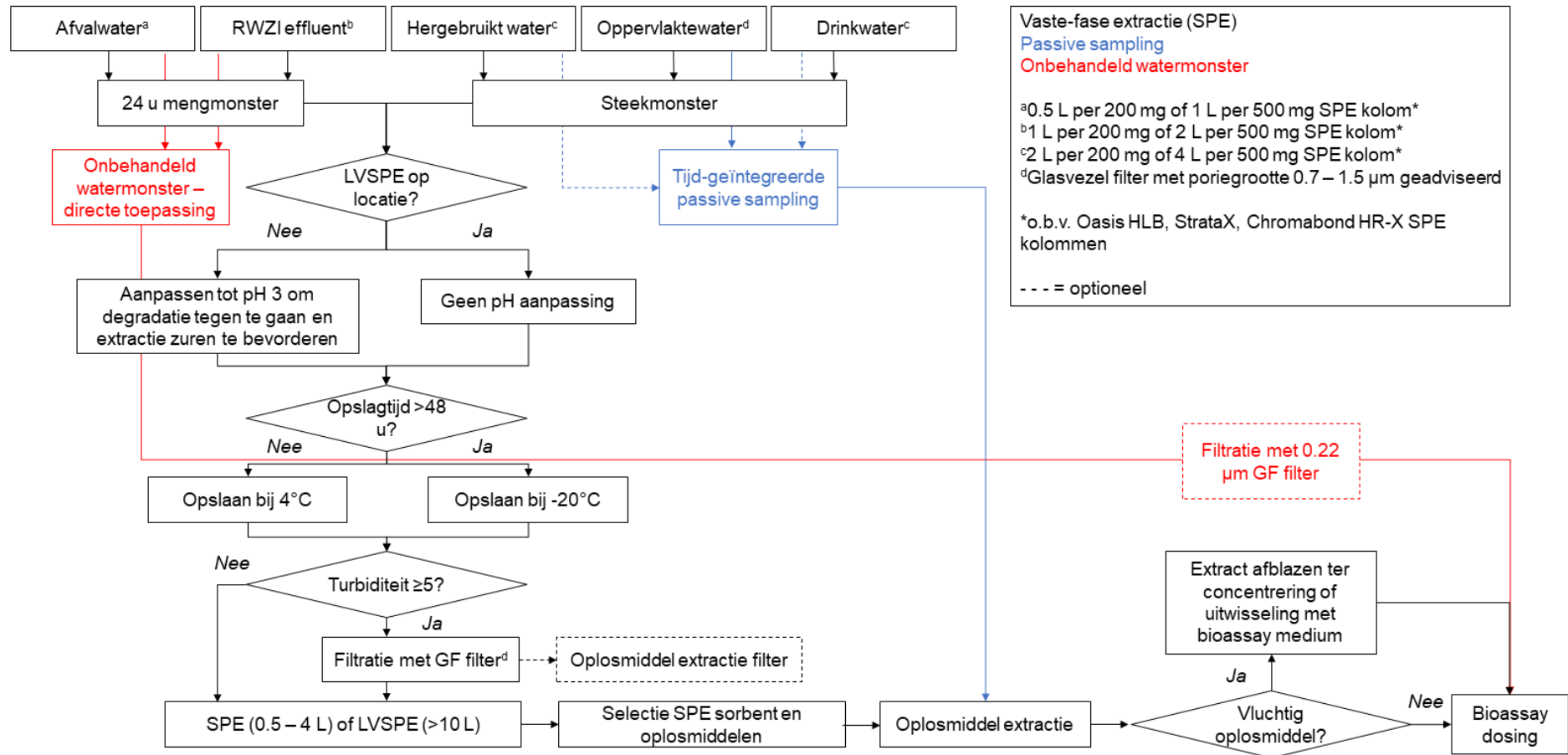
1. Inleiding

Er is steeds meer belangstelling voor de toepassing van effectgebaseerde methoden (d.w.z. *in vitro* bioassays en op wellplaten gebaseerde *in vivo* assays) voor waterkwaliteitsmonitoring (Brack et al., 2019). Om ervoor te zorgen dat bioassay resultaten zinvol zijn, is het echter belangrijk om een geschikte bemonsteringsstrategie te kiezen en geschikte voorbehandelings- en verwerkingsmethoden voor monsters te gebruiken. Hoewel bioassays gevoelige screeninginstrumenten zijn om complexe mengsels van organische microverontreinigingen in watermonsters op te sporen, zijn microverontreinigingen vaak in lage concentraties (bijv. nanogram per liter) aanwezig in drinkwater en schoon oppervlaktewater (bijv. Glassmeyer et al., 2017; Troger et al., 2018), zodat watermonsters soms tot 100 keer moeten worden geconcentreerd voordat een effect kan worden gedetecteerd. *In vitro* assays richten zich doorgaans op complexe mengsels van organische microverontreinigende stoffen, maar niet op anorganische stoffen en metalen, die uitgebreid kunnen worden geanalyseerd met chemische methoden. Daarom dienen extractiemethoden naast het concentreren ook om de organische microverontreinigingen te scheiden van de matrix, anorganische stoffen en metalen in een watermonster. Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat twee methoden het vaakst worden gebruikt om organische microverontreinigingen te concentreren en te isoleren uit watermonsters: vaste fase-extractie ('*solid phase extraction*' SPE) en passieve bemonstering (passive sampling). In dit achtergronddocument wordt een keuzehulp aangeboden om gebruikers te helpen bij het selecteren van geschikte bemonsteringsmethoden. Vervolgens wordt een overzicht gegeven van vaak toegepaste bemonsteringsstrategieën en monstervoorbereidingsopties, inclusief voorbehandeling en extractie van monsters, en wordt uitgeled waarop de keuzes in de keuzehulp zijn gebaseerd. De nadruk wordt gelegd op de huidige methoden, hoewel moet worden opgemerkt dat er voortdurend nieuwe monstervoorbehandelings- en extractiemethoden worden ontwikkeld.

2. Keuzehulp bij bemonstering en monstervoorbewerking

Zoals hierboven besproken, moeten er een aantal beslissingen worden genomen inzake monsterneming, voorbehandeling en extractie. Daarom is een stroomschema voor de besluitvorming (figuur 1) ontwikkeld om de gebruikers door enkele van de belangrijkste beslissingen te leiden, waarbij in het verslag nadere informatie over elke stap wordt verstrekt. Als de definitieve voorbehandelings- en verwerkingsmethoden voor de monsters zijn gekozen, moet dezelfde aanpak worden gevolgd voor alle monsters die men wil vergelijken. Het is niet mogelijk om veranderingen in de loop van de tijd of verschillen tussen locaties echt te vergelijken als verschillende voorbehandelings- en -verwerkingsmethoden worden gebruikt, aangezien dit van invloed kan zijn op het chemische mengsel in het uiteindelijke extract. Voorts moeten, waar mogelijk, dezelfde bioassay- en chemische-analysevoorbehandelings- en monsterbehandelingsmethoden worden gebruikt om de resultaten beter te kunnen vergelijken.

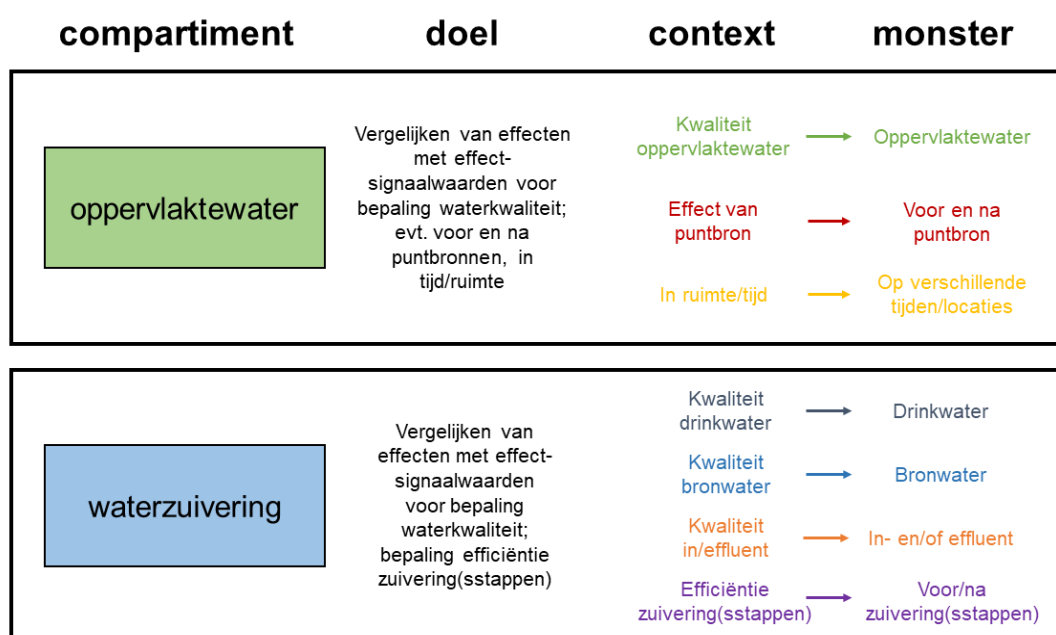
Zoals hierboven is uiteengezet, is de informatie die wordt gebruikt om beslissingen over voorbehandeling en verwerking van monsters te onderbouwen, vaak gebaseerd op ervaringen van gebruikers, en zijn er maar weinig studies waarin het effect van verschillende opties voor monsterverwerking op het biologische effect is onderzocht. De meeste van deze studies zijn gericht op oestrogene activiteit, terwijl er weinig bekend is over andere eindpunten. Verder is een deel van het advies gebaseerd op chemische analyseprotocollen, in plaats van specifiek te zijn voor bioassays. Een van de minst gestandaardiseerde, maar zeer belangrijke stappen in de voorbehandeling is de filtratie van monsters. In de literatuur wordt een breed scala van filterporiegrootten gebruikt, wat van invloed is op de hoeveelheid zwevende deeltjes die op de SPE-patroon wordt tegengehouden. De beslissing over welke filtergrootte moet worden gekozen of over het al dan niet filtreren is, voor zover nu bekend, echter niet gebaseerd op wetenschappelijke studies, maar op gebruikerservaringen. In dit achtergronddocument stellen we een uniforme aanpak voor waarbij monsters met een troebelheid van meer dan 5 NTU worden gefilterd met glasvezelfilters, hoewel verder experimenteel werk nodig is om deze aanpak te valideren.



Figuur 1. Stroomschema voor bemonstering en monstervoorbewerking voor effectmonitoring met bioassays.

3. Bemonstering strategieën

De bemonsteringsstrategie zal afhangen van de doelstellingen en de context (Figuur 2). Indien een bemonsteringscampagne tot doel heeft de productkwaliteit van een drinkwaterbehandelingsinstallatie te beoordelen, met als doel het effect in het eindwater te vergelijken met een effect signaalwaarde (ESW), hoeft alleen het productwater te worden verzameld (met passende blanco- en controlemonsters). Daarentegen zijn zowel bron- als productwater nodig als het de bedoeling is de efficiëntie van het zuiveringsproces te evalueren. Er kunnen ook monsters worden genomen na tussenstappen in het behandelingsproces, zoals na geavanceerde oxidatie of desinfectie, als het doel van de bemonsteringscampagne is inzicht te krijgen in kritische processen. Voor afvalwater worden verzamelmonsters aanbevolen om de variatie over de dag te integreren die voor sommige microverontreinigingen is waargenomen (Nelson et al., 2011; Petrie et al., 2017), waarbij in veel studies 24-uurs samengestelde monsters van influent en effluent worden verzameld (bijv. Korner et al., 2001; Bicchi et al., 2009; Macova et al., 2010; Reungoat et al., 2010; Jalova et al., 2013; Bain et al., 2014; Roberts et al., 2015). Steekmonsters zijn geschikt voor het verzamelen van drinkwater of behandeld water als er een stabiele kwaliteit in de tijd wordt aangetoond. Watermonsters moeten worden verzameld in met oplosmiddel gewassen en of uitgebrande (500°C, 2u) amberkleurige glazen flessen met doppen die geen polymeervoering bevatten, waarbij de flessen op ijs en in het donker moeten worden bewaard totdat de monsters zo snel mogelijk naar het laboratorium worden teruggestuurd voor verdere verwerking. Veld- en procesblanco's moeten in elke bemonsteringsstrategie worden opgenomen.



Figuur 2. Voorbeelden van verschillende doeleinden van de bemonsteringscampagne voor oppervlaktewater en waterzuivering met de voor elk doel vereiste monsters.

Het vereiste te verzamelen volume water zal afhangen van het verwachte niveau van chemische verontreiniging en dus van de noodzaak tot concentreren, waarbij voor onbehandeld afvalwater minder monster nodig is en voor drinkwater een groter volume. Voor SPE blijkt uit eerdere ervaringen dat een standaard SPE-patroon van 200 mg (6 cc) 0,5 L influent afvalwater, 1 L effluent afvalwater of oppervlaktewater en

2 L drinkwater of schoon oppervlaktewater kan concentreren. Het dubbele volume kan worden toegepast op grotere SPE-sorbentmassa's (bv. 500 mg patronen). Uitgaande van de volumes die worden toegepast op een SPE-patroon van 200 mg en een uiteindelijke hoeveelheid extract van 0,5 ml, komt dit neer op een concentratiefactor (EF) van 1000 voor instromend afvalwater, 2000 voor uitstromend afvalwater of oppervlaktewater en 4000 voor drinkwater of schoon oppervlaktewater. Uitgaande van een bioassay-verdunningsfactor (DF) van 100 (1% oplosmiddel) tot 1000 (0,1% oplosmiddel) resulteert dit in een maximale relatieve concentratiefactor ('*relative enrichment factor*' REF) van 1 tot 10 voor influent van afvalwater, 2 tot 20 voor effluent van afvalwater of oppervlaktewater en 4 tot 40 voor drinkwater of schoon oppervlaktewater. Het aantal bioassay metingen dat met één extract kan worden uitgevoerd, hangt af van het aantal geplande replica's en de dosering van het extract, maar meestal zijn slechts kleine hoeveelheden extract (microliter) nodig voor bepalingen op 96- en 384-wellplaten, zodat vaak een aantal verschillende bioassays kan worden uitgevoerd.

Als hogere REFs nodig zijn, kunnen monsters worden geëxtraheerd op meerdere SPE-cartridges en worden gecombineerd tot één definitief extract (Escher et al., 2014; Neale et al., 2017). Een alternatieve aanpak is het gebruik van groot volume SPE (LVSPE), dat is toegepast voor verrijkingen tussen 6 L (influent) tot 500 L (oppervlaktewater) (Neale et al., 2015; Valitalo et al., 2017). LVSPE is in vergelijking met SPE in een beperkt aantal studies toegepast en is voornamelijk toegepast op oppervlaktewater en RWZI-effluent (bijv. König et al., 2017; Tousova et al., 2017). LVSPE maakt bemonstering ter plaatse mogelijk, maar vereist ook meer apparatuur dan andere monsterextractiemethoden, wat wijdverspreid gebruik ervan beperkt.

Terwijl de conventionele SPE-volumes worden aanbevolen op basis van jarenlange ervaring uit de literatuur, onderzochten Simon et al. (2019) het effect van het monstervolume op de recovery van effecten, met 0,5 en 2 L afvalwater effluent en 1 en 4 L oppervlaktewater gespiked met een mengsel van vier oestrogene verbindingen en 11 pesticiden en verrijkt met SPE met LiChrolut EN/RP-18 (300 mg sorbent). De extracten werden geanalyseerd in tests die wezen op oestrogene activiteit (ER α CALUX), remming van fotosysteem II en algengroei (gecombineerde algentest) en bacteriële toxiciteit met *Aliivibrio fischeri*. De gemiddelde activiteit in de grote volume-extracten lag tussen 79 en 104% van de activiteit in de kleine volume-extracten, waaruit blijkt dat het monstervolume geen significante invloed had op de recovery.

Daarom zouden de in dit achtergronddocument aanbevolen monstervolumes geen negatief effect moeten hebben op de recovery, hoewel moet worden opgemerkt dat sommige chemische stoffen, zoals sterk polaire chemische stoffen, mogelijk niet goed met conventionele SPE worden teruggevonden en dat idealiter recovery experimenten moeten worden uitgevoerd met verrijkte monsters tijdens de ontwikkeling en validatie van nieuwe methodes.

4. Opties voor monstervoorbewerking

Zodra een geschikt watermonster is verzameld, moeten er verschillende beslissingen worden genomen over de voorbehandeling van het monster, waaronder de opslagtijd en de filtratie van het monster. Deze sectie bespreekt veel voorkomende opties voor monstervoorbehandeling, gebaseerd op een review van de wetenschappelijke literatuur, met een focus op SPE als de meest voorkomende optie voor het concentreren van monster. Er moet echter worden opgemerkt dat de meeste voorbeelden zich hebben gericht op oestrogene activiteit, omdat dit het meest bestudeerde eindpunt is (bijv. Jarošová et al., 2014; Konemann et al., 2018), met weinig informatie over het effect van monsteropslag en voorbehandeling op andere relevante eindpunten.

4.1. Monsterbehoud en -opslag

Bijna de helft van de meegenomen wetenschappelijke studies die SPE toepasten, pasten de pH van het watermonster aan tot een zure pH met behulp van geconcentreerd zuur, zoals zoutzuur of zwavelzuur. Een klein deel van de studies hadden geen pH-aanpassing of pasten aan tot een neutrale pH, terwijl de rest van de studies geen informatie verstrekten over de pH van het monster. Een zure pH kan de microbiële activiteit in het monster verminderen, die mogelijk de biologische afbraak of biotransformatie van microverontreinigingen kan veroorzaken. Verlaging van de pH kan ook de extractie van zwakke zuren verbeteren, met een verbeterde recovery van een farmaceutische cocktail in een bioluminescentie inhibitie assay bij pH 3 vergeleken met pH 7 waargenomen voor drie verschillende SPE sorbents (Escher et al., 2005). Sauer et al. (2018) vonden daarentegen geen verschil in androgene of anti-androgene activiteit in afvalwater influent in duplo monsters bij respectievelijk pH 3 en pH 7.4. De monsters werden geëxtraheerd met C18 SPE disks. Naast pH-aanpassing is in een klein aantal monsters koper(II)sulfaat-pentahydraat (10 mg per liter) (Conley et al., 2017a) of natriumazide (1 g per liter) (Mehinto et al., 2015) gebruikt voor monsterconservering.

Na verzameling worden watermonsters gewoonlijk niet langer dan 48 uur bij 4°C bewaard voor extractie (bijv. Aerni et al., 2004; Cargouet et al., 2004; Fang et al., 2012; Daniels et al., 2018). Als alternatief kunnen watermonsters worden ingevroren om ze voor een langere periode te bewaren voorafgaand aan de extractie (Konemann et al., 2018). Jarošová et al. (2014) onderzochten het effect van de opslagtijd van monsters voorafgaand aan extractie op de oestrogene activiteit in afvalwater effluent, met gelijke monsters die 48 uur en 45 dagen na verzameling werden geëxtraheerd (opgeslagen bij 4°C voorafgaand aan extractie). Van de zeven monsters verdubbelde de oestrogene activiteit ten minste in twee van de monsters, maar over het algemeen was het verschil in effect klein (bijv. 0,7 ng/L na 48 uur en 1,7 ng/L na 45 dagen).

4.2. Monsterfiltratie

Ongeveer 70% van de onderzochte studies die SPE toepasten, filterden de monsters voorafgaand aan de SPE, waarbij glasvezelfilters het meest werden gebruikt. Glasvezelfilters bleken eerder slechts verwaarloosbare hoeveelheden oestrogenen te sorberen, vergeleken met celluloseacetaat- en nylonfilters, waarbij laatstgenoemde een significante fractie oestrogenen uit de oplossing bleken te adsorberen (Walker en Watson, 2010). De poriegrootte van het filter (d.w.z. de deeltjesgrootte die met 98% doeltreffendheid wordt tegengehouden) die in de literatuur wordt gebruikt, varieert sterk van 0,1 tot 11 µm, waarbij in de meeste studies filters met een

poriegrootte van 0,7 tot 2 μm werden gebruikt. In verscheidene studies werd de poriegrootte van het filter niet gerapporteerd.

De Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) beveelt monsterextractiemethoden aan die het gehele watermonster vastleggen, wat zowel de opgeloste als de gesuspendeerde deeltjesfasen omvat (Europese Commissie, 2009). De zwevende deeltjes die door monsterfiltratie worden opgevangen, worden vaak weggegooid, maar verschillende studies hebben aanzienlijke biologische activiteit in verband met zwevende deeltjes aangetoond (bv. Legler et al., 2003; Hamers et al., 2015; Schulze et al., 2015). Dagnino et al. (2010) evalueerden bijvoorbeeld de oestrogeen- en arylkoolwaterstofreceptor (AhR)-activiteit in zowel de opgeloste als de deeltjesfase van drie afvalwaterzuiveringsinstallaties (AWZI's), waarbij beide fasen bijdroegen aan de oestrogeen- en AhR-belasting die door de installaties werd geloosd. Een hogere fractie van AhR-activiteit werd gevonden op zwevende deeltjes (Dagnino et al., 2010). Evenzo vonden Wolz et al. (2008) dat zwevende deeltjes uit de Neckar-rivier AhR-gemedieerde activiteit in de ethoxyresorufine-O-deethylase (EROD)-test induceerde, terwijl de overeenkomstige geëxtraheerde watermonsters geen effect hadden. Deze studies suggereren dat het belangrijk is zwevende deeltjes in aanmerking te nemen om een beter inzicht te krijgen in de bioactiviteit, maar de beslissing om ze te verzamelen zal afhangen van de doelstellingen van de bemonsteringscampagne en de bestudeerde eindpunten, waarbij zwevende deeltjes waarschijnlijk belangrijk zijn voor specifieke toxiciteit, activering van AhR en binding aan de peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR).

Als het de bedoeling is het volledige watermonster op te vangen, zijn de opties om niet te filteren vóór de SPE of om te filteren vóór de SPE en de opgevangen zwevende deeltjes afzonderlijk te extraheren met oplosmiddelen (Ademollo et al., 2012). Sommige studies hebben alleen monsters gefilterd waarvan werd verwacht dat ze de SPE-patroon zouden blokkeren vanwege het hoge deeltjesgehalte, zoals afvalwater influent of rivierwater (Xiao et al., 2016; Gehrmann et al., 2018). Evenzo wordt in veel studies waarin drinkwater wordt geëvalueerd, geen filtratiestap toegepast (bijv. Van Zijl et al., 2017; Hebert et al., 2018; Valcarcel et al., 2018). Verder vonden Konemann et al. (2018) geen significant verschil in oestrogeendichtheid voor gefilterde en ongefilterde oppervlaktewatermonsters. Als richtsnoer voor het al dan niet filteren wordt in US EPA Method 1694 (Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS) aanbevolen watermonsters die zichtbare deeltjes bevatten, te filteren vóór de SPE (US EPA, 2007). Watermonsters met een troebelheid van 5 nephelometrische troebelingsseenheden (NTU, meestal gebruikt in de VS) of vergelijkbare Formazin Nephelometric Units (FNU, meestal gebruikt in Europa) zullen er visueel licht melkachtig of troebel uitzien, terwijl kristalhelder water meestal een troebelheid van minder dan 1 NTU heeft, waarbij de troebelheid alleen wordt gedetecteerd door instrumentele analyse (NHMRC & NRMCC, 2011). Bijgevolg moeten watermonsters met een troebelheid van 5 NTU of meer worden gefilterd vóór SPE. Over het algemeen is de troebelheid van drinkwater lager dan 1 NTU, en is de troebelheid van secundair afvalwater over het algemeen lager dan 2 NTU, maar dat kan toenemen als het slib slecht bezinkt. De troebelheid van rivierwater kan sterk variëren, terwijl de troebelheid van meren doorgaans stabiel is. Zo varieerde de troebelheid van behandeld drinkwater uit Parijs van 0,02 tot 0,04 NTU, terwijl het water dat deze zuiveringen voedt varieerde van 2 tot 14,3 NTU (Neale et al., 2020). Verder varieerde de troebelheid van Canadees oppervlaktewater van 0,5 tot 50 NTU (Cantwell en Hofmann, 2011).

Op basis van de lage sorptiecapaciteit worden glasvezelfilters aanbevolen voor de filtratie van monsters met een troebelingsgraad van 5 NTU of meer. Zoals hierboven

besproken, wordt in de literatuur een breed scala aan filterporiegroottes gebruikt, waarbij glasvezelfilters tussen 0,7 en 1,5 μm worden aanbevolen voor filtratie voorafgaand aan SPE voor chemische analyse (Internationale Organisatie voor Normalisatie, 1997; US EPA, 2007; Furlong et al., 2008).

4.3. Testen van onbewerkte watermonsters

Maar weinig studies hebben onbewerkte watermonsters geanalyseerd met gist-reportergen- en zoogdier-reportergen-assays (bijv. Niss et al., 2018; Abbas et al., 2019; Brettschneider et al., 2019) of algen (De Baat et al., 2018). Hiermee worden alle componenten in het water meegenomen, dus naast organische microverontreinigingen ook zouten, metalen en andere anorganische stoffen. Bijgevolg kan het effect van organische microverontreinigingen niet worden onderscheiden van dat van andere componenten in het water. Deze aanpak wordt gebruikt voor afvalwatermonsters, maar de detectie van een effect in een schoner watermonster, zoals behandeld afvalwater, drinkwater en oppervlaktewater is zeldzaam. Als minimale voorbehandeling voor het testen van onbewerkte watermonsters moet het water worden gefilterd zoals hierboven beschreven om eventuele deeltjes te verwijderen. Voor op zoogdiercellen gebaseerde bioassays is het ook belangrijk om het monster steriel te filteren met behulp van een filter met een poriegrootte van 0,22 μm (Niss et al., 2018).

Aangezien de ESFT2 gericht is op het effect van mensels van (organische) microverontreinigingen en het toepassen van bioassays op drinkwater en oppervlaktewater, is het analyseren van onbewerkte watermonsters in bioassays minder van toepassing en zal het volgende deel zich richten op veel toegepaste monsterextractiemethoden.

5. Monsterextractiemethoden

5.1. Vaste-fase extractie (SPE)

SPE is de meest gebruikte methode om microverontreinigingen uit water te concentreren voorafgaand aan bioanalyse, waarbij 89% van de hier geraadpleegde studies SPE toepast. SPE-patronen of -discs bevatten een sorptiemiddel dat de stoffen van belang (bijv. organische microverontreinigingen) vasthoudt, terwijl andere componenten die in het water aanwezig zijn, zoals zouten en andere anorganische stoffen, door het patroon of de schijf passeren, waardoor de matrix wordt vereenvoudigd (Poole, 2003). De geadsorbeerde stoffen kunnen vervolgens worden geëluëerd met oplosmiddelen, waardoor een geconcentreerd extract ontstaat dat in bioassays kan worden gebruikt. SPE heeft een aantal voordelen, waaronder een goede recovery van een breed scala stoffen en de mogelijkheid om te worden geautomatiseerd, hoewel de patronen kunnen verstopen bij monsters met een hoog gehalte aan deeltjes (Ademollo et al., 2012). Deze tekortkoming kan echter grotendeels voorkomen worden door de hier aangeraden filtratiestap vóór er over wordt gegaan tot SPE. Gezien het wijdverbreide gebruik van SPE, wordt in hoofdstuk 5 meer informatie gegeven over SPE-sorbentia en extractieprocedures.

5.2. Passive sampling

Minder dan 10% van de onderzochte studies paste passive sampling toe (bijv. Creusot et al., 2014; van der Oost et al., 2017a&b; Tousova et al., 2019; De Baat et al., 2019 & 2020), waarbij de meeste studies zich richtten op oppervlaktewater. Passive samplers verzamelen microverontreinigingen uit het watermilieu over een langere periode en maken chemische en bioassay-analyse van zeer lage stofconcentraties mogelijk. Er moet echter rekening worden gehouden met onzekerheden met betrekking tot het volume van het bemonsterde water, en parameters zoals temperatuur en stroomsnelheid van invloed zijn op de opname van chemische stoffen in de sampler (Novak et al., 2018). Verder kan de samenstelling van het chemische mengsel dat wordt opgenomen verschillen van het chemische mengsel in het water, aangezien verschillende stoffen verschillende opnamesnelheden in de samplers kunnen hebben. In de literatuur is een aantal verschillende soorten passive samplers toegepast, waaronder siliconenrubber, Speedisk/Empore-schijven en polaire organische chemische integratieve samplers (POCIS), om chemicaliën met verschillende hydrofobiciteit te bemonsteren. Zo werd een verhoogde biologische activiteit in extracten van Empore-schijven gevonden in vergelijking met siliconenrubber (Novak et al., 2018), terwijl Hamers et al. (2018) typisch een groter effect waarnamen in Speedisk-monsters, die styreen-divinylbenzeen sorptiemiddel bevatten, in vergelijking met siliconenrubber (SR). Ook De Baat et al. (2020) vonden sterkere effecten in polaire POCIS extracten dan in apolaire SR extracten genomen op dezelfde locaties. Op basis van de chemische stoffen die door verschillende passieve samplers werden geëxtraheerd en vergelijkend veldonderzoek, pasten Van der Oost et al. (2017b) niet-polaire siliconenrubberextracten toe op assays die indicatief zijn voor genotoxiciteit (p53) activering van AhR, oxidatieve stressrespons en pregnane X-receptor (PXR), terwijl polaire POCIS-extracten werden getest in assays die indicatief zijn voor hormoonreceptor gemedieerde effecten en antibiotica activiteiten. Deze strategie werd nationaal toegepast door De Baat et al. (2019, 2020) en omvat naast de algemene ook specifieke eindpunten die voor de controle van de waterkwaliteit worden aanbevolen, zoals activering van AhR, oestrogene activiteit en oxidatieve stressrespons. Echter, zoals hierboven genoemd vonden De Baat et al. (2020) dat de verschillende passive sampling methoden niet altijd dezelfde bioassay responses teweeg brachten, en het is dan ook aan te raden een universele bemonsteringsmethode toe te passen voor alle daaropvolgende bioanalyses. De op

het moment beschikbare kennis (o.a. Nguyen et al. 2021) wijst erop dat de POCIS de meest frequente en sterke bioassay responses laat zien in vergelijkend onderzoek tussen de in Nederland meest gebruikte passieve samplers. Vooral nog is dit een overtuigend argument om dit type passieve sampler in te zetten in combinatie met effectmonitoring met bioassays, maar lopend en toekomstig onderzoek zal leiden tot het formuleren van een standaardprocedure voor passieve sampling als monstermethode voor chemische waterkwaliteitsbepaling in de ESFT2.

5.3. Afvangen van vluchtige stoffen

Elke vorm van oplosmiddelextractie, passieve sampling en conventionele SPE-monsterverwerking omvat een afblaasstep, wat betekent dat vluchtige chemische stoffen, zoals veel oplosmiddelen en sommige desinfectie bijproducten (bv. trihalomethanen), niet in het uiteindelijke extract terecht komen. Verder worden op zoogdiercellen gebaseerde assays geïncubeerd bij 37°C, meestal gedurende 16 tot 24 uur, wat ook kan leiden tot het verlies van vluchtige stoffen, hoewel sommige bioassays kunnen worden aangepast om te worden uitgevoerd zonder een headspace om het verlies van vluchtige stoffen te voorkomen (Stalter et al., 2013). Stalter et al. (2016) ontwikkelden een “purge and cold-trap” methode om vluchtige desinfectie bijproducten uit drinkwater op te vangen en te concentreren. De methode is echter bewerkelijk en vereist extractie ter plaatse of binnen een zeer korte periode. Daarom wordt deze methode niet aanbevolen voor routinematige monitoring, maar in plaats daarvan voor onderzoeksdoeleinden. Belangrijk is dat vluchtige desinfectie bijproducten slechts een kleine bijdrage blijken te hebben aan de totale effecten (Stalter et al., 2016), wat suggereert dat we het merendeel van de desinfectie bijproducten-geassocieerde toxiciteit kunnen afvangen met eenvoudigere gangbare SPE-methoden.

6. Vaste-fase extractie (SPE) toegepast

Aangezien SPE de meest toegepaste extractiemethode is, wordt in dit deel nadere informatie gegeven over SPE, met inbegrip van de verschillende SPE-sorbent opties en de gebruikelijke SPE-procedure.

6.1. SPE sorbentia

Voor SPE is een breed scala aan sorbentia beschikbaar, waarbij Oasis HLB (Waters) het meest wordt gebruikt (48% van de onderzochte SPE-gebruikers). Andere veelgebruikte SPE-sorbentia zijn Chromabond HR-X (Macherey-Nagel), StrataX (Phenomenex) en octadecylsilica C18. De meeste algemeen gebruikte sorbentia bevatten een copolymeermengsel, zoals poly(divinylbenzeen-co-N-vinylpyrrolidon), met een hydrofiel monomeer om polaire stoffen af te vangen en een lipofiel monomeer om hydrofobe stoffen af te vangen. Deze sorbentia binden echter een lagere fractie van geladen chemicaliën in vergelijking met neutrale stoffen (Neale et al., 2018; Osorio et al., 2018). Bijgevolg hebben sommige studies combinaties van meerdere sorbentia toegepast, zoals omgekeerde-fase sorbentia met ionen uitwisselaars, om een breder scala van microverontreinigingen af te vangen, waaronder zeer polaire stoffen en geladen stoffen (Aerni et al., 2004; Tousova et al., 2017; Osorio et al., 2018). Andere studies hebben meerlaagse SPE met Oasis HLB en kokosnootkool toegepast om de recovery van zeer polaire verbindingen te verbeteren (Escher et al., 2014; Leusch et al., 2014b). Een meerlaags SPE-patroon met Oasis HLB, Strata-X-CW, Strata-X-AW en Isolute ENV+ (1:1:1,5) en Supelclean EnviCarb bleek echter blanco effecten te vertonen na ongeveer 20 keer concentrering (Neale et al., 2018). Bioassays zijn niet in staat om onderscheid te maken tussen effecten van een monster en effecten als gevolg van onzuiverheden door monster voorbereiding, dus het is belangrijk om een extractiemethode te kiezen zonder blanco-effecten. In ieder geval is het belangrijk om bij het concentreren van watermonsters altijd verwerkingscontroles met ultrapuur water of glasflessenwater op te nemen om te bevestigen dat de waargenomen effecten te wijten zijn aan microverontreinigingen in het monster en niet gerelateerd zijn aan het SPE-sorbent of de oplosmiddelen.

Daarnaast hebben een aantal studies de invloed van verschillende SPE sorbentia op de bioactiviteit vergeleken. Rosenmai et al. (2018) pasten bijvoorbeeld zowel Oasis HLB (poly(divinylbenzeen-co-N-vinylpyrrolidon) als Bond Elut ENV (gemodificeerd styreen divinylbenzeen) sorbents toe om afvalwater- en drinkwatermonsters te extraheren, waarbij geen consistent verschil in effect werd waargenomen. Abbas et al. (2019) vergeleken drie SPE sorbents, Oasis HLB, Telos C18/ENV en Supelco ENVI-Carb+, bij pH 2,5 en pH 7 en vonden dat Telos C18/ENV bij pH 7 het meest effectief was voor afvalwater effluent en grondwater, hoewel er aanzienlijke cytotoxiciteit werd waargenomen, die het effect kan maskeren.

6.2. SPE procedure

Voordat het watermonster met SPE wordt geëxtraheerd, moet de SPE-kolom of -disc worden geconditioneerd om het sorbent bed te bevochtigen en te activeren. Met water mengbaar methanol, gevolgd door ultrapuur water wordt gewoonlijk gebruikt voor conditionering (bv. Bain et al., 2014; Alygizakis et al., 2019; Lundqvist et al., 2019). Indien echter andere minder polaire oplosmiddelen worden gebruikt voor de elutie van de cartridge, zoals dichloormethaan of ethylacetaat, dan moeten deze oplosmiddelen ook worden gebruikt voor de conditionering. Na het conditioneren

mag de kolom niet drooglopen en moet het watermonster onmiddellijk door de SPE-kolom worden gepercoleerd.

Zodra het monster op het SPE-sorptiemiddel is gesorbeerd, moet de cartridge volledig worden gedroogd in een vacuüm- of stikstofstroom. Dit kan tot 2 uur duren. De gedroogde cartridge kan worden verzegeld met parafilm en tegen licht worden beschermd met aluminiumfolie en bij -20°C worden bewaard tot de elutie (Tang et al., 2014). Andere studies hebben gedroogde SPE-cartridges tot 2 weken bij 4°C bewaard (Scott et al., 2014). Gedroogde cartridges kunnen ook naar bioassay-laboratoria worden gestuurd voor elutie, wat eenvoudiger en goedkoper is dan het sturen van liters niet-verrijkt water.

Om een breder scala aan polaire en apolaire chemicaliën te elueren, worden vaak meerdere oplosmiddelen gebruikt voor de elutie, zoals methanol en 1:1 hexaan:aceton (bijv. Scott et al., 2014; Jia et al., 2015) of methanol en ethylacetaat (bijv. Houtman et al., 2018; Muller et al., 2018). Andere oplosmiddelen die in de literatuur in verschillende combinaties worden gebruikt, zijn acetonitril, dichloormethaan en methyl-tert-butylether (MTBE). Wel kunnen onzuiverheden in de oplosmiddelen mogelijk blanco-effecten in de bioassays veroorzaken. Daarom is het belangrijk dat voor de conditionering en elutie zeer zuivere oplosmiddelen (bv. oplosmiddelen van HPLC-kwaliteit) worden gebruikt en dat het volume van het gebruikte oplosmiddel wordt beperkt. Op basis van 500 mg (6 cc) Oasis HLB SPE cartridge wordt vaak 10 mL van elk oplosmiddel gebruikt voor conditionering en 10 mL van elk oplosmiddel voor elutie (Scott et al., 2014; Muller et al., 2018). Kleinere volumes oplosmiddel kunnen worden gebruikt met kleinere hoeveelheden SPE-sorbent.

Verschillende studies hebben het effect van conditionerings- en elutieoplosmiddelen op de bioactiviteit vergeleken. Leusch et al. (2014a) vonden bijvoorbeeld geen significant verschil in de bioanalytische resultaten bij gebruik van 1:1 hexaan:aceton en methanol in vergelijking met alleen methanol voor conditionering en elutie. Verder vergeleken Prochazkova et al. (2018) het effect van twee verschillende combinaties van conditionering en elutie van oplosmiddelen op oestrogene activiteit in oppervlakte-extracten. De eerste methode richtte zich op oestrogene verbindingen door conditionering en elutie met methanol, terwijl de tweede methode zich richtte op minder polaire verbindingen en gebruikmaakte van ethylacetaat, methanol en 20% 2-propanol voor conditionering en ethylacetaat voor elutie. De verschillende oplosmiddelen resulteerden vaak in verschillende 17 β -estradiol equivalente concentraties (EEQ) waarden voor de overeenkomende monsters, maar er werd geen systematisch verschil in oestrogeniteit waargenomen.

Na de elutie wordt het elutieoplosmiddel onder stikstofgas droog geblazen. Roterende verdampers moeten worden vermeden in verband met verontreinigingsproblemen. Het gedroogde residu of het sterk gereduceerde volume wordt vervolgens geresuspendeerd in een eindoplosmiddel, zoals methanol, dimethylsulfoxide (DMSO) of ethanol. Murk et al. (2002) vergeleken het effect van opslagcondities op hetzelfde extract opgelost in ethanol en DMSO in de ER α CALUX assay. Aanvankelijk was er geen verschil in effect, maar ethanol bleek snel te verdampen wanneer het bij kamertemperatuur of 4°C werd bewaard en verdampte zelfs bij -20°C binnen 6 weken. Daarentegen veranderde de DMSO stock niet significant in activiteit gedurende de periode van 6 weken wanneer bewaard bij 4°C en -20°C. Alcoholen hebben enig voordeel omdat zij vóór de experimenten kunnen worden verdampt, zodat bij de eigenlijke bioassay geen oplosmiddel wordt gebruikt. Indien vluchtige oplosmiddelen worden gebruikt voor de opslag van extracten, is gewichtscntrole van de flacons en het bijvullen van oplosmiddel indien nodig,

tijdrovend maar aan te bevelen. Zie ook sectie 7 voor nadere informatie over de elutie- en reconstitutievloeistof.

6.3. Effect-recovery van SPE

De recovery van individuele chemische stoffen door SPE is goed bestudeerd (bv. Schulze et al., 2017; Osorio et al., 2018), maar er is minder bekend over effect recovery voor bioassays. Bovendien, in tegenstelling tot chemische analyse waar een interne standaard kan worden toegevoegd om te corrigeren voor chemische recovery door SPE, mogen interne standaarden niet worden gebruikt voor bioanalyse omdat ze een effect induceren in de bioassay dat niet kan worden onderscheiden van andere microverontreinigingen in het monster. In de literatuur zijn een aantal benaderingen toegepast om de recovery te beoordelen, waarbij meestal een cocktail van chemische stoffen in de watermatrix wordt gespiked voordat de SPE-concentrering plaatsvindt. Aangezien het moeilijk kan zijn om alleen het effect van het water te meten, wordt in veel studies het effect in het extract, vaak uitgedrukt als een bioanalytisch equivalente concentratie uit bioanalyse ($BEQ_{bio,extract}$), vergeleken met het voorspelde effect op basis van de concentratie van chemische stoffen die in het extract zijn gedetecteerd ($BEQ_{chem,extract}$) of de nominale concentratie van gespikete chemische stoffen ($BEQ_{chem,nominaal}$) (bv. Leusch et al., 2010; Kunz et al., 2017). De verhouding $BEQ_{chem,extract}/BEQ_{bio,extract}$ en $BEQ_{chem,nominaal}/BEQ_{bio,extract}$ kan worden gebruikt als proxy voor effectherstel. Verder probeerden Abbas et al. (2019) de SPE-recovery te beoordelen door het effect van het onverwerkte water en de SPE-extracten in niet-gespiked afvalwater en grondwater te vergelijken. Echter, andere componenten in het onverwerkte watermonster, zoals zouten, metalen en andere anorganische stoffen, kunnen naast organische microverontreinigingen ook een effect hebben in de bioassay, waardoor vergelijking moeilijk is.

Om de recovery van effecten door SPE echt te evalueren, moet worden gekeken naar het effect van het gespikete mengsel alleen, het effect van het geëxtraheerde monster en het effect van het ongespikete water alleen. Neale et al. (2018) evalueerden het effectherstel van een mengsel van 579 microverontreinigende stoffen die in schoon oppervlaktewater waren gespiket met behulp van een reeks bioassays die indicatief zijn voor het xenobiotisch metabolisme, hormoonreceptor-gemedieerde effecten en adaptieve stressresponsen. Er werd gebruik gemaakt van LVSPE met HR-X sorptiemiddel. De recovery werd berekend aan de hand van het effect van het gespikete water ($BEQ_{bio,extract}(\text{water} + \text{mix})$) min het effect van het niet gespeikete water ($BEQ_{bio,extract}(\text{water})$) gedeeld door het effect van de voorraadoplossing van het mengsel ($BEQ_{bio}(\text{mix})$). De recovery van de effecten varieerde van 35% voor de activering van de oestrogeenreceptor (ER) tot 236% voor de oxidatieve stressrespons, met een extreme waarde van 1300% voor de activering van PXR. Verwacht werd dat dit te wijten was aan het kleine en variabele effect van $BEQ_{bio}(\text{mix})$. De recovery van het effect lag voor de meeste tests binnen een factor twee van de optimale 100% recovery, wat erop wijst dat de LVSPE geschikt is voor het afvangen van het merendeel van de actieve chemische stoffen.

Als kwaliteitscontrole kan men ook een monster spiken met gelabelde isotopen en de recovery van deze analyten meten, wat aan te bevelen is als de matrix veel verandert. Er moet voor worden gezorgd dat de spike geen effect heeft in de bioassay of er moet een apart recovery-monster worden verrijkt.

7. Toedienen van monsters aan bioassays

Na elutie kan het monsterextract direct in de bioassay worden gedoseerd of worden omgedampt naar een minder toxisch oplosmiddel door het elutie oplosmiddel af te blazen en opnieuw op te lossen in een eindoplosmiddel, zoals DMSO of methanol. Dit is ook relevant voor passieve sampling extracten. Methanol en DMSO zijn de meest gebruikte oplosmiddelen voor bioassay-dosering. DMSO is in staat een breder scala van verbindingen op te lossen dan methanol, maar het is niet vluchtig, wat betekent dat het extract niet verder kan worden geconcentreerd door het af te blazen. Methanol is daarentegen vluchtig, wat betekent dat het verder kan worden afgeblazen om de concentratiefactor te verhogen. DMSO is ook toxischer dan methanol, waarbij een DMSO-eindconcentratie van 0,1% in de bioassay wordt aanbevolen. Daarentegen kan tot 1% methanol worden toegevoegd aan sommige zoogdier-reportergen-assays (Leusch et al., 2017). Toevoeging van 0,1% of 1% komt neer op een verdunning in de assay van 1.000 of 100, wat betekent dat extracten 10 keer meer moeten worden verrijkt om dezelfde REF te geven.

Voorts kan de REF worden verhoogd door het methanol-extract te vervangen door celkweekmedia. Dit wordt bereikt door een volume methanol toe te voegen aan een glazen flesje (d.w.z. een HPLC-vial van 2 ml), dit droog te blazen en opnieuw op te lossen in celkweekmedium, dat rechtstreeks aan de cellen kan worden toegediend. Dit verhoogt de REF in de assay zonder oplosmiddeleffecten te veroorzaken. Deze aanpak is onlangs toegepast op drinkwaterextracten om effecten in relatief schone monsters te helpen detecteren (Hebert et al., 2018; Neale et al., 2020). Er moet voor worden gezorgd dat het monster goed is opgelost in het bioassay medium. Het is ook belangrijk om oplosmiddelcontroles in de assay op te nemen om ervoor te zorgen dat het oplosmiddel zelf geen respons in de assay induceert.

Colofon

Deze notitie is geschreven in het kader van het project Toxiciteit van de Kennisimpuls Waterkwaliteit. In de Kennisimpuls werken Rijk, provincies, waterschappen, drinkwaterbedrijven en kennisinstututen aan meer inzicht in de kwaliteit van het grond- en oppervlaktewater en de factoren die deze kwaliteit beïnvloeden. Daarmee kunnen waterbeheerders en andere partijen de juiste maatregelen nemen om de waterkwaliteit te verbeteren en de biodiversiteit te vergroten.

In het programma brengen partijen bestaande en nieuwe kennis bijeen, en maken ze deze kennis (beter) toepasbaar voor de praktijk. Hiermee verstevigen ze de basis onder het waterkwaliteitsbeleid. Het programma is gestart in 2018 en duurt vier jaar. Het wordt gefinancierd door het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat, STOWA, waterschappen, provincies en drinkwaterbedrijven.

Referenties

Abbas A, Schneider I, Bollmann A, Funke J, Oehlmann J, Prasse C, Schulte-Oehlmann U, Seitz W, Ternes T, Weber M, Wesely H, Wagner M. What you extract is what you see: Optimising the preparation of water and wastewater samples for in vitro bioassays. *Water Research* 2019; 152: 47-60.

Ademollo N, Patrolecco L, Polesello S, Valsecchi S, Wollgast J, Mariani G, Hanke G. The analytical problem of measuring total concentrations of organic pollutants in whole water. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2012; 36: 71-81.

Aerni HR, Kobler B, Rutishauser BV, Wettstein FE, Fischer R, Giger W, Hungerbühler A, Marazuela MD, Peter A, Schönenberger R, Vogeli AC, Suter MJF, Eggen RIL. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004; 378: 688-696.

Alygizakis NA, Besselink H, Paulus GK, Oswald P, Hornstra LM, Oswaldova M, Medema G, Thomaidis NS, Behnisch PA, Slobodnik J. Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis. *Environment International* 2019; 127: 420-429.

Bain PA, Williams M, Kumar A. Assessment of multiple hormonal activities in wastewater at different stages of treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2014; 33: 2297-2307.

Bicchi C, Schiliro T, Pignata C, Fea E, Cordero C, Canale F, Gilli G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. *Science of the Total Environment* 2009; 407: 1842-1851.

Brack W, Ait Aissa S, Backhaus T, Dulio V, Escher BI, Faust M, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Müller C, Munthe J, Posthuma L, Seiler TB, Slobodnik J, Teodorovic I, Tindall AJ, Umbuzeiro GD, Zhang XW, Altenburger R. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe* 2019; 31.

Brand W, de Jongh CM, van der Linden SC, Mennes W, Puijker LM, van Leeuwen CJ, van Wezel AP, Schriks M, Heringa MB. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environment International* 2013; 55: 109-118.

Brettschneider DJ, Misovic A, Schulte-Oehlmann U, Oetken M, Oehlmann J. Detection of chemically induced ecotoxicological effects in rivers of the Nidda catchment (Hessen, Germany) and development of an ecotoxicological, Water Framework Directive-compliant assessment system. *Environmental Sciences Europe* 2019; 31: 7.

Cantwell RE, Hofmann R. Ultraviolet absorption properties of suspended particulate matter in untreated surface waters. *Water Research* 2011; 45: 1322-1328.

Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment* 2004; 324: 55-66.

Conley JM, Evans N, Cardon MC, Rosenblum L, Iwanowicz LR, Hartig PC, Schenck KM, Bradley PM, Wilson VS. Occurrence and in vitro bioactivity of estrogen, androgen, and glucocorticoid compounds in a nationwide screen of United States stream waters. *Environmental Science & Technology* 2017a; 51: 4781-4791.

Conley JM, Evans N, Mash H, Rosenblum L, Schenck K, Glassmeyer S, Furlong ET, Kolpin DW, Wilson VS. Comparison of in vitro estrogenic activity and estrogen concentrations in source and treated waters from 25 US drinking water treatment plants. *Science of the Total Environment* 2017b; 579: 1610-1617.

Creusot N, Ait-Aissa S, Tapie N, Pardon P, Brion F, Sanchez W, Thybaud E, Porcher JM, Budzinski H. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environmental Science & Technology* 2014; 48: 3649-3657.

Dagnino S, Gomez E, Picot B, Cavailles V, Casellas C, Balaguer P, Fenet H. Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 2010; 408: 2608-2615.

Daniels KD, VanDervort D, Wu SM, Leusch FDL, van de Merwe JP, Jia A, Snyder SA. Downstream trends of in vitro bioassay responses in a wastewater effluent-dominated river. *Chemosphere* 2018; 212: 182-192.

De Baat ML, Bas DA, Van Beusekom SAM, Droge STJ, van der Meer F, de Vries M, Verdonshot PFM, Kraak MHS. Nationwide screening of surface water toxicity to algae. *Science of the Total Environment* 2018; 645, 780-787.

De Baat ML, Kraak MHS, Van der Oost R, De Voogt P, Verdonshot PFM. Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. *Water Research* 2019; 159: 434-443.

De Baat ML, Van der Oost R, Van der Lee GH, Wieringa N, Hamers T, Verdonshot PFM, De Voogt P, Kraak MHS (2020). Advancements in effect-based surface water quality assessment. *Water research*, 183, 116017.

Denison, M. S.; Mehinto, A. C.; Olivieri, A.; Plumlee, M.; D, S.; Thompson, S.; Waggoner, C. Bioanalytical Tools for Detection and Quantification of Estrogenic and Dioxin-Like Chemicals in Water Recycling and Reuse - Guidance Document for Developing a Standard Operating Procedure; National Water Research Institute: 2020.

Escher BI, Allinson M, Altenburger R, Bain PA, Balaguer P, Busch W, Crago J, Denslow ND, Dopp E, Hilscherova K, Humpage AR, Kumar A, Grimaldi M, Jayasinghe BS, Jarosova B, Jia A, Makarov S, Maruya KA, Medvedev A, Mehinto AC, Mendez JE, Poulsen A, Prochazka E, Richard J, Schifferli A, Schlenk D, Scholz S, Shiraish F, Snyder S, Su GY, Tang JYM, van der Burg B, van der Linden SC, Werner I, Westerheide SD, Wong CKC, Yang M, Yeung BHY, Zhang XW, Leusch FDL. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environmental Science & Technology* 2014; 48: 1940-1956.

Escher BI, Bramaz N, Maurer M, Richter M, Sutter D, von Kanel C, Zschokke M. Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005; 24: 750-758.

European Commission. Common Implementation Strategy for the WFD, Guidance Document No. 19, Guidance on Surface Water Chemical Monitoring, 2009.

Fang YX, Ying GG, Zhao JL, Chen F, Liu S, Zhang LJ, Yang B. Assessment of hormonal activities and genotoxicity of industrial effluents using in vitro bioassays combined with chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2012; 31: 1273-1282.

Farre MJ, Day S, Neale PA, Stalter D, Tang JYM, Escher BI. Bioanalytical and chemical assessment of the disinfection by-product formation potential: Role of organic matter. *Water Research* 2013; 47: 5409-5421.

Furlong ET, Werner SL, Anderson BD, Cahill JD. Determination of human-health pharmaceuticals in filtered water by chemically modified styrene-divinylbenzene resin-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *US Geological Survey Techniques and Methods*. USGS, 2008, pp. 56.

Gehrmann L, Bielak H, Behr M, Itzel F, Lyko S, Simon A, Kunze G, Dopp E, Wagner M, Tuerk J. (Anti-)estrogenic and (anti-)androgenic effects in wastewater during advanced treatment: Comparison of three in vitro bioassays. *Environmental Science and Pollution Research* 2018; 25: 4094-4104.

Glassmeyer ST, Furlong ET, Kolpin DW, Batt AL, Benson R, Boone JS, Conerly O, Donohue MJ, King DN, Kostich MS, Mash HE, Pfaller SL, Schenck KM, Simmons JE, Varughese EA, Vesper SJ, Villegas EN, Wilson VS. Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States. *Science of the Total Environment* 2017; 581: 909-922.

Hamers T, Kamstra JH, van Gils J, Kotte MC, van Hattum AGM. The influence of extreme river discharge conditions on the quality of suspended particulate matter in Rivers Meuse and Rhine (The Netherlands). *Environmental Research* 2015; 143: 241-255.

Hamers T, Legradi J, Zwart N, Smedes F, de Weert J, van den Brandhof EJ, van de Meent D, de Zwart D. Time-Integrative Passive sampling combined with TOxicity Profiling (TIPTOP): an effect-based strategy for cost-effective chemical water quality assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2018; 64: 48-59.

Hebert A, Feliens C, Lecarpentier C, Neale PA, Schlichting R, Thibert S, Escher BI. Bioanalytical assessment of adaptive stress responses in drinking water: A predictive tool to differentiate between micropollutants and disinfection by-products. *Water Research* 2018; 132: 340-349.

Houtman CJ, ten Broek R, Brouwer A. Steroid hormonal bioactivities, culprit natural and synthetic hormones and other emerging contaminants in waste water measured using bioassays and UPLC-tQ-MS. *Science of the Total Environment* 2018; 630: 1492-1501.

International Organisation for Standardization. ISO 11369:1997: Water quality—determination of selected plant treatment agents—method using high-performance liquid chromatography with UV detection after solid-liquid extraction, 1997.

Jalova V, Jarosova B, Blaha L, Giesy JP, Ocelka T, Grabic R, Jurcikova J, Vrana B, Hilscherova K. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environment International* 2013; 59: 372-383.

Jarošová B, Ersekova A, Hilscherova K, Loos R, Gawlik BM, Giesy JP, Blaha L. Europe-wide survey of estrogenicity in wastewater treatment plant effluents: The need for the effect-based monitoring. *Environmental Science and Pollution Research* 2014; 21: 10970-10982.

Jia A, Escher BI, Leusch FDL, Tang JYM, Prochazka E, Dong BF, Snyder EM, Snyder SA. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. *Water Research* 2015; 80: 1-11.

Kolkman A, Schriks M, Brand W, Bauerlein PS, van der Kooi MME, van Doorn RH, Emke E, Reus AA, van der Linden SC, de Voogt P, Heringa MB. Sample preparation for combined chemical analysis and in vitro bioassay application in water quality assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2013; 36: 1291-1303.

Konemann S, Kase R, Simon E, Swart K, Buchinger S, Schlusener M, Hollert H, Escher BI, Werner I, Ait-Aissa S, Vermeirssen E, Dulio V, Valsecchi S, Polesello S, Behnisch P, Javurkova B, Perceval O, Di Paolo C, Olbrich D, Sychrova E, Schlichting R, Leborgne L, Clara M, Scheffknecht C, Marneffe Y, Chalon C, Tusil P, Soldan P, von Danwitz B, Schwaiger J, Becares MIS, Bersani F, Hilscherova K, Reifferscheid G, Ternes T, Carere M. Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry* 2018; 102: 225-235.

Konig M, Escher BI, Neale PA, Krauss M, Hilscherova K, Novak J, Teodorovic I, Schulze T, Seidensticker S, Hashmi MAK, Ahlheim J, Brack W. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. *Environmental Pollution* 2017; 220: 1220-1230.

Korner W, Spengler P, Bolz U, Schuller W, Hanf V, Metzger JW. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2001; 20: 2142-2151.

Kunz PY, Simon E, Creusot N, Jayasinghe BS, Kienle C, Maletz S, Schifferli A, Schonlau C, Ait-Aissa S, Denslow ND, Hollert H, Werner I, Vermeirssen ELM. Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. *Water Research* 2017; 110: 378-388.

Legler J, Leonards P, Spenkeliink A, Murk AJ. In vitro biomonitoring in polar extracts of solid phase matrices reveals the presence of unknown compounds with estrogenic activity. *Ecotoxicology* 2003; 12: 239-249.

Leusch FDL, De Jager C, Levi Y, Lim R, Puijker L, Sacher F, Tremblay LA, Wilson VS, Chapman HF. Comparison of five in vitro bioassays to measure estrogenic activity in environmental waters. *Environmental Science & Technology* 2010; 44: 3853-3860.

Leusch FDL, Khan SJ, Gagnon MM, Quayle P, Trinh T, Coleman H, Rawson C, Chapman HF, Blair P, Nice H, Reitsema T. Assessment of wastewater and recycled water quality: A comparison of lines of evidence from in vitro, in vivo and chemical analyses. *Water Research* 2014a; 50: 420-431.

Leusch FDL, Khan SJ, Laingam S, Prochazka E, Froschio S, Trinh T, Chapman HF, Humpage A. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Research* 2014b; 49: 300-315.

Leusch FDL, Neale PA, Hebert A, Scheurer M, Schriks MCM. Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environment International* 2017; 99: 120-130.

Lundqvist J, Andersson A, Johannisson A, Lavonen E, Mandava G, Kylin H, Bastviken D, Oskarsson A. Innovative drinking water treatment techniques reduce the disinfection-induced oxidative stress and genotoxic activity. *Water Research* 2019; 155: 182-192.

Macova M, Escher BI, Reungoat J, Carswell S, Chue KL, Keller J, Mueller JF. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water Research* 2010; 44: 477-492.

Macova M, Toze S, Hodgers L, Mueller JF, Bartkow M, Escher BI. Bioanalytical tools for the evaluation of organic micropollutants during sewage treatment, water recycling and drinking water generation. *Water Research* 2011; 45: 4238-4247.

Mehinto AC, Jia A, Snyder SA, Jayasinghe BS, Denslow ND, Crago J, Schlenk D, Menzie C, Westerheide SD, Leusch FDL, Maruya KA. Interlaboratory comparison of in vitro bioassays for screening of endocrine active chemicals in recycled water. *Water Research* 2015; 83: 303-309.

Muller ME, Escher BI, Schwientek M, Werneburg M, Zarfl C, Zwiener C. Combining in vitro reporter gene bioassays with chemical analysis to assess changes in the water quality along the Ammer River, Southwestern Germany. *Environmental Sciences Europe* 2018; 30.

Murk AJ, Legler J, van Lipzig MMH, Meerman JHN, Belfroid AC, Spenkeliink A, van der Burg B, Rijs GBJ, Vethaak D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2002; 21: 16-23.

Neale PA, Ait-Aissa S, Brack W, Creusot N, Denison MS, Deutschmann B, Hilscherova K, Hollert H, Krauss M, Novak J, Schulze T, Seiler TB, Serra H, Shao Y, Escher BI. Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture-toxicity modeling. *Environmental Science & Technology* 2015; 49: 14614-14624.

Neale PA, Brack W, Ait-Aissa S, Busch W, Hollender J, Krauss M, Maillot-Marechal E, Munz NA, Schlichting R, Schulze T, Vogler B, Escher BI. Solid-phase extraction as sample preparation of water samples for cell-based and other in vitro bioassays. *Environmental Science-Processes & Impacts* 2018; 20: 493-504.

Neale PA, Escher BI. Does co-extracted dissolved organic carbon cause artefacts in cell-based bioassays? *Chemosphere* 2014; 108: 281-288.

Neale PA, Feliers C, Glauch L, König M, Lecarpentier C, Schlichting R, Thibert S, Escher BI. Application of in vitro bioassays for water quality monitoring in three drinking water treatment plants using different treatment processes including biological treatment, nanofiltration and ozonation coupled with disinfection. *Environmental Science: Water Research & Technology* 2020; Advance Article, <https://doi.org/10.1039/C9EW00987F>.

Neale PA, Munz NA, Ait-Aissa S, Altenburger R, Brion F, Busch W, Escher BI, Hilscherova K, Kienle C, Novak J, Seiler TB, Shao Y, Stamm C, Hollender J. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Science of the Total Environment* 2017; 576: 785-795.

Nelson ED, Do H, Lewis RS, Carr SA. Diurnal variability of pharmaceutical, personal care product, estrogen and alkylphenol concentrations in effluent from a tertiary wastewater treatment facility. *Environmental Science & Technology* 2011; 45: 1228-1234.

Nguyen MT, De Baat ML, Van Der Oost R, Van Den Berg W, & De Voogt P. Comparative field study on bioassay responses and micropollutant uptake of POCIS, Speedisk and SorbiCell polar passive samplers. *Environmental toxicology and pharmacology* 2021; 82, 103549.

NHMRC & NRMCC. Australian Drinking Water Guidelines 6, Version 3.5. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra, 2011.

Niss F, Rosenmai AK, Mandava G, Orn S, Oskarsson A, Lundqvist J. Toxicity bioassays with concentrated cell culture media-a methodology to overcome the chemical loss by conventional preparation of water samples. *Environmental Science and Pollution Research* 2018; 25: 12183-12188.

Novak J, Vrana B, Rusina T, Okonski K, Grabic R, Neale PA, Escher BI, Macova M, Ait-Aissa S, Creusot N, Allan I, Hilscherova K. Effect-based monitoring of the Danube River using mobile passive sampling. *Science of the Total Environment* 2018; 636: 1608-1619.

Osorio V, Schriks M, Vughs D, de Voogt P, Kolkman A. A novel sample preparation procedure for effect-directed analysis of micro-contaminants of emerging concern in surface waters. *Talanta* 2018; 186: 527-537.

Petrie B, Proctor K, Youdan J, Barden R, Kasprzyk-Hordern B. Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in effluent wastewater. *Science of the Total Environment* 2017; 579: 569-578.

Poole CF. New trends in solid-phase extraction. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22: 362-373.

Prochazkova T, Sychrova E, Vecerkova J, Javurkova B, Otoupalikova A, Pernica M, Simek Z, Smutna M, Lepsova-Skacelova O, Hilscherova K. Estrogenic activity and contributing compounds in stagnant water bodies with massive occurrence of phytoplankton. *Water Research* 2018; 136: 12-21.

Reungoat J, Macova M, Escher BI, Carswell S, Mueller JF, Keller J. Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. *Water Research* 2010; 44: 625-637.

Roberts J, Bain PA, Kumar A, Hepplewhite C, Ellis DJ, Christy AG, Beavis SG. Tracking multiple modes of endocrine activity in Australia's largest inland sewage treatment plant and effluent-receiving environment using a panel of in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2015; 34: 2271-2281.

Rosenmai AK, Lundqvist J, le Godec T, Ohisson A, Troger R, Hellman B, Oskarsson A. In vitro bioanalysis of drinking water from source to tap. *Water Research* 2018; 139: 272-280.

Sauer P, Borik A, Golovko O, Grabic R, Stanova AV, Valentova O, Stara A, Sandova M, Kroupova HK. Do progestins contribute to (anti-)androgenic activities in aquatic environments? *Environmental Pollution* 2018; 242: 417-425.

Schulze T, Ahel M, Ahlheim J, Ait-Aissa S, Brion F, Di Paolo C, Froment J, Hidas AO, Hollender J, Hollert H, Hu M, Klotz A, Koprivica S, Krauss M, Muz M, Oswald P, Petre M, Schollee JE, Seiler TB, Shao Y, Slobodnik J, Sonavane M, Suter MJF, Tollefsen KE, Tousova Z, Walz KH, Brack W. Assessment of a novel device for onsite integrative large-volume solid phase extraction of water samples to enable a comprehensive chemical and effect-based analysis. *Science of the Total Environment* 2017; 581: 350-358.

Schulze T, Ulrich M, Maier D, Maier M, Terytze K, Braunbeck T, Hollert H. Evaluation of the hazard potentials of river suspended particulate matter and floodplain soils in the Rhine basin using chemical analysis and in vitro bioassays. *Environmental Science and Pollution Research* 2015; 22: 14606-14620.

Scott PD, Bartkow M, Blockwell SJ, Coleman HM, Khan SJ, Lim R, McDonald JA, Nice H, Nuggeoda D, Pettigrove V, Tremblay LA, Warne MSJ, Leusch FDL. An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses. *Environmental Science and Pollution Research* 2014; 21: 12951-12967.

Simon E, Schifferli A, Bucher TB, Olbrich D, Werner I, Vermeirssen ELM. Solid-phase extraction of estrogens and herbicides from environmental waters for bioassay analysis-effects of sample volume on recoveries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2019; 411: 2057-2069.

Stalter D, Dutt M, Escher BI. Headspace-free setup of in vitro bioassays for the evaluation of volatile disinfection by-products. *Chemical Research in Toxicology* 2013; 26: 1605-1614.

Stalter D, Peters LI, O'Malley E, Tang JYM, Revalor M, Farre MJ, Watson K, von Gunten U, Escher BI. Sample enrichment for bioanalytical assessment of disinfected drinking water: Concentrating the polar, the volatiles, and the unknowns. *Environmental Science & Technology* 2016; 50: 6495-6505.

Tang JYM, Busetti F, Charrois JWA, Escher BI. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water? *Water Research* 2014; 60: 289-299.

Thorpe KL, Gross-Sorokin M, Johnson I, Brighty G, Tyler CR. An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114: 90-97.

Tousova Z, Oswald P, Slobodnik J, Blaha L, Muz M, Hu M, Brack W, Krauss M, Di Paolo C, Tarcai Z, Seiler TB, Hollert H, Koprivica S, Ahel M, Schollee JE, Hollender J, Suter MJF, Hidasi AO, Schirmer K, Sonavane M, Ait-Aissa S, Creusot N, Brion F, Froment J, Almeida AC, Thomas K, Tollefsen KE, Tufi S, Ouyang XY, Leonards P, Lamoree M, Torrens VO, Kolkman A, Schriks M, Spirhanzlova P, Tindall A, Schulze T. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Science of the Total Environment* 2017; 601: 1849-1868.

Tousova Z, Vrana B, Smutna M, Novak J, Klucarova V, Grabic R, Slobodnik J, Giesy JP, Hilscherova K. Analytical and bioanalytical assessments of organic micropollutants in the Bosna River using a combination of passive sampling, bioassays and multi-residue analysis. *Science of the Total Environment* 2019; 650: 1599-1612.

Troger R, Klockner P, Ahrens L, Wiberg K. Micropollutants in drinking water from source to tap - Method development and application of a multiresidue screening method. *Science of the Total Environment* 2018; 627: 1404-1432.

US EPA. Method: 1694, Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. EPA-821-R-08-002, Washington DC, 2007.

Valcarcel Y, Valdehita A, Becerra E, de Alda ML, Gil A, Gorga M, Petrovic M, Barcelo D, Navas JM. Determining the presence of chemicals with suspected endocrine activity in drinking water from the Madrid region (Spain) and assessment of their estrogenic, androgenic and thyroidal activities. *Chemosphere* 2018; 201: 388-398.

Valitalo P, Massei R, Heiskanen I, Behnisch P, Brack W, Tindall AJ, Du Pasquier D, Kuster E, Mikola A, Schulze T, Sillanpaa M. Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment. *Water Research* 2017; 126: 153-163.

Van der Linden SC, Heringa MB, Man HY, Sonneveld E, Puijker LM, Brouwer A, Van der Burg B. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science & Technology* 2008; 42: 5814-5820.

van der Oost R, Sileno G, Janse T, Nguyen MT, Besselink H, Brouwer A. SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part II-field feasibility survey. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2017a; 36: 2400-2416.

Van der Oost, R., Sileno, G., Janse, T., Nguyen, M. T., Besselink, H., & Brouwer, A. SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: part II-field feasibility survey. *Environmental toxicology and chemistry* 2017b, 36(9), 2400-2416.

Van Zijl MC, Aneck-Hahn NH, Swart P, Hayward S, Genthe B, De Jager C. Estrogenic activity, chemical levels and health risk assessment of municipal distribution point water from Pretoria and Cape Town, South Africa. *Chemosphere* 2017; 186: 305-313.

Walker CW, Watson JE. Adsorption of estrogens on laboratory materials and filters during sample preparation. *Journal of Environmental Quality* 2010; 39: 744-748.

Wolz J, Engwall M, Maletz S, Takner HO, van Bavel B, Kammann U, Klempt M, Weber R, Braunbeck T, Hollert H. Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine - a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis. *Environmental Science and Pollution Research* 2008; 15: 536-553.

Xiao SH, Lv XM, Lu Y, Yang XM, Dong XR, Ma KP, Zeng YF, Jin T, Tang F. Occurrence and change of estrogenic activity in the process of drinking water treatment and distribution. *Environmental Science and Pollution Research* 2016; 23: 16977-16986.