

Sleutelfactor Toxiciteit



Achtergronddocument Interpretatie Maatwerk Bioassays

Achtergrond document beschikbare kennis

Auteurs:

Milo de Baat (KWR)

Milou Dingemans (KWR)

Ron van der Oost (Waternet)

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., Dingemans, M., Van der Oost, R., en Van den Berg, S. (2021).

Achtergronddocument Interpretatie Maatwerk Bioassays. Achtergronddocument beschikbare kennis bij de sleutelfactor Toxiciteit. Kennis Impuls Water Kwaliteit.

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	2
Samenvatting.....	3
1. Inleiding.....	4
2. Keuzehulp.....	5
3. Effect-sigitaalwaarden.....	6
4. Alternatieve interpretatie methoden.....	9
4.1. Wel of niet meetbaar effect.....	9
4.2. Trendanalyses.....	9
5. Vervolanalyses.....	10
5.1. Non-target screening.....	10
5.2. Effect-gestuurde analyse (EDA).....	10
Colofon.....	12
Referenties.....	13

Samenvatting

In de eerste versie van de ESF-Tox (ESFT1; 2016) werd een standaard manier aanbevolen om bioassay responses te interpreteren, namelijk door middel van de zogenoemde “SIMONI score”. Echter, binnen de ESF-Tox2 is de methode voor interpretatie herzien en varieert bovendien de interpretatiemethode tussen de basis-set bioassays en de maatwerk bioassays. Voor de basis-set bioassays is een opzichzelfstaande tool ontwikkeld, welke verder wordt toegelicht op de website van de KIWK-tox. Voor maatwerk bioassays bestaat echter een verscheidenheid aan interpretatiemogelijkheden. Afhankelijk van de kennisbehoefte en verschillende toepassingsgebieden kunnen maatwerk bioassay responses namelijk op verschillende manieren geïnterpreteerd worden. Er worden in dit achtergronddocument verschillende aanpakken toegelicht.

1. Inleiding

In de eerste versie van de ESF-Tox (ESFT1; 2016) werd een standaard manier aanbevolen om bioassay responses te interpreteren, namelijk door middel van de zogenoemde “SIMONI score”. Echter, binnen de ESF-Tox2 is de methode voor interpretatie herzien en varieert bovendien de interpretatiemethode tussen de basis-set bioassays en de maatwerk bioassays. Voor de basis-set bioassays is een opzichzelfstaande tool ontwikkeld, welke verder wordt toegelicht op de website van KIWK-tox. Voor maatwerk bioassays bestaat echter een scala aan interpretatiemogelijkheden. Afhankelijk van de kennisbehoefte en verschillende toepassingsgebieden kunnen maatwerk bioassay responses namelijk op verschillende manieren geïnterpreteerd worden. Er worden in dit achtergronddocument dan ook verschillende aanpakken toegelicht, namelijk:

- Effect-signaalwaarden
- Wel of niet een meetbaar effect
- Trendanalyses
- Vervolanalyses

In sectie 2 wordt met een korte keuzehulp de gebruikers geholpen te bepalen welke interpretatiemogelijkheden passen bij de door hen gestelde (onderzoeks)vragen.

De uitslag van een bioassay wordt in belangrijke mate beïnvloed door de gebruikte bemonsteringsmethode. De voor- en nadelen van de verschillende beschikbare bemonsteringsmethoden, en de daarbij horende onzekerheden, zijn uiteengezet in het achtergronddocument Bemonstering en Monstervoorbewerking op de Advies Uitvoering Bioassays pagina. Daarnaast kunnen bioassay resultaten beïnvloed worden door matrixeffecten of residuen van oplosmiddelen die achterblijven als gevolg van de extractie van de monsters. Om dit soort effecten te detecteren en er, zo nodig, voor te corrigeren moeten de juiste controles worden meegenomen in de bioassay analyses. Voorbeelden hiervan zijn blanco extracten van niet blootgestelde passieve samplers, en de controle voor cytotoxiciteit (effecten op celgroei, conditie en overleving van de cellen) in bioassays op basis van cellijnen (*in vitro*).

2. Keuzehulp

Bij verschillende vragen (kennisbehoefte) passen verschillende interpretatiemogelijkheden (aanpak). Met de keuzehulp hieronder kunnen gebruikers bepalen welke aanpak het beste past bij hun kennisbehoefte. In de hierop volgende secties worden de verschillende aanpakken toegelicht.

Kennisbehoefte	Geschikte aanpak(ken)
Ik wil weten of de effecten van stoffen in mijn watersysteem / drinkwaterbron gedetecteerd worden door bioassays	Wel of geen meetbaar effect
Ik wil weten of risico's van stoffen in mijn watersysteem / drinkwaterbron verlaagd zijn na aanvullende zuivering	Trendanalyse i.c.m. Effect-sigitaalwaarden
Ik wil weten hoe risico's van stoffen in mijn watersysteem / drinkwaterbron variëren over verschillende locaties	Trendanalyse i.c.m. Effect-sigitaalwaarden
Ik wil weten in hoeverre de risico's van stoffen in mijn watersysteem / drinkwaterbron variëren in de tijd	Trendanalyse i.c.m. Effect-sigitaalwaarden
Ik wil weten of concentraties van microverontreinigingen geassocieerd zouden kunnen zijn met een mogelijk risico	Effect-sigitaalwaarden
Ik wil weten welke stoffen de bioassay effecten, en dus de potentiële (eco)toxicologische risico's in mijn watersysteem veroorzaken	Vervolganalyses

3. Effect-sigitaalwaarden

Bioassays zijn vaak gevoeliger dan de detectielimieten van chemische analyses, en meten ook effecten van stoffen bij concentraties die lager zijn dan die waar risico's voor mens en milieu verwacht kunnen worden. Daarom worden de bioassay responses gebruikelijk vergeleken met effect-sigitaalwaarden (ESW) die het verschil tussen acceptabele en ontoereikende waterkwaliteit aangeven. Dit werd ook gedaan in de ESFT1. Een ESW (of *trigger value*) geeft aan vanaf welke bioassay respons een risico voor mens of milieu (afhankelijk van de vraag) niet uit te sluiten is. ESWs kunnen zijn afgeleid door middel van diverse methoden (Tabel 1).

Er zijn ESWs ontwikkeld die gebaseerd zijn op verschillende uitgangspunten, zoals humane toxiciteit, milieukwaliteit of waterkwaliteitsnormen, en de achtergrondwaarden op relatief schone locaties. De ESWs voor specifieke werkingsmechanismen kunnen worden afgeleid voor specifieke bioassays. Voor verschillende bioassays met hetzelfde werkingsmechanisme kunnen de ESWs dus anders zijn, omdat gevoeligheden van die assays en de relatieve potenties van stoffen daarin kunnen variëren.

Overigens is het niet zeker dat een ESW het risico van een mengsel van nieuwe, onbekende stoffen goed kan voorspellen, bijvoorbeeld omdat de gebruikte ESWs zijn gebaseerd op informatie van een beperkte set bekende stoffen, terwijl voor veel nieuwe, onbekende stoffen de toxiciteitsdata ontbreken en/of de respons van de bioassay op die stof onbekend is. Daarnaast kan de blootstelling aan een *in vitro* bioassay sterk verschillen van de daadwerkelijke blootstelling (biobeschikbaarheid) in de mens of organismen in een ecosysteem. Bovendien gelden de algemene beperkingen van *in vitro* bioassays dat de (*in vivo*) invloeden van adsorptie (opname), distributie (verdeling over het lichaam), metabolisme (omzettingen) en excretie (uitscheiding), ook bekend als ADME, niet worden meegenomen.

Voor sommige bioassays zijn nog geen ESWs beschreven. Deze kunnen door experts worden afgeleid op basis van bestaande of zo nodig nieuw verzamelde gegevens van individuele stoffen (Béén et al. 2021). Als voor een bioassay een ESW is beschreven, kan het zijn dat deze een andere eenheid heeft dan die waarin de respons van de test is uitgedrukt. Het is enerzijds mogelijk om de experimentele opzet van de bioassay aan te passen zodat de eenheid overeen komt met de ESW, anderzijds is het meestal mogelijk om de bioassay respons met aanvullend onderzoek om te rekenen naar de gewenste eenheid.

Het is wetenschappelijk gezien onmogelijk om de perfecte ESW te ontwikkelen zonder mogelijke over- of onderschattingen van de risico's voor mens en milieu. Het risico wordt onderschat als er voor de mens of het ecosysteem toxische concentraties van stoffen met een lage potentie in de bioassay aanwezig zijn die daardoor een effect onder de ESW geven. De kans op onderschattingen wordt kleiner als er een batterij bioassays wordt gebruikt met veel verschillende eindpunten (werkingsmechanismen). Het risico wordt overschat als er met *in vitro* bioassays (celkweek) een sterk effect boven de ESW wordt waargenomen door stoffen die in de praktijk vrijwel niet worden opgenomen door mensen of biota. Dit is de reden dat ESWs doorontwikkeld en soms bijgesteld worden aan de hand van nader chemisch en toxicologisch onderzoek, net als normen voor individuele stoffen.

Tabel 1. Verschillende uitgangspunten voor het berekenen van effect-sigitaalwaarden (trigger values).

Context	Uitgangspunt	Referentie
KWR	veilige dagelijkse inname	Brand et al. 2013
Waterhergebruik in Australië	richtwaarden voor humaan gezondheidsrisico	Escher et al. 2015
EU (SOLUTIONS)	EQS milieukwaliteitsnormen van de KRW	Escher et al. 2018
SIMONI voor ESF Toxicologie	Soortgevoeligheidsverdeling, achtergrondwaarden (schone locaties) en ecotoxiciteit database	Van der Oost et al. 2017
Praktijk signaalwaarden	Database met CALUX analyses in watermonsters	Besselink, niet gepubliceerd
BTO (KWR)	(Voorlopige) drinkwaternormen	Been et al. 2021

Voor sommige bioassays zijn meerdere ESWs vastgesteld (Tabel 2). Een eerste uitgangspunt voor drinkwater zou kunnen zijn om de laagste gepubliceerde humane ESW toe te passen. Het is altijd verstandig om te bezien welke ESW het best toepasbaar is voor het voorliggende waterkwaliteitsvraagstuk. In de ESFT2 is een nieuwe standaard set bioassays met daarbij passende ESWs ontwikkeld. Deze aanpak bouwt voort op de ESFT1, en past de meest recente inzichten in effectgebaseerde monitoring toe. Hierdoor wordt een verfijning van de risicobeoordeling van de chemische waterkwaliteit bewerkstelligt ten opzichte van de SIMONI aanpak, die gebruikers beter in staat stelt de resultaten te interpreteren. Hiervoor is een online tool ontwikkeld die het gebruiksgemak optimaliseert. Mochten er bioassays worden toegepast die buiten de basisset vallen, of indien er vraag is naar een alternatieve aanpak, dan zijn er mogelijke alternatieve interpretaties van de overall milieurisico's op basis van bioassays beschikbaar. Deze worden besproken in sectie 3.

Tabel 2. Bekende effect-siginaalwaarden voor ecologie en humane risico's.

Bioassay	spec	unit	SIMONI 1.2	Escher 2018	Neale 2020	Brion 2019	Besselink 2018	Brand 2013	Escher div	Besselink 2017	Been 2019?
			Ecology	Ecology	Ecology	Ecology	Ecology	Human	Human	Human	Human
Algemeen											
Daphniatoxkit	field	% mortality	20								
Microtox	5-30m	TU/L	0,05	0,1					0,33		
Algatoxkit	72h	TU/L	0,05	0,004							
Daphniatoxkit	48h lab	TU/L	0,05	0,03							
Cytotox CALUX		TU/L	0,05								
Specifiek											
ER CALUX		ng EEQ/L	0,5	0,1		0,28	1,6	3,8	0,2	1,1	0,25
Anti-AR CALUX		µg FluEQ/L	25	14,4			10				4,8
GR CALUX		ng DexEQ/L	100				56	21	150	56	48
a-PR CALUX		ng R486EQ/L	13*	1,31			1,4				
PXR CALUX		µg NicEQ/L	3	54			66				
DR CALUX (no silica)		pg TEQ/L	50				110				
PAH CALUX		ng BaPEQ/L	150	6,4	4,3		320				24*
PPARg CALUX		ng RosEQ/L	10	36 (GBLA)	19 (GBLA)		91				
RIKILT WaterSCAN	A	ng NeoEQ/L	500								
	M&B	ng PenEQ/L	50								
	S	ng SulEQ/L	100								
	T	ng OxyEQ/L	250								
	Q	ng FlqEQ/L	100								
Reactief											
Nrf2 CALUX		µg CurEQ/L	10	41,2	222 (ARE)		93		0,16 TU		16000*
P53 CALUX		GTU/L	0,005				10 ActEQ/L				54 AAFEQ µg/
P53 CALUX+S9		GTU/L	0,005				170 CPPEQ/L				
Overig											
AR CALUX		ng DHTEQ/L					31,8	11		32	4,5
PR CALUX		ng OrgEQ/L					0,46	333			16
Algea PAM	2h	TU (=1/REF)		0,02							
Fish embryo toxicity	96h	TU mortality		0,03							

*: derived from Escher (MixFactor 1000x)

4. Alternatieve interpretatie methoden

4.1. Wel of niet meetbaar effect

De meest eenvoudige methode is het maken van een onderscheid tussen het wel of niet optreden van meetbare effecten, waarbij het onderscheid bepaald wordt door de gevoeligheid van de betreffende assay en een gedefinieerde limiet van kwantificatie (detectiegrens), de laagste uitslag die betrouwbaar kan worden bepaald. Ook kunnen locaties gerangschikt worden van lage naar hoge respons. Deze methodiek is bijvoorbeeld goed toepasbaar voor een eerste prioriteringsstap qua locaties o.b.v. chemische verontreiniging, of het duiden van mogelijke effecten op ecologische modelsoorten. Met deze methode is het echter niet mogelijk een indicatie van de risico's voor mens en milieu te geven.

4.2. Trendanalyses

Trendanalyses (worden responsen hoger of lager) kunnen inzicht geven in het gedrag van stoffen in een watersysteem, in de tijd of onder invloed van zuiveringsprocessen. Omdat voor de trendanalyses vergelijkingen worden gemaakt tussen verschillende metingen is het belangrijk dat de bemonstering, extractie en bioassay analyse voor alle meetpunten op precies dezelfde manier worden uitgevoerd. Als alleen trends in bioassay responsen als maat voor aanwezigheid van stoffen worden bepaald, zonder dat een analyse van ecologische of humane risico's wordt uitgevoerd, is de vergelijking met ecologische of chemische data hier niet belangrijk.

5. Vervolanalyses

Op het moment dat bioassays effecten laat zien, maar het niet duidelijk wordt door welke stoffen of stofgroepen deze effecten worden veroorzaakt, is het mogelijk aanvullende analyses uit te voeren die kunnen helpen om de drijvers van toxiciteit te identificeren.

5.1. Non-target screening

Non-target screening is een innovatieve methode die in staat is om nieuwe kandidaatstoffen aan te wijzen die opgenomen zouden moeten worden in stoffenlijsten voor chemische monitoring. Het uitvoeren, uitwerken en interpreteren van non-target screening vergt specialistische kennis. Door ontwikkelingen in de data-analyse software en open-source workflows worden onbekende stoffen steeds sneller geïdentificeerd. Non-target screening data kan op verschillende manieren worden geanalyseerd:

1. Onbekende pieken methode: hieruit kan informatie worden verkregen over (verandering in) semi-kwantitatieve concentraties en polariteit (hydrofobiciteit).
2. Suspects methode: in deze methode worden pieken vergeleken met stoffen op suspect-lijsten van bijvoorbeeld voor het (aquatisch) milieu relevante stoffen of de zeer zorgwekkende stoffen.
3. Trend methode (patronen in de data): deze methode geeft informatie over verandering in waterkwaliteit (op korte en lange termijn) en effectiviteit van waterbehandeling, waarbij groepen van stoffen kunnen worden onderscheiden die niet worden verwijderd, wel worden verwijderd, of worden gevormd tijdens de waterbehandeling.

De chemische identiteit van een in non-target screening aangeduide suspect stof moet nog worden bevestigd door middel van chemisch-analytische methoden. Indien voldoende monstermateriaal wordt verzameld kunnen op de watermonsters die effecten veroorzaken in de bioassays non-target screening worden uitgevoerd. Als specifieke en relevante bioassay responsen worden gemeten én suspects aanwezig zijn met dit werkingsmechanisme (informatie daarover is beschikbaar bij aanbieders van bioassays, de EPA ToxCast database en in de literatuur), kan gekeken worden welk aandeel van de bioassay respons verklaard kan worden met de gemeten stofconcentraties. Op deze manier kunnen belangrijke drijvers van toxiciteit geïdentificeerd worden. Ook zijn deze stoffen kandidaten om toe te voegen aan een meetprogramma (bijvoorbeeld voor het Chemie-spoor van de vernieuwde Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit).

5.2. Effect-gestuurde analyse (EDA)

Non-target screening kan ook direct gekoppeld worden aan bioassays om de stoffen die verantwoordelijk zijn voor een gemeten effect in een bioassay op te sporen. Deze geavanceerde methodiek wordt effect-gestuurde analyse genoemd (EDA: effect-directed analysis). In de methode wordt het complexe mengsel van stoffen dat aanwezig is in een concentraat van een watermonster opgedeeld in verschillende delen (fracties). Deze fracties kunnen enerzijds worden geanalyseerd middels non-target screening, en worden paralell daaraan getest in de bioassay om te onderzoeken in welke fractie de voor het effect verantwoordelijke stof(fen) aanwezig is/zijn. Vervolgens kunnen deze toxische stoffen geïdentificeerd worden, en kunnen

hun concentraties bepaald worden met chemische doelstofanalyses EDA methode is momenteel nog in ontwikkeling, maar wordt al toegepast in de praktijk. Voor een voorbeeld toepassing zie Houtman et al., 2021.

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 kennisinstituten 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

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. *Environ Int.* 2013 May;55:109-18. doi: 10.1016/j.envint.2013.02.003.

BTO rapport 2017.008 Effect based monitoring with bioassays - a roadmap.
<https://library.kwrwater.nl/publication/55476679/>.

Chapman, 2000. Whole effluent toxicity testing—usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3–13. DOI:
<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/etc.5620190102>

De Baat M.L., M.H.S. Kraak, R. Van der Oost, P. De Voogt en P.F.M. Verdonshot, 2019. Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. *Wat. Res.* 159: 434-443.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.040>

De Baat, M. L., Van der Oost, R., Van der Lee, G. H., Wieringa, N., Hamers, T., Verdonshot, P. F. M., ... & Kraak, M. H. S. (2020). Advancements in effect-based surface water quality assessment. *Water research*, 183, 116017.

Dingemans MM, Baken KA, van der Oost R, Schriks M, van Wezel AP. Risk-based approach in the revised European Union drinking water legislation: Opportunities for bioanalytical tools. *Integr Environ Assess Manag.* 2019 Jan;15(1):126-134. doi: 10.1002/ieam.4096.

Escher BI, Aït-Aïssa S, Behnisch PA, Brack W, Brion F, Brouwer A, Buchinger S, Crawford SE, Du Pasquier D, Hamers T, Hettwer K, Hilscherová K, Hollert H, Kase R, Kienle C, Tindall AJ, Tuerk J, van der Oost R, Vermeirssen E, Neale PA. Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. *Sci Total Environ.* 2018 Jul 1;628-629:748-765. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.340.

Escher BI, Neale PA, Leusch FD. Effect-based trigger values for in vitro bioassays: Reading across from existing water quality guideline values. *Water Res.* 2015 Sep 15;81:137-48. doi: 10.1016/j.watres.2015.05.049.

Houtman CJ, Brewster K, Ten Broek R, Duijve B, van Oorschot Y, Rosielle M, ... & Steen RJ. Characterisation of (anti-) progestogenic and (anti-) androgenic activities in surface and wastewater using high resolution effectdirected analysis. *Environment International* 2021, 153, 106536.

van der Oost R, Sileno G, Suárez-Muñoz M, Nguyen MT, Besselink H, Brouwer A. SIMONI (smart integrated monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part i-model design and effect-based trigger values. *Environ Toxicol Chem.* 2017 Sep;36(9):2385-2399. doi: 10.1002/etc.3836.