

## **Sleutelfactor Toxiciteit**



### **Achtergronddocument Basis-Set Bioassay Selectie**

#### **Achtergronddocument beschikbare kennis bij de sleutelfactor Toxiciteit**

**Auteurs:**

T. E. Pronk (KWR water)  
M.L. de Baat (KWR water)  
S.J.P. van den Berg (WEnR)  
R. van der Oost (Waternet)

Contact: [tessa.pronk@kwrwater.nl](mailto:tessa.pronk@kwrwater.nl)

**Datum: 21 december 2021**

Bij verwijzing naar deze notitie graag de volgende gegevens gebruiken:

Pronk, T.E., M.L. de Baat, S.J.P. van den Berg, R. van der Oost (2021). Achtergronddocument Basis-Set Bioassay Selectie. Achtergronddocument beschikbare kennis bij de sleutelfactor Toxiciteit. Versie 1, 21 december 2021. KIWK-Toxiciteit Notitie. Amersfoort, Nederland. Kennis Impuls Water Kwaliteit.

## **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 kennisinstellingen 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.*

*Dit stuk is geschreven door Tessa Pronk (KWR water), Milo de Baat (KWR water), Sanne van den Berg (WenR), Ron van der Oost (Waternet) en data is geleverd door Leo Posthuma (RIVM), Esther van der Grinten (RIVM), Evert-Jan van den Brandhof (RIVM), Jaap Slootweg (RIVM), Anja Derksen (AD eco advies).*

*Waardevolle input op de inhoud is in verschillende stadia van het onderzoek gegeven door Jaap Postma (Ecofide), Anja Derksen (AD eco advies), Gerda Valkering (Waterschap Hunze en Aa's), Gerard Rijs (RWS-WVL), Arjan Verhoef (Waterschap Drents Overijsselse Delta), Leo Posthuma (RIVM), Stefan Kools (KWR water), Milou Dingemans (KWR water), Thomas ter Laak (KWR water).*

## Inhoudsopgave

Colofon .....	2
Inhoudsopgave.....	3
Samenvatting .....	4
1 Inleiding.....	5
2 Wetenschappelijke basis mechanismen.....	6
3 Analyse op basis van verzamelde gegevens .....	10
3.1 Respons ten opzichte van effect signaal waarden.....	10
3.2 Specificiteit van de bioassays .....	13
3.3 Overlap van stoffen die reageren tussen bioassays.....	15
3.4 Respons specificiteit van bioassays ten opzichte van elkaar .....	16
3.5 Kwantificatielimiet (limit of quantification, LOQ) en kosten .....	17
4 Keuze van bioassays voor standaard-toepassing in Nederland .....	19
5 Conclusie .....	25
6 Referenties .....	26
Bijlage A.....	27
Bijlage B.....	28

## Samenvatting

In Nederland is het water verontreinigd met een complex mengsel van microverontreinigingen. Om te weten welke precies, kunnen metingen gedaan worden. Een aanvulling op chemische metingen zijn metingen met bioassays. Door het gebruik van bioassays kunnen de effecten van het mengsel onderzocht worden. Het nog niet vastgelegd welke bioassays hiervoor het beste geschikt zijn. Na ervaringen en data-analyse van in Nederland uitgevoerde bioassays is geconcludeerd dat een gebrek aan standaardisatie van bioassays, monsternamen en voorbewerking een robuuste vergelijking van het inschatten van effecten bemoeilijkt. Dit document beschrijft de analyse van beschikbare informatie om tot een toepassingsgerichte set bioassays te komen voor beoordeling van de waterkwaliteit in Nederland. De bioassays in de set kunnen ingezet worden voor diverse vormen van waterkwaliteitsbeoordeling. Het uitgangspunt is een zo breed mogelijke dekking van verschillende mechanismen die toxische effecten veroorzaken. Daarnaast is gekeken naar bioassays waarmee relatief veel ervaring binnen Nederland is opgedaan en responsief zijn in oppervlaktewater, afvalwater en drinkwater. De kleinste bioassay set die een zo divers mogelijk palet aan mechanismen kan helpen beoordelen, en waar veel ervaring mee is opgedaan, is de 'basis'-set genoemd. De bioassays die in principe ook geschikt zijn maar vanwege kosten niet in de basis-set zijn gekomen, zijn ook in beeld gebleven. Dit zijn bioassays die de basis-set aanvullen, of responsen binnen het brede werkingsmechanisme kunnen bevestigen en zijn opgenomen onder de set 'extra inzicht/aanvullend'. Bioassays die mogelijk interessant zijn voor toepassing in waterkwaliteitsbeoordeling maar op dit moment nog niet vaak zijn ingezet zijn opgenomen onder de set 'experimenteel'. De samenstelling van de voorgestelde toepassingsgerichte set bioassays sluit niet uit dat andere bioassays ook relevant kunnen zijn. De bioassays in deze sets zijn op basis van de momenteel beschikbare informatie uitgekozen vanwege hun geschiktheid om effecten in water te detecteren.

## 1 Inleiding

Om de mogelijke eco- en humaantoxicologische effecten van water dat verontreinigd is met een complex mengsel van microverontreinigingen in beeld te krijgen, kan gebruik worden gemaakt van biologische testen (bioassays). Als gevolg van de complexe chemische mengsels is één bioassay niet toereikend om alle effecten die door deze mengsels kunnen worden geïnduceerd te meten. Daarom wordt het gelijktijdig toepassen van een batterij aan bioassays internationaal aanbevolen om de waterkwaliteit betrouwbaar te kunnen meten (GWRC, 2020; EC, 2021, Wernersson et al., 2015; Napierska et al., 2018).

Het heeft een aantal voordelen als eenzelfde batterij van bioassays ingezet wordt door verschillende partijen. Enerzijds voorkomt dit dat er wordt geïnvesteerd in het uitvoeren van overbodige bioassays, en anderzijds draagt dit bij aan een standaardmethodiek die door alle gebruikers op eenzelfde manier wordt toegepast en daarmee onderzoeksresultaten vergelijkbaar maakt. Uiteraard zal een praktisch toepasbare beperkte set bioassays niet alle mogelijke (combinaties van) stoffen en effecten kunnen afdekken. Toch zal de set een belangrijk deel van de stoffen en effecten moeten kunnen signaleren en zal deze ook indicaties geven wanneer meer diepgaand vervolgonderzoek, zowel chemisch- als bioanalytisch, nodig is.

In dit achtergronddocument worden drie sets bioassays voor de beoordeling van de chemische waterkwaliteit voorgesteld: één voor afvalwater, één voor (de productie van) drinkwater en één voor oppervlaktewater. Voorgesteld wordt dat de voorgestelde sets landelijk door waterbeheerders worden toegepast in de periode na de Kennis Impuls Water Kwaliteit, waarbij de toepassing verder wordt begeleid door een groep van personen die betrokken is bij de uitvoering: een Community of Practice (CoP) zoals deze ook wordt ingezet in andere initiatieven in de watersector.

Door de inzet van bioassays die een groot scala aan werkingsmechanismen vertegenwoordigen wordt een aanvulling in waterkwaliteitsbeoordeling tot stand gebracht. De huidige beoordeling is (via chemische analyses) gericht op individuele beoordeling van ca. 150 afzonderlijke stoffen (0,2% van de stoffen die in Europa in de handel zijn). Door de standaardisatie en de samenwerking in de CoP wordt beoogd een doorbraak te bewerkstelligen in het toepassen, interpreteren en gebruiken van bioassay-gegevens voor bescherming en verbetering van de waterkwaliteit. Onderzoek aan een grote dataset met bioassay-gegevens die over de afgelopen decennia zijn verzameld toonde namelijk dat het ontbreken van standaardisatie belemmerend werkte op de inzet van bioassays bij het wegnemen van de onzekerheden rond het grote aantal stoffen en mengsels dat in water kan voorkomen.

De selectie van de bioassays in de basis-set bioassays heeft op basis van drie stappen plaatsgevonden:

1. Wetenschappelijke basis met betrekking tot toxische mechanismen
2. Analyse op basis van verzamelde gegevens (chemische dekking, responsdata)
3. Praktische uitvoerbaarheid (ervaring, kosten)

## 2 Wetenschappelijke basis mechanismen

Het voornaamste doel voor een set van bioassays is dat de risico's van een zo breed mogelijk spectrum aan stoffen, met verschillende werkingsmechanismen, kunnen worden gedetecteerd.

Uit eerdere ervaringen met afvalwaterlozingen en oppervlaktewater is gebleken dat organische microverontreinigingen opgedeeld kunnen worden in hun verschillende werkingsmechanismen. De Global Water Research Coalition (GWRC) heeft recent veel werk bijeengebracht over bioassays met eenzelfde doel en is voor dit project dan ook een goede bron van informatie. Zo selecteerde de GWRC recent de werkingsmechanismen waarvan effecten vaak in watermonsters worden gedetecteerd (GWRC, 2020):

- i) hormoonreceptor-gemedieerde effecten
- ii) activering van de omzetting van lichaamsvreemde stoffen (xenobiotisch metabolisme)
- iii) adaptieve stress responsen (oxidatieve stress en DNA beschadiging)
- iv) apicale effecten zoals schade aan cellen (cytotoxiciteit), groeiremming en sterfte

ad i) Hormonale routes zijn essentieel voor processen in verband met groei, seksuele ontwikkeling, metabolisme en homeostase. Hormoon ontregelende chemische stoffen, waaronder synthetische hormonen, industriële chemicaliën en pesticiden, kunnen hormonale systemen verstoren door een wisselwerking met hormoon receptoren. Zowel activering en remming van hormoonreceptoren kan ontregelend werken (Neale et al., 2020).

ad ii) Het xenobiotisch metabolisme helpt om schadelijke chemicaliën om te zetten. De aanwezigheid van chemische stoffen kan biotransformatieprocessen activeren. Assays die via receptoren effecten op het metabolisme van xenobiotica kunnen detecteren zijn gevoelige indicatoren van chemische stoffen. Veel receptoren kunnen een breed scala van chemicaliën binden (Neale et al., 2020).

ad iii) Adaptieve stressresponsroutes worden geactiveerd om cellen te helpen hun homeostase te herstellen na schade door stressfactoren, waaronder organische chemicaliën. Reactieve toxiciteit treedt op wanneer chemicaliën covalente bindingen vormen met DNA, eiwitten en membraan lipiden. Als het doelwit DNA is, kunnen genototoxiciteit en mutageniteit het gevolg zijn (Neale et al., 2020).

ad iv) Apicale effecten in organismen zoals mortaliteit, groei en ontwikkeling zijn eindpunten die door meerdere verschillende toxiciteitspaden kunnen worden veroorzaakt (Neale et al., 2020). Deze testen integreren dus de druk van diverse chemicaliën. Bij inzet van organismen van verschillende trofische niveaus als bioassay kan de toxische druk op het waterleven worden ingeschat.

De GWRC beveelt vanuit hun studies aan dat een praktische, minimale testbatterij in ieder geval bioassays zou moeten bevatten die wijzen op activering van de arylkoolwaterstofreceptor (AhR), activering van de estrogenreceptor (ER) en oxidatieve stressrespons (de gele balk in Figuur 1). Deze drie eindpunten reageren namelijk op een breed

scala chemicaliën, aanwezig in een grote reeks watertypen (afvalwater, oppervlaktewater, drinkwater), zoals aangetoond door tests. Het is een voordeel als voor verschillende watertypen dezelfde bioassays toegepast kunnen worden omdat daarmee stadia (van afvalwater naar oppervlaktewater naar drinkwater) in de watercyclus ook vergeleken kunnen worden. Het zijn ook vaak toegepaste assays: in 27%, 77% en 21% van de door de GWRC geëvalueerde studies worden assays toegepast die respectievelijk wijzen op activering van de AhR, activering van het ER en oxidatieve stressrespons.

Ook anderen kwamen tot een selectie van deze mechanismen. Deze aanbeveling sluit aan bij aanbevelingen voor het testen van de kwaliteit van oppervlaktewater (Brack et al., 2019). Voor het evalueren van zuiveringsefficiëntie in rioolwaterzuiveringsinstallaties waren eerder bioassays voor deze mechanismen aanbevolen, alleen zonder oxidatieve stressrespons (Postma, 2020) omdat dit zuiveringstechnieken die gebruik maken van vergaande oxidatie zal benadelen in de evaluatie. Dit is echter geen reden om deze weg te laten als het doel het beoordelen van de afvalwaterkwaliteit is. De set (oxidatieve stress, AhR activatie, ER activiteit) is succesvol toegepast voor drinkwater door bijvoorbeeld Yu et al., 2021. Bij deze set was, in aanvulling, ook AR activiteit en genotoxiciteit gemeten.

Speciaal voor drinkwater is het belangrijk om in aanvulling van bioassays voor deze selectie van mechanismen tests toe te passen die desinfectie bijproducten (DBPs) detecteren (blauwe balk in Figuur 1). Hiervoor zijn tests geschikt die wijzen op adaptieve stress responsen. Bioassays met oxidatieve stress respons kunnen eigenlijk niet goed in de plaats komen van mutageniteits- of genotoxiciteitstests (met traditionele bacteriële tests zoals de Ames-test of de umuC-test), maar zullen vaak ook worden geactiveerd door genotoxische chemische stoffen, niet alleen die met directe reactieve toxiciteit. Het mechanisme p53 detecteert vooral stoffen die indirecte genotoxiciteit veroorzaken via de oxidatieve stress route (Stalter et al., 2016).

Als men vollediger wil zijn, beveelt de GWRC (2020), naast de praktische set, een uitgebreidere set bioassays aan. Hierbij worden tests genoemd die verandering in de werking van specifiekere of weer net andere mechanismen kunnen detecteren binnen de vier hoofdroutes. Het gaat hier om de androgeen receptor (AR), de glucocortoid receptor (GR), de progesteron receptor (PR), p53 transcriptie factor (p53), nf-kb transcriptie factor (NfKb), de peroxisoom proliferator receptor (PPAR) en de pregnane X receptor (PXR) en voor effecten op waterorganismen *in vivo* testen op meerdere trofische niveaus (Daphnia, vis, en alg) (zie de groene balk, Figuur 1).

Test Battery	Water Type	Bioassays
Minimal (e.g. no laboratory access)	All	Bacterial toxicity
Practical	Wastewater/ recycled water	ER, Oxidative Stress, AhR
Practical + DBP	Drinking water	ER, Oxidative Stress, Mutagenicity/genotoxicity, AhR
Comprehensive	All	ER, AR, GR, PR
		Oxidative Stress, p53, NF-κB
		AhR, PPAR, PXR
		Fish embryo toxicity, Daphnia immobilization, Algal growth inhibition

xenobiotic metabolism; hormone receptor-mediated effects; **adaptive stress responses**; apical effects  
 AhR: aryl hydrocarbon receptor; AR: androgen receptor; ER: estrogen receptor; GR: glucocorticoid receptor;  
 PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; PXR: pregnane X receptor; PR: progesterone receptor

Figuur 1. Aanbevolen te monitoren mechanismen via bioassays door GWRC (2020) met een 'praktische set' voor afvalwater ('wastewater'), oppervlaktewater ('recycled water') en drinkwater ('drinking water'), en een aanvullende set bioassays ('comprehensive') als kosten niet limiterend zijn.

Met de aanbeveling van de GWRC kunnen risico's van een breed spectrum aan stoffen, met verschillende werkingsmechanismen worden gedetecteerd. Welke bioassays hierbij succesvol ingezet kunnen worden is een volgende vraag. Niet alle bioassays zijn even gevoelig of specifiek. Om te voorkomen dat een bioassay wordt ingezet die later niet nuttig blijkt, is het efficiënt om bioassays te kiezen waar ervaring mee is opgedaan.

In de Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit 1 (ESFT1) werd de basis gelegd voor een structurele toepassing van bioassays in waterkwaliteitsbepaling in Nederland. Op basis van de Smart Integrated MONItoring (SIMONI) strategie (van der Oost et al., 2017) werd een selectie bioassays voorgesteld die toegepast kan worden om een breed scala aan microverontreinigingen in oppervlaktewater te monitoren. De SIMONI set bestaat uit 14 verschillende *in vivo* en *in vitro* bioassays en een *in situ* assay die op locatie uitgevoerd dient te worden. In aanvulling op de mechanismen die ook door de GWRC worden aanbevolen heeft de SIMONI set ook een bioassay voor vijf klassen antibiotica.

Bioassays die horen bij mechanismen in beide bronnen (GWRC en SIMONI) zijn als uitgangspunt genomen voor een selectie voor een set van bioassays die in de praktijk ingezet kan worden voor de Nederlandse situatie. Een aanvulling hierop zijn bioassays die stoffen detecteren die de Thyroid receptor activeren, omdat deze onder anderen PFAS kunnen detecteren en dit een zeer actuele groep stoffen is. Een tweede uitzondering is het mechanisme van neurotoxiciteit. Dit mechanisme zit niet in de selectie van de GWRC en ook



niet in de SIMONI set maar is wel relevant omdat chemische stoffen neurologische effecten kunnen veroorzaken.

Om te zien of er bepaalde bioassays zijn die op het eerste oog meer prioriteit voor daadwerkelijke toepassing in Nederland hebben dan anderen doen we in het volgende hoofdstuk enkele analyses op beschikbare gemeten responsdata van bioassays voor de verschillende werkingsmechanismen. Ook kijken we naar de stoffen waar de bioassays in principe op zouden moeten kunnen reageren en beoordelen daarmee de chemische dekking van de bioassays ten opzichte van elkaar.

Noot: als men specifieke stoffen wil detecteren, kan de [maatwerk bioassay tool](#) assisteren in het selecteren van een geschikt bioassay.

## 3 Analyse op basis van verzamelde gegevens

### 3.1 *Respons ten opzichte van effect signaal waarden*

Om tot een basis-set bioassays te komen die relevant is voor Nederlandse wateren hebben we een analyse gedaan op responsen uit een grote dataset bioassays uitgevoerd op specifiek Nederlandse watermonsters. Deze monsters zijn genomen van oppervlaktewater, en water afkomstig uit verschillende stadia van rioolwaterzuivering. De dataset heeft als nadeel dat bijna alle bioassay responsen zijn gemeten na ‘passive sampling’, waarbij materiaal dat microverontreinigingen opneemt voor langere tijd in water is geplaatst. Deze methode heeft nadelen voor deze analyse omdat het niet alle stoffen even goed opneemt en onzekerheid kent in het schatten van het watervolume dat is langs gestroomd. Voor de SleutelFactor Toxiciteit 2 (SFT2) worden steekmonsters (of nog beter: mengmonsters van meerdere steekmonsters) aanbevolen in combinatie met extractie van de chemicaliën en dit kan andere resultaten geven. Daarom hebben we als aanvulling een analyse van Neale et al. 2020 meegenomen, die alleen resultaten met steekmonsters heeft verzameld, al is dit niet exclusief in Nederland en gaat deze per mechanisme over meerdere bioassays het hetzelfde werkingsmechanisme.

Daarnaast maken we gebruik van ‘effect signaal waarden’ (ESW). Deze ESW geven idealiter een grens aan waarboven risico niet kan worden uitgesloten. Dit wordt vastgesteld aan de hand van responsen van een bioassay op individuele stoffen bij concentraties die (bijna) schadelijk zijn voor waterorganismen of mens. Voor de ESW voor oppervlaktewater kan deze waarde op verschillende manieren afgeleid worden. Voor SFT2 is er voorkeur voor gebruik van de soortengevoeligheidsverdeling (de species sensitivity distribution, SSD) zoals gerapporteerd in het werk van Van der Oost (2017). Deze SSD geven het verband aan tussen potentieel aangetaste fractie soorten (PAF) en bioassay responsen. De ESW die op deze manier worden afgeleid kunnen qua risicobeoordeling goed vergeleken worden met de meerstoffen (ms) PAF die wordt gehanteerd in het Chemie-spoor van de SFT2. Voor de interpretatie van humane risico’s wordt de ESW vaak afgeleid als de respons die hoort bij de laagste waarde waarbij een stof die een reactie geeft in de bioassay geen verwacht effect heeft op humane gezondheid bij het drinken van twee liter water per dag een leven lang, zoals in Béen et al. (2021).

Helaas is de respons van sommige bioassays in de praktijk structureel hoger dan de op deze manier afgeleide ESW. Enerzijds is het mogelijk dat de waterkwaliteit met betrekking tot de stoffen die reageren in deze bioassays simpelweg inderdaad vaak niet goed is. De respons zou namelijk betekenen dat een groot deel van de soorten aangetast is en het humaan risico te hoog is. Dat is naar verwachting niet de realiteit in alle wateren, ook in water met een goede ecologische status worden namelijk zulke hoge responsen gevonden. Waarschijnlijker is de optie dat er stoffen effect geven in de bioassay die in de praktijk niet schadelijk zijn. Voor de anti-AR bioassay is dit dan ook waarschijnlijk de reden van de verhoogde respons. De groep verbindingen waarvan bekend is dat ze anti-androgene potenties hebben, is groot en heterogeen en omvat polychloorbifenylen, pesticiden en geneesmiddelen (bv. flutamide), maar ook natuurlijk organisch materiaal en humuszuren die als niet-toxisch worden beschouwd en mogelijk leidt tot vals-positieve resultaten. Dit maakt het ingewikkelder om een ESW-waarde af te leiden en overschrijding daarvan te interpreteren. Het is raadzaam om

beter inzicht te krijgen in de verbindingen die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de reacties. Als de verbindingen kunnen worden geïdentificeerd, kan een meer specifieke risicobeoordeling worden uitgevoerd en kan de ESW als bijgevolg hiervan worden aangepast om realistische risico's weer te geven (Béén et al., 2021). In termen van risico kan niet gezegd worden dat de bioassay respons bij een bepaalde PAF hoort of een humaan risico impliceert. De verhouding tussen schadelijke en niet – schadelijke stoffen die de respons veroorzaakt is immers onbekend voor een specifieke locatie. Wat wel gesteld kan worden is, hoe hoger de bioassay respons boven een achtergrondwaarde, hoe hoger de kans dat *ook* schadelijke stoffen de bioassay activeren. Daarom is de ESW in dat geval in studies uit de wetenschappelijke literatuur vermenigvuldigd met een ‘mixture factor’ of opgehoogd met een ‘achtergrond concentratie’ zoals gemeten in wateren met een goede ecologische status. Dan geeft de aldus aangepaste ESW in ieder geval een waarde aan die hoger is dan de achtergrond respons.

Het kan ook zijn dat de respons van sommige bioassays in de praktijk van de Nederlandse situaties altijd lager is dan de afgeleide ESW PAF of humane gezondheidsrisico ESW. De mogelijkheid dat de groep stoffen in de praktijk geen probleem vormt moet in dat geval overwogen worden. Deze bioassays hebben om die reden minder prioriteit om ingezet te worden.

Als voornaamste bron voor afgeleide ESW in de literatuur nemen we de verzameling ESW van GWRC (2020). In Tabel 1 vatten we samen of er een ESW beschikbaar is, en hoe deze zich relateert aan de respons data.

*Tabel 1. Overzicht van de bioassays in SFT1 en aanbevolen mechanismen door de GWRC, het bestaan van ESW en de praktijk respons ten opzichte van de ESW. ‘PAF’ zijn de waarden van de bioassay respons die horen bij 5% potentieel aangetaste fractie soorten volgens een SSD curve (van der Oost et al., 2017). Deze 5% PAF wordt in het Chemiespoor aangehouden als grens voor goede en minder goede waterkwaliteit.*

Hoofd effect (GWRC, 2020)	Subeffect (GWRC, 2020)	Bioassay (eenheid in referentiestof equivalenten EQ)	ESW Oppervlakte -water (Neale et al., 2020, 3.4)	ESW Mens (Neale et al., 2020, 3.4)	Verzameld e Respons data # Nederland 95% oppervlakte en 5% afvalwater	Respons data GWRC (Neale et al., 2020, 3.2) ## oppervlakte-water/ influent/ effluent
Effecten via hormoon receptoren	Estrogeen activiteit (ER)	ERa CALUX* (ng/L EEQ)	0,1-0,5 (PAF 0,5)	0,2-3,8	0-2,5 Rond PAF en ESW	0,005-190/ 0,02-122/ 0,1-10
	Androgeen activiteit (AR)	AR CALUX (ng/l DHT EQ)	Nee	4,5-11	Weinig data	0,25-12/ 30-350/ <RG
		Anti-AR* CALUX (ug/l FEQ)	14-25 (PAF 0,13)	4,8	0-65 Hoog tov PAF	0,3-257/ - 0,5-360
	Glucocorticogeen activiteit (GR)	GR CALUX* (ng/l DEQ)	100 (PAF 2145)	21-150	0-100 Laag tov PAF	9-170/ 37-121/ 11-628

	Progestageen activiteit (PR)	PR CALUX (ng/l PEQ)	Nee	15,5 <sup>^</sup>	Weinig data	andere EQ
		Anti-PR CALUX* (ng/l REQ)	13 (de Baat et al., 2020)	-	0-30	andere EQ
Adaptieve stress respons	Oxidatieve stress	Nrf2 CALUX* (ug/l CEQ)	10 (PAF 0,034)	-	0-14 Hoog tov PAF	andere EQ
		AREc32 (ug/l PEQ)	140-156	284	Geen data	
	NfKb	NF-KB CALUX	-	-	-	
	Genotoxiciteit	P53 CALUX* GTU	-	-	0-0,001	vaak respons onder cytotoxische omstandigheden
		UmuC	-	-	Geen data	0,01-0,69 - - Drinkwater: 0,05-0,61
		Ames (ECir1.5) (ir=inductieratio, EC= effect concentratie)	-	-	Geen data	<0,03-0,22 - - Drinkwater: 3,2-13,8
	Antibiotica	Aminoglycosides *	500 (PAF 33222)	-	0-400 Respons laag tov PAF	
		Macrolides & β-lactams*	50 (PAF 98)	-	0-50 Laag tov PAF	
		Sulphonamides*	100 (PAF 67037)	-	0-300 Laag tov PAF	
		Tetracyclines*	250 (PAF 27275)	-	0-150 Laag tov PAF	
Quinolones*		100 (PAF 8759)	-	0-150 Laag tov PAF		
Xenobiotisch metabolisme	aryl hydrocarbon receptor inductie (AhR)	PAH CALUX* (ng/l BaPEQ)	6,2-150 (PAF 41)	24,4 <sup>^</sup>	0-200 rond PAF en ESW	andere EQ
		DR CALUX* (ng/l TCDD EQ)	0,05 (PAF 137)	-	0-0,009 Laag tov PAF	
	Vetmetabolisme, Peroxisoom proliferator-geactiveerde receptor activiteit (PPAR)	PPARg CALUX* (ng/l REQ)	10 (PAF 0,03)	-	0-100 Hoog tov PAF maar meeste data <10	0,6-172/ 500-936/ 83/640
	Pregnane X receptor (PXR)	PXR CALUX* (ug/l NEQ)	3-54 (PAF 0,008)	-	0-16 Hoog tov PAF	- 20-240 -

Apicale effecten	Cytotoxiciteit	Cytotox CALUX*	0,05	0,05	Polair 0-0,012 apolair 0-0,0002	
	Bacteriële toxiciteit	Microtox*	0,05	0,05	0-0,035	0,011-0,125/ 0,059-2/ 0,05-0,5
	Vis embryo toxiciteit	Danio rerio	-	-	-	
	Daphnia	Daphnia IQ	0,05	-	0-0,035	
	Daphnia	Daphnia immobiliteit*	0,05	-	0-0,002	
	Daphnia	Daphnia in situ*	-	-	0-100%	
	Algen	Algen PAM	0,05	-	0-0,06	
	Algen	Algen inhibitie*	0,05	-	0-0,0003	<0,02-0,77/ -/ 0,077-1,43

\* Ter informatie, deze bioassays zaten eerder in de SIMONI (van der Oost et al., 2017).<sup>^</sup> ESW voorlopig vanwege lage databeschikbaarheid. # Deze dataset is verzameld binnen het project KIWK toxicologie en bestaat voornamelijk uit effecten gemeten na 'passive sampling'. Bovenste waarde is het 95 percentiel om uitschieters te verwijderen. ## Deze data betreft responsen van meerdere bioassay analogen, effecten gemeten na 'steek monsters'.

Voor antibiotica, DR en GR CALUX zijn de responsen in de praktijk zo laag ten opzichte van de PAF waarden en ook de oppervlaktewater en humaan ESW (voor zover bekend) dat deze bioassays niet de meeste urgentie hebben om in te zetten in de waterkwaliteitsbepaling voor drinkwater of voor oppervlaktewater onder 'gewone' Nederlandse condities (mogelijk wel bij incidenten). De respons is in de praktijk niet zo hoog dat deze naar verwachting effecten op organismen veroorzaakt. Voor assays met weinig data zoals de Ames, Umu-C, AREc32, AR-CALUX en PR-CALUX is het minder zeker of deze goed risico zullen aangeven en daarom zijn deze in principe ook minder geschikt voor opname in een basis-set. De PAH en ERA CALUX hebben een respons die redelijkerwijs rond de PAF ESW ligt. De mogelijkheid om deze bioassays te interpreteren in termen van PAF is een extra reden om deze bioassays inderdaad op te nemen in een basis-set. Voor de overige bioassays geeft deze tabel geen gegronde aanwijzing om ze wel of niet op te nemen in een basis-set. Een respons hoog ten opzichte van de PAF komt vaak voor maar daarvoor is de ESW gecorrigeerd.

### 3.2 Specificiteit van de bioassays

In aanvulling op de informatie in Tabel 1 kijken we of we bepaalde bioassays kunnen identificeren die een unieke set aan stoffen detecteert. In Tabel 2 staat een overzicht van het aantal stoffen dat wel/niet reageert in bioassays. Dit is [bepaald voor 238 stoffen](#) die uit bepaalde waterrelevante emissiebronnen komen. Niet voor al deze stoffen was informatie beschikbaar voor alle assays, vandaar dat per assay het aantal stoffen varieert. In het kort samengevat is de potentiële activiteit in CALUX bioassays (positief of negatief) voor stoffen uit bepaalde emissiescenario's (rivieren, rioolwaterzuivering, landbouw) bepaald aan de hand van informatie voor bioassays met hetzelfde werkingsmechanisme ('analoge') bioassays in [Toxcast](#). Dit is zo gedaan omdat er geen grote dataset met geteste stoffen publiek beschikbaar

is voor de CALUX bioassays zelf. Voor genotoxiciteit is de potentiële activiteit bepaald aan de hand van de stofclassificering (carcinogeen of niet). Voor de *in vivo* bioassays is dit bepaald aan de hand van ‘predicted no effect concentration’ (PNEC) waarden van stoffen, en of deze naar verwachting opgepikt kunnen worden. Voor assays op basis van bacteriën was informatie helaas niet beschikbaar.

*Tabel 2. Bioassays en voor hoeveel van de geteste stoffen hier (of in analogen van deze bioassays) een positieve of geen (negatieve) respons verwacht wordt. Voor de PAH en DR CALUX waren de analoge bioassays hetzelfde.*

Bioassay	Positief	Negatief	Ratio: Specifiek (<1) Algemeen (>1)
Daphnia Bioassay	61	168	0.363095
Algen Bioassay	45	103	0.436893
ER-CALUX	59	99	0.59596
anti-AR-CALUX	72	106	0.679245
AR-CALUX	23	161	0.142857
GR-CALUX	15	143	0.104895
PXR-CALUX	110	47	2.340426
DR-CALUX / PAH-CALUX	43	111	0.387387
PPAR $\gamma$ -CALUX	82	75	1.093333
PR-CALUX	5	6	0.833333
anti-PR-CALUX	71	0	$\infty$
Nrf2-CALUX	96	58	1.655172
p53-CALUX met en zonder S9	37	143	0.258741
Genotoxiciteit Bioassay	49	83	0.590361

Uit de analyse blijkt dat er een aantal bioassays in potentie op een hoog percentage geteste stoffen reageren zoals de PXR, de Nrf2 en de PPAR $\gamma$ . De anti-PR reageert zelfs op alle geteste stoffen. Dit komt voor een deel overeen met de bioassays die ten opzichte van hun PAF ESW in de praktijk een hoge respons geven (Tabel 1). Een aantal bioassays reageert specifiek op een klein percentage stoffen zoals de AR, de GR en de P53. Er lijkt een keuze mogelijk tussen breed inzetbare bioassays die relatief vaak respons zullen geven of specifieke bioassays. De analyses geven inzicht in hoe specifiek voor stoffen de respons is, maar op basis hiervan kunnen we niet beoordelen of de bioassays wel of niet in een basis-set horen.

Bij de interpretatie van de getallen in Tabel 2 is het wel belangrijk om te beseffen dat een bioassay in de praktijk wordt getriggerd door een mengsel van stoffen, waarvan de concentratie stuk voor stuk misschien te laag is om de bioassay respons te induceren. Ook kunnen er (veel) stoffen in het water aanwezig zijn die eerder niet getest zijn in de bioassay. Omdat de respons van de CALUX bioassays is bepaald via analoge bioassays met dezelfde werking, is het ook niet zeker of CALUX net zo gevoelig zijn als deze analoge bioassays. Dit zijn allemaal onzekerheden. De gevoeligheid van enkele assays (inclusief CALUX) ten

opzichte van elkaar zijn beschreven in Neale et al., 2020, 3.2 maar dit betreft niet de Toxcast bioassays.

### 3.3 Overlap van stoffen die reageren tussen bioassays

Van de stoffen die actief zijn in Tabel 2 kunnen we kijken of de overlap in stoffen die reageren tussen bioassays significant is, wat betekent dat twee of meer bioassays feitelijk dezelfde informatie opleveren over de aanwezigheid van stofgroepen. Als dit waargenomen wordt kan voorkómen worden dat de voorgestelde set bioassays dubblures kent (en daardoor onnodig duurder wordt). Dit is onderzocht met een [hypergeometrische test](#).

Als voorbeeld nemen we de overlap tussen de ERa CALUX (59 stoffen reageren, 99 niet) en de anti-AR CALUX (72 stoffen reageren, 106 niet). In totaal zijn 187 stoffen getest. De overlap van reagerende stoffen is 38 stoffen. Dat is meer overlap dan op basis van kans verwacht wordt. De p-waarde in de hypergeometrische test is dan ook kleiner dan 0.0001. Een tweede voorbeeld is de overlap tussen de ERa CALUX en de PAH CALUX (43 stoffen reageren, 111 niet). De overlap van reagerende stoffen is hier 15 stoffen. Dat is veel minder overlap. De p-waarde voor de hypergeometrische test is hier 0.49.

In Tabel 3 staan alle p-waarden (0-1) van alle overlap in reagerende stoffen. Hoe lager de p-waarde hoe opmerkelijker de overlap in reagerende stoffen is. Rood geeft aan dat er een significante overlap is.

Tabel 3. De p-waarden voor overlap in stoffen die reactie geven in bioassays.

	Daphnia	Algen	ER	antiAR	AR	GR	PXR	DR/PAH	PPARy	PR	antiPR	NRF2	p53	Genotox
Daphnia	0	0	0.005	0	0.029	0.071	0.119	0.303	0.152	0.232	0	0.002	0	0.08
Algen	0	0	0.68	0.086	0.944	0.929	0.66	0.837	0.654	0.589	0.973	0.766	0.375	0.954
ER	0.005	0.68	0	0	0.002	0.014	0.01	0.492	0.026	0.065	0	0.002	0.003	0.33
antiAR	0	0.086	0	0	0.127	0.005	0	0.028	0	0.01	0	0	0	0.463
AR	0.029	0.944	0.002	0.127	0	0	0.187	0.001	0.139	0.118	0.115	0.02	0.001	0.039
GR	0.071	0.929	0.014	0.005	0	0	0.102	0.351	0.019	0.071	0.003	0.019	0	0.284
PXR	0.119	0.66	0.01	0	0.187	0.102	0	0.174	0	0	0	0	0.054	0.778
DR/PAH	0.303	0.837	0.492	0.028	0.001	0.351	0.174	0	0.084	0.001	0.052	0.006	0.007	0.214
PPARy	0.152	0.654	0.026	0	0.139	0.019	0	0.084	0	0	0	0	0.002	0.43
PR	0.232	0.589	0.065	0.01	0.118	0.071	0	0.001	0	0	0.931	0.088	0.059	0.24
antiPR	0	0.973	0	0	0.115	0.003	0	0.052	0	0.931	0	0	0	0.869
NRF2	0.002	0.766	0.002	0	0.02	0.019	0	0.006	0	0.088	0	0	0	0.283
p53	0	0.375	0.003	0	0.001	0	0.054	0.007	0.002	0.059	0	0	0	0.082
Genotox	0.08	0.954	0.33	0.463	0.039	0.284	0.778	0.214	0.43	0.24	0.869	0.283	0.082	0

Een aantal bioassays zijn redelijk uniek in de stoffen die reageren. Dit zijn de bioassays voor directe genotoxiciteit en de *in vivo* algen toxiciteit. Deze bioassays voegen in verschillende combinaties relatief veel toe aan het volledig detecteren van effecten van verschillende chemicaliën in water maar het ligt uiteraard aan de precieze bioassay -set die wordt ingezet hoe veel extra een bioassay bijdraagt. Opvallend is dat de PR CALUX de minst significante overlap heeft, met de anti-PR CALUX. Dat betekent dat de inhibitie van deze receptor (de respons wordt onderdrukt) echt door andere stoffen dan de activatie gebeurt.

De conclusie van deze analyse is dat in principe de overlap tussen de stoffen die worden gedetecteerd in de bioassays die analogen zijn van CALUX bioassays, relatief groot is. Het moet wel gezegd worden dat de overlap ook bij significante waarden niet volledig is. De



CALUX bioassays detecteren dus mogelijk wel voor een deel overlappende stoffen. Dat betekent niet dat de bioassays per sé overbodig zijn, de stoffen kunnen in de verschillende bioassays wel degelijk verschillende effecten veroorzaken. Hoe groot dit effect is wijst elke bioassay individueel uit. De PAH en ERa CALUX hebben een relatieve laag significante overlap in stoffen die kunnen reageren. Deze twee zijn dus een goede combinatie in een basis-set.

### 3.4 Respons specificiteit van bioassays ten opzichte van elkaar

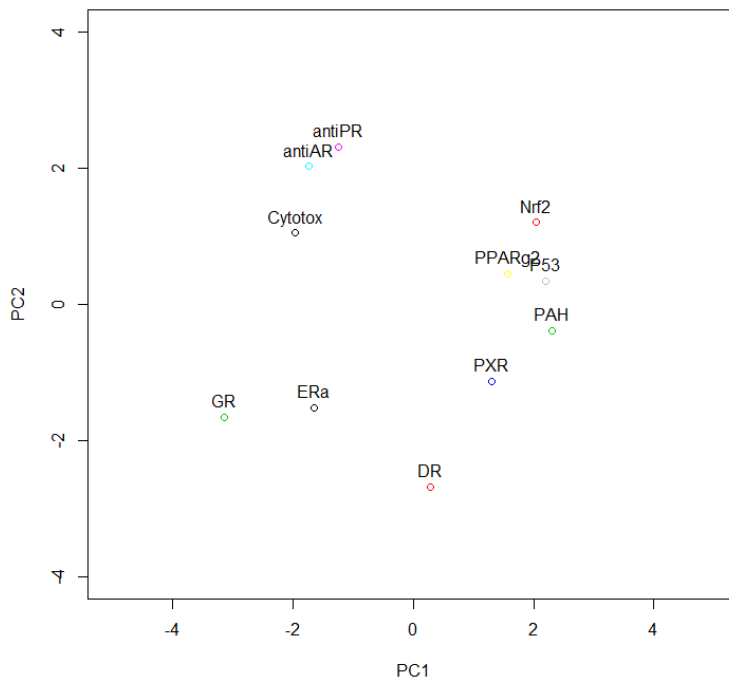
De database met bioassay responsen van tot op heden uitgevoerde bioassays in Nederlandse watermonsters bevat ook informatie over de datum van monsternamen en de plek. Indien bioassays samen zijn ingezet om hetzelfde waterlichaam op dezelfde datum te beoordelen dan kunnen deze responsen met elkaar worden vergeleken. Hoe meer de bioassays hetzelfde reageren, des te minder meerwaarde het heeft om deze naast elkaar in te zetten. De bioassay metingen zijn voor dit doel gekoppeld op datum (per week) – plek (op basis van locatiecode) en daarna is de ‘Spearman’ correlatie toegepast. Deze correlatie vergelijkt de ‘rang’ van de waarden tussen de bioassays en dit geeft minder bias in de correlatie bij uitschieters.

De database met bioassay responsen bevat mogelijk wel ongewenste effecten. Als een studie meerdere bioassays tegelijk uitvoert en bijvoorbeeld het watervolume dat langs de passieve sampler gaat te hoog inschat, worden de responsen gezamenlijk lager. Als een andere studie het watervolume dan te laag inschat, worden de responsen gezamenlijk hoger. Dit geeft in dat geval een valse correlatie. Hiervoor corrigeren is moeilijk omdat de studies met responsen in bijvoorbeeld afvalwater sowieso al gezamenlijk hoger zullen zijn dan studies in oppervlaktewater, net zoals schone wateren gezamenlijk later zullen zijn. Een bepaalde mate van correlatie is dus ook juist weer te verwachten. Met dit in het achterhoofd, is er wel voldoende verschil te zien in correlaties tussen verschillende bioassays om de resultaten van deze correlatieanalyse toch te mee te nemen in de beoordeling voor de geschiktheid van de bioassays om in een basis-set opgenomen te worden. In Bijlage B staan de bioassay respons waarden tegen elkaar uitgezet, voor een visuele interpretatie van deze resultaten.

Tabel 4. De Spearman correlatie tussen bioassay responsen van dezelfde plek en tijd, afgeleid van een groot databestand met Nederlandse bioassay-analyses. De in-vivo bioassays zijn niet samen met de CALUX assays uitgevoerd, daarom is er geen correlatieberekening mogelijk.

	Algae	Daphnia	Microtox	ERa	Nrf2	PAH	PXR	antiAR	antiPR	PPARg2	P53	Cytotox	DR	GR
Algae	NA	0.2290309	0.4941291	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Daphnia	0.2290309	NA	0.352781	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Microtox	0.4941291	0.352781	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ERa	NA	NA	NA	NA	0.106811	0.14376	0.335332	0.315948	0.307558	0.05223	-0.03646	0.150638	0.241052	0.37072
Nrf2	NA	NA	NA	0.106811	NA	0.494552	0.341804	0.225719	0.405036	0.321233	0.350857	0.022177	-0.0763	-0.2022
PAH	NA	NA	NA	0.14376	0.494552	NA	0.35942	0.12806	0.225258	0.205188	0.207386	-0.0593	0.218844	-0.32373
PXR	NA	NA	NA	0.335332	0.341803	0.35942	NA	0.189252	0.332895	0.421822	0.306513	0.210277	0.450242	0.132411
antiAR	NA	NA	NA	0.315948	0.225719	0.12806	0.189252	NA	0.7656	0.163716	0.019959	0.462335	0.019655	0.052165
antiPR	NA	NA	NA	0.307558	0.405036	0.225258	0.332895	0.7656	NA	0.405601	0.268114	0.596037	0.148888	0.354975
PPARg2	NA	NA	NA	0.05223	0.321233	0.205188	0.421822	0.163716	0.405601	NA	0.421765	0.187095	0.216357	0.031131
P53	NA	NA	NA	-0.03646	0.350857	0.207386	0.306513	0.019959	0.268114	0.421765	NA	0.215926	0.185799	-0.30117
Cytotox	NA	NA	NA	0.150638	0.022177	-0.0593	0.210277	0.462335	0.596037	0.187095	0.215926	NA	0.206622	0.266622
DR	NA	NA	NA	0.241052	-0.0763	0.218844	0.450242	0.019655	0.148888	0.216357	0.185799	0.206622	NA	0.121784
GR	NA	NA	NA	0.37072	-0.2022	-0.32373	0.132411	0.052165	0.354975	0.031131	-0.30117	0.266622	0.121784	NA





*Figuur 2. Principal component analyse (PCA) van bioassays op basis van de Spearman correlatiecoëfficiënten (Tabel 4). Hoe dichter bij elkaar, hoe meer de correlatiepatronen met andere bioassays hetzelfde zijn. Mogelijk zijn deze resultaten mede veroorzaakt door bias in de voorbereiding. ERa-CALUX, anti-AR-CALUX, GR-CALUX, anti-PR-CALUX, cytotox-CALUX gaan als groep op extract van één soort passieve sampler (allen links in de plot), en DR-CALUX, PAH-CALUX, PPARg2-CALUX, PXR-CALUX, Nrf2-CALUX, P53-CALUX op een andere passieve sampler (allen rechts in de plot).*

Uit de analyse blijkt dat met name de anti-PR en anti-AR CALUX veelal dezelfde respons geven. Om deze reden hoeven ze niet beide tegelijkertijd ingezet te worden in een basis-set. Er zijn nog een aantal iets zwakkere correlaties te zien in Tabel 4. Zo correleren de anti-PR en in mindere mate anti-AR ook redelijk goed met de Cytotoxiciteit CALUX. Figuur 2 laat zien dat de bioassays NRF2 CALUX, p53 CALUX, en PPARy CALUX vrij dicht bij elkaar liggen qua respons ten opzichte van andere bioassays, daarom zouden ze ook niet alle drie ingezet hoeven te worden volgens deze analyse. De DR en GR CALUX correleren niet sterk, maar van deze bioassays hebben we al eerder vastgesteld dat de respons in de praktijk zo laag is dat deze bioassay niet de hoogste prioriteit hebben om ingezet te worden in het beoordelen van de waterkwaliteit.

### **3.5 Kwantificatielimiet (limit of quantification, LOQ) en kosten**

De CALUX bioassays zijn een praktische keuze omdat er veel ervaring mee is opgedaan in Nederland. Daarbij komen de relatief lage kosten en het gemak van uitvoeren. Een nadeel is dat er licentiekosten worden gevraagd aan labs die de tests implementeren, waardoor het duur is om de test zelf uit te voeren. Het is de aanbeveling om de ontwikkelingen buiten Nederland goed in de gaten te houden en bioassays die een respons geven van gelijke of betere kwaliteit,

en goedkoper zijn, als alternatief te onderzoeken. Een voorbeeld is de AREc32 test die als alternatief kan dienen voor de Nrf2 CALUX voor oxidatieve stress.

Voor drinkwater in het bijzonder is het belangrijk dat de 'limit of quantification' (LOQ) van bioassays laag genoeg is. De reden hiervoor is dat eventuele concentraties van stoffen in drinkwater bijzonder laag zijn. De ESW moet boven de LOQ zijn om risico te kunnen uitsluiten. Voor de drie CALUX assays waarvoor humane ESW zijn afgeleid is dat mogelijk.

In een robuustheidsonderzoek van de drinkwaterbedrijven zijn er metingen gedaan met een aantal CALUX bioassays en hiervoor is een LOQ vastgesteld. In Tabel 5 zijn deze weergegeven.

*Tabel 5. LOQ waarden ten opzichte van de ESW waarden voor mens.*

	LOQ	ESW mens
ER CALUX	0,034 ng 17b-estradiol/l	0,25
Nrf2 CALUX	30 µg curcumine/l	? (ESW oppervlaktewater is 10)
Anti-AR CALUX	1,4 µg flutamide/l	4,8
PAH CALUX	10 ng benzoApyrene/l	24,4
PPAR $\gamma$ CALUX	150 ng rositigazone/l	? (ESW oppervlaktewater is 10)
PXR CALUX	1,1 µg nicardipine/l	? (ESW oppervlaktewater is 3-54)

Voor de bioassays waar deze informatie beschikbaar was is de gevoeligheid in ieder geval groot genoeg om toe te passen in drinkwater. Voor een aantal andere bioassays is dat nog onbekend. Voor PPAR $\gamma$  kan de hoge LOQ een probleem zijn, omdat de ESW voor oppervlaktewater er onder ligt. Bij een signaal boven de LOQ zal het risico direct hoog zijn en lage risico's kunnen niet gesignaleerd worden.

## 4 Keuze van bioassays voor standaard-toepassing in Nederland

Vanwege het kostenaspect willen we voor een eerste screening zo min mogelijk bioassays selecteren, maar wel een zo breed mogelijke set aan mechanismen meenemen. Uit de voorgaande analyses kunnen we concluderen dat de voorgestelde minimale bioassay set van de GWRC (2020) in Figuur 1 met voor hormoon gerelateerde effecten de **ERa CALUX**, voor Xenobiotisch metabolisme de **PAH CALUX**, voor adaptieve stress de **Nrf2 CALUX** en een algemene **Microtox** bioassay wordt ondersteund. De ERa en PAH CALUX zijn goed interpreteerbaar op risico voor zowel humaan als waterorganismen (directe interpretatie mogelijk op PAF), vullen elkaar aan in stoffen die ze detecteren en correleren niet bijzonder in hun gemeten responsen. De Nrf2 heeft op dit moment geen beter alternatief dat vaker getest is of betere resultaten geeft. De Microtox kon niet op alle punten beoordeeld worden maar is een algemeen getoetste en bekende bioassay die een algemeen beeld kan geven van de waterkwaliteit en effecten op micro-organismen (GWRC, 2020). Een **Cytotox CALUX** moet om de effecten op de cellen i.p.v. de receptor uit te sluiten sowieso uitgevoerd worden. Als er weinig respons is kan het ook zijn dat de cellen reeds afsterven. Dit is vooral van belang bij bioassays die de inhibitie ('anti') detecteren.

Voor drinkwater is een genotoxiciteitstest wenselijk, vanwege de directe link met de humane gezondheid en de aanbeveling van de GWRC om desinfectie bijproducten op te kunnen sporen. Vanwege de specificiteit en relevantie voor directe genotoxiciteit wordt daarvoor de Ames test gekozen. De Ames test wordt op dit moment door de drinkwaterlaboratoria in Nederland maar ook daar buiten regelmatig ingezet en getest.

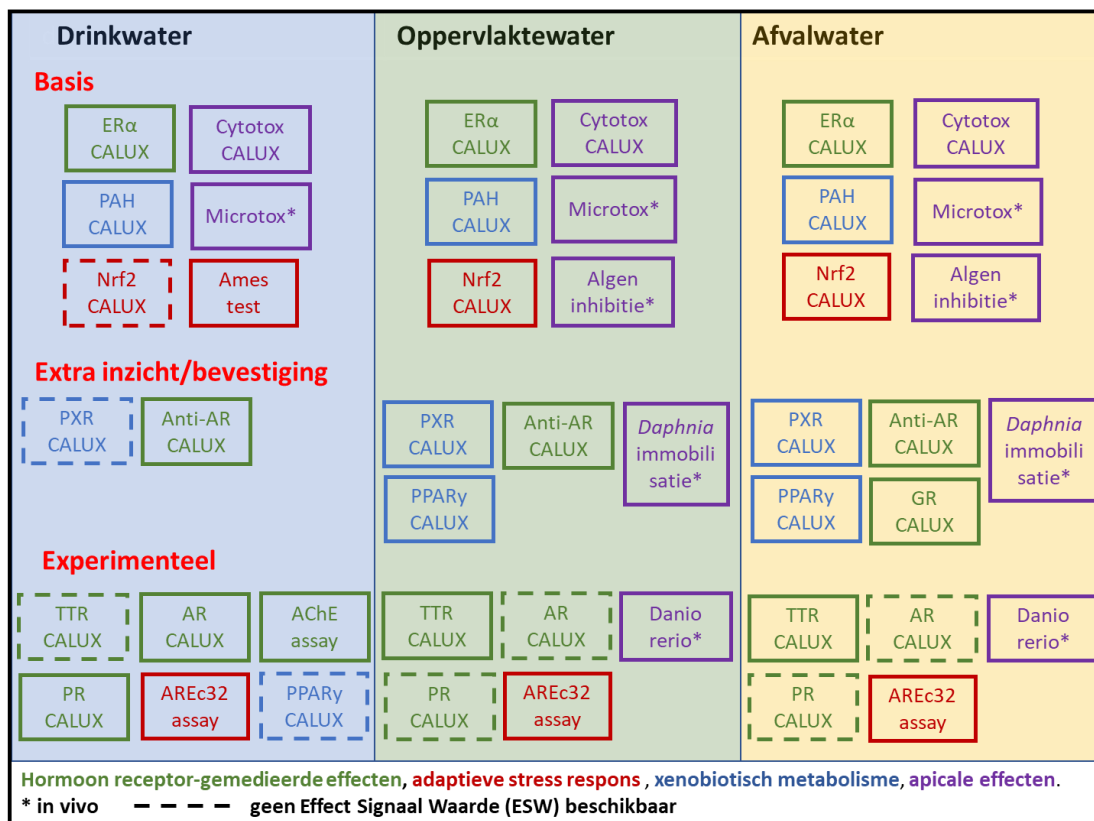
Voor oppervlaktewater en afvalwater kan de toevoeging van de algen inhibitie test zorgen voor een interpretatie van risico op voor organismen van meerdere trofische niveaus. Vanwege de kosten is de Daphnia immobilisatie test naar 'extra inzicht/bevestiging' gegaan maar deze draagt ook hieraan bij. Als kosten geen grote belemmering zijn zal deze ook nuttig ingezet kunnen worden om de effecten op een bredere groep soorten te testen.

Ook andere bioassays die niet in de basis-set zijn geselecteerd hoeven in principe niet uitgesloten te worden. Ze zijn niet geselecteerd omdat er al voorkeursbioassays voor de vier hoofdmechanismen (GWRC, 2020) in de basis-set staan. Bioassays die buiten de basis-set staan kunnen stoffen van net iets andere mechanismen detecteren ('extra inzicht') en/of deels dezelfde stoffen detecteren ('bevestiging' van de beoordeling van de waterkwaliteit). Voor afvalwater is in deze categorie de GR CALUX toegevoegd, omdat deze goed verschil kan aangeven in behandeld en onbehandeld afvalwater (Postma, 2020). Voor alle watertypen zijn de anti-AR, PXR aanbevolen. De anti-AR CALUX is interpreteerbaar met een ESW voor mens en oppervlaktewater en bioassays die stoffen detecteren die het AR mechanisme beïnvloeden zouden in principe ook responsief moeten zijn voor drinkwater, oppervlaktewater en afvalwater (Neale et al., 2020, 3.2). Deze bioassay valt onder hormoon receptor mechanismen. De PXR CALUX detecteert een brede selectie stoffen omdat deze receptor meerdere ontgiftigings-mechanismen aanstuurt en detecteert dus een brede groep stoffen die het Xenobiotisch metabolisme beïnvloeden (Neale et al., 2020, 3.2). Er bestaat geen humaan ESW, maar de bioassay kan wel geïnterpreteerd worden in de mate van respons tussen

monsters. Ook de PPARy CALUX detecteert in principe weer stoffen van net weer een ander Xenobiotisch mechanisme. Deze bioassay heeft ook geen humaan ESW. Hier is de detectielimiet in drinkwater zo hoog ten opzichte van wat gemeten wordt dat risico sowieso lastig interpreteerbaar is (Tabel 5). Daarom staat deze bij drinkwater niet bij de ‘extra inzicht/bevestiging’. De bioassays die niet in de basis-set staan, maar wel aanbevolen zijn door de GWRC als extra mechanismen om te testen en geen overtuigende reden lijken te hebben om ze niet aan te raden, krijgen de classificatie ‘extra inzicht/bevestiging’ en kunnen voor dit doel ingezet worden voor een nog beter onderbouwd inzicht in waterkwaliteit.

Andere bioassays waar te weinig ervaring mee is opgedaan, maar die mogelijk wel kunnen bijdragen aan de beoordeling van de waterkwaliteit, zijn in de categorie ‘Experimenteel’ gezet. Zoals Danio rerio, die effecten op een ander trofisch niveau kan detecteren voor oppervlaktewater of de TTR CALUX die effecten op thyroïd hormoon functie detecteert. In combinatie met een speciale voorbereiding kan deze onder andere PFAS detecteren en wordt dan PFC CALUX genoemd. De AREc32 vanwege het potentieel om een alternatief te zijn voor Nrf2 en de AcHe assay om een selecte groep neurotoxische stoffen te kunnen detecteren. Neurotoxiciteit is een eindpunt dat tot nu toe sowieso onderbelicht is in het testen van effecten met bioassays. De AR en PR CALUX omdat ze mogelijk meer precies effecten op de AR en PR receptoren kunnen detecteren dan de antagonistische assays. Dit zijn daarmee concrete kandidaten voor een basis-set in de toekomst. Voor het selecteren van bioassays voor het detecteren van specifieke stoffen in specifieke gevallen kan de [maatwerk bioassay tool](#) geraadpleegd worden.

Hiermee komen we tot een voorlopige selectie van bioassays die ingezet kunnen worden als basis-set voor het beoordelen van de waterkwaliteit, weergegeven in Figuur 2.



Figuur 3. De set van bioassays die op dit moment met onderbouwing risico voor oppervlaktewater of mens (drinkwater) ten gevolge van chemische mengsels kan aantonen.

De ESW van bioassays kan gebruikt worden als grens tussen een kans op risico en water van waarschijnlijk voldoende kwaliteit. Bioassays zonder ESW kunnen ook gebruikt worden, om waterkwaliteit te vergelijken tussen locaties, om trend analyse te doen binnen een locatie, of om bijvoorbeeld zuiveringsefficiëntie te bepalen van technieken bij vergaande zuivering op riolwaterzuiveringen, of drinkwaterzuivering. Zodra de bioassay dan een goede ESW krijgt die indicatief is voor het risico en die past bij de respons kunnen ze retrospectief ook nog het risico inschatten.

In Tabel 6 vatten we in meer detail de informatie uit de analyses in deze notitie samen met betrekking tot welke bioassays ingezet kunnen worden als ‘basis’-set, en welke als ‘extra inzicht/bevestiging’, en voor welke bioassays meer onderzoek nodig is voor inzet als effect methode om de waterkwaliteit te beoordelen. Ook staat hier meer informatie over de reden van het niet-opnemen van sommige bioassays.

Tabel 6. Samenvatting van de analyses en inschatting van de inzetbaarheid van bioassays. Elke kleur is een van de hoofdroutes van mechanismen voor toxiciteit waarvoor een bioassay nodig is volgens de GWRC (2020), zie het onderschrift bij Figuur 1.

Bioassay	Opnemen in een basis-set bioassays
ERα CALUX*	<b>Ja, aanbevolen basis volgens de GWRC. ESW voor waterorganismen (oppervlaktewater) en mens (drinkwater en</b>

	<b>bronnen), en goede respons ten opzichte van de ESW. Kan risico (PAF) aangeven.</b>
AR CALUX	Experimenteel, er is wel een ESW voor mens (drinkwater) maar er is weinig Nederlandse respons data beschikbaar. Wel een optie om verder te onderzoeken omdat deze assay naar verwachting redelijk specifiek is voor stoffen (Tabel 2). De overlap met ERa en PAH in stoffen die reageren is mogelijk wel hoog (Tabel 3) maar in dat geval kan de assay (deels) bevestigend werken. In Neale et al. (2020, 3.2) blijkt dat AR activatie in principe goed detecteerbaar is in afvalwater, oppervlaktewater en drinkwater.
Anti-AR CALUX	Als bevestigende of aanvullende assay op de ERa CALUX, er is wel significante overlap van stoffen maar de correlatie in respons met deze assay is niet bijzonder hoog.
GR CALUX	Nee, in praktijk minder relevant want de respons komt niet hoog boven de ESW voor oppervlaktewater of mens. Voor het evalueren van afvalwaterzuivering kan deze CALUX worden ingezet als 'extra/bevestigend', effecten van GR worden namelijk relatief slecht verwijderd in afvalwaterzuiveringen ten opzichte van effecten van ER en AR. (Neale et al., 2020, 3.2)
PR CALUX	Experimenteel, er is weinig data beschikbaar om deze te beoordelen. Wel een optie om verder te onderzoeken omdat deze bioassay mogelijk andere stoffen detecteert dan andere bioassays (Tabel 3). Neale et al. 2020, 3.2 vonden dat deze assay vaak cytotoxiciteit ondervindt of niet responsief is.
Anti-PR CALUX	Anti-AR is een alternatief, de responsen correleren sterk tussen deze twee bioassays. AR heeft ook meer bewijs om responsen te geven in drinkwater, oppervlaktewater, afvalwater.
TTR CALUX (PFAS)	Experimenteel, er is weinig ervaring met deze bioassays maar de groep stoffen die het kan detecteren (oa met een speciale voorbehandeling specifiek voor PFAS, in dat geval PFC CALUX genoemd) is zeer actueel en relevant.
ACHE assay voor neurotoxiciteit	Experimenteel, er is weinig ervaring met deze bioassays maar de groep stoffen die het kan detecteren is zeer relevant. Omdat de assay reageert op DOC wordt deze niet aanbevolen voor afvalwater of oppervlaktewater (Neale et al., 2020, 3.2).
Nrf2 CALUX	<b>Ja, ook aanbevolen in de basisset volgens de GWRC. Deze test kan effecten meten in drinkwater, oppervlaktewater, en afvalwater (Neale et al., 2020, 3.2) en valt onder een van de vier hoofdmechanismen (oxidatieve stress). De stoffen die reageren in deze assay overlappen wel met PAH en ER reagerende stoffen (Tabel 3) maar de correlatie in responsen met andere bioassays is wel verschillend tussen Nrf2, PAH en ER.</b>
AREc32	Experimenteel, er is geen respons data beschikbaar. Er zijn wel ESW beschikbaar voor oppervlaktewater en mens (drinkwater). Mogelijk vervanging voor Nrf2.
NfKb	Nee, Neale et al. 2020 3.2 vonden dat de CALUX NF-kB niet responsief was, een andere assay reageerde alleen in afvalwater en

	een derde mat niet-relevante stoffen. Er is geen geschikte alternatieve bioassay, vooralsnog.
P53 CALUX	Genotoxiciteit is een met name belangrijk humaan eindpunt. Neale et al. 2020, 3.2 rapporteren dat de respons vaak afwezig is of cytotoxisch. Alternatief (voor directe genotoxiciteit) is de Ames test.
UmuC	Er is op dit moment geen data beschikbaar. De Ames test is eenvoudiger in de uitvoering dan de UmuC test.
Ames	<b>Voor drinkwater, want deze test kan genotoxiciteit opsporen. Er is op dit moment geen data beschikbaar maar wel ervaring mee. De test wordt aanbevolen in onderzoek naar robuustheid van drinkwaterzuiveringen.</b>
Aminoglycosides	Nee, in praktijk minder prioriteit om in te zetten want de respons komt nauwelijks boven de ESW oppervlaktewater.
Macrolides & $\beta$ -lactams	Nee, in praktijk minder prioriteit om in te zetten want de respons komt nauwelijks boven de ESW oppervlaktewater.
Sulphonamides	Nee, in praktijk minder prioriteit om in te zetten want de respons komt nauwelijks boven de ESW oppervlaktewater.
Tetracyclines	Nee, in praktijk minder prioriteit om in te zetten want de respons komt nauwelijks boven de ESW oppervlaktewater.
Quinolones	Nee, in praktijk minder prioriteit om in te zetten want de respons komt nauwelijks boven de ESW oppervlaktewater.
PAH CALUX	<b>Ja, ook aanbevolen in de basisset volgens de GWRC voor het xenobiotisch hoofdmechanisme. ESW voor waterorganismen en mens (drinkwater) en goede respons. De PAH is aanvullend in stoffen die reageren ten opzichte van ERa mechanisme (Tabel 3). Kan redelijkerwijs risico aangeven omdat de PAF en ESW humaan in de respons-breedte liggen. Alternatief, de AhR CALUX, wordt wereldwijd vaker toegepast (Neale et al., 2020, 3.2) maar in Nederland is er geen ervaring mee.</b>
DR CALUX	In praktijk minder prioriteit om in te zetten want de respons komt nauwelijks boven de ESW oppervlaktewater en humaan.
PPARg CALUX	Als aanvullende of bevestigende assay. Overlapt met stoffen die reageren met Nrf2 assay (Tabel 3). Correleert niet bijzonder met PAH, Nrf2 of ER CALUX respons data (Tabel 4). Er is één ESW voor oppervlaktewater. Risico aangeven in drinkwater is ook moeilijk omdat de kwantificatielimiet boven de ESW (oppervlaktewater) ligt. Daarom wordt de bioassay hier in eerste instantie niet voor aangeraden.
PXR CALUX	Als aanvullende of bevestigende assay. Detecteert een brede selectie stoffen omdat deze receptor meerdere ontgiftigingsmechanismen aanstuurt. Overlapt deels in stoffen die het mechanisme activeren met Nrf2 (Tabel 3). Correleert niet in het bijzonder met andere assays (Tabel 4).
Cytotox CALUX	<b>Ja, wordt sowieso standaard gedaan als controle voor cytotoxiciteit voor andere bioassays.</b>



<b>Microtox</b>	<b>Ja, ook aanbevolen door de GWRC in de basisset. De respons is goed en het staat model voor schade aan een specifiek trofisch niveau.</b>
Danio rerio	Experimenteel. De test is relevant en redelijk goedkoop bij simpele apicale eindpunten. Het staat model voor schade aan een specifiek trofisch niveau. Er is geen data beschikbaar.
Daphnia IQ	De respons is goed en het staat model voor schade aan een specifiek trofisch niveau. Praktischer dan in situ test maar moeilijker in de uitvoering dan de Daphnia immobilisatie.
Daphnia immobilisatie	Als aanvullend of bevestigend, de respons is goed en het staat model voor schade aan een specifiek trofisch niveau. OECD guideline beschikbaar, makkelijker in de uitvoering dan Daphnia IQ. Omdat de overlap in reagerende stoffen met andere assays voor Daphnia groter is dan voor algen, en algen reageren op een iets groter percentage stoffen, is de voorkeur voor alg in de basis-set.
Daphnia in situ	Deze test heeft in de praktijk last van a-specifieke responsen door inferentie van andere factoren (temperatuur, zuurstof, etc.) dan microverontreiniging en is daarom minder geschikt voor het bepalen van de chemische waterkwaliteit.
Algen PAM	De respons is goed en het staat model voor schade aan een specifiek trofisch niveau. Responsiever dan de Algen inhibitie. Het is ook makkelijker in uitvoering. Geen OECD guideline.
<b>Algen inhibitie</b>	<b>De respons is goed en het staat model voor schade aan een specifiek trofisch niveau. Deze test heeft een OECD guideline, maar is minder responsief dan de algen PAM en is iets lastiger in de uitvoering.</b>



## 5 Conclusie

In dit document is de kennis van de meest gebruikte bioassays samengebracht. Vanuit de lijst van bioassays wordt een voorstel gedaan voor verschillende bioassays voor het beoordelen van de waterkwaliteit voor de Nederlandse situatie. De in dit document gevolgde set van wetenschappelijke criteria, praktijkervaringen en -wensen hebben geleid tot het formuleren van een ‘basis’-set bioassays, een groep bioassays die ‘extra/bevestigend’ ingezet kunnen worden, een groep waar op experimentele basis ‘meer ervaring’ mee kan worden opgedaan en een groep bioassays die op dit moment minder aanleiding geven om ze prioritair in te zetten.

De basis bioassays zijn ERa CALUX, Nrf2 CALUX, Ames (drinkwater), PAH CALUX, Cytotox CALUX, Microtox en de Algen inhibitie (oppervlaktewater). Deze bioassays kunnen worden ingezet als kostenbesparende optie voor verschillende doeleinden en zijn uitgewerkt voor de waterkwaliteitsbeoordeling van drinkwater, oppervlaktewater en afvalwater (zie Figuur 3). De bioassays uit de categorie ‘extra/bevestigend’ kunnen hierbij ook ingezet worden. Dit zal leiden tot robuustere (bevestigende) en/of aanvullende inzichten.

Voor andere bioassays is meer informatie nodig om ze te kunnen inzetten voor de evaluatie van waterkwaliteit met betrekking tot oppervlaktewater of humane gezondheid, bijvoorbeeld omdat de risicogrenzen nu niet overeenkomen met de gevonden responsen of omdat er weinig ervaring is met het inzetten van de bioassay.

Het werkveld van bioassays is (inter)nationaal sterk in ontwikkeling. Verschillen in monsternamen en voorbewerking hebben in het verleden gezorgd voor verschillen in ervaring met bioassays tussen studies. Met de aanbeveling in de SFT2 tot overgaan op steekmonsters (mengmonsters) en een gestandaardiseerde set bioassays kan er nu opnieuw ervaring worden opgedaan op een meer systematische manier. De CoP kan die ontwikkelingen volgen, wat kan leiden tot verdere optimalisatie van de hier voorgestelde set bioassays. Aanbevolen wordt, om ook bij verdere verbeteringen te streven naar gestandaardiseerde inzet, als belangrijkste bevinding en aanbeveling uit de data-analyse van grote dataset van tot heden verzamelde Nederlandse bioassay-data. Het voorstel is om in ieder geval de basis bioassays in deze set de komende tijd toe te passen om zo een geharmoniseerde evaluatie van waterkwaliteit met bioassays mogelijk te maken. Daarnaast zullen er verdere inspanningen moeten worden geleverd om ook monsternamen en monstervoorbewerking verder te standaardiseren.

## 6 Referenties

- de Baat, ML, Van der Oost, R. Van der Lee, G.H. Wieringa, N. Hamers, T. Verdonshot, P.F.M. De Voogt, P. Kraak M.H.S. (2020) Advancements in effect-based surface water quality assessment *Water Res.*, 183, Article 116017
- Been, F., Pronk, T., Louisse, J., Houtman, C., van der Velden-Slootweg, T., van der Oost, R., Dingemans, M.M., 2021. Development of a framework to derive effect-based trigger values to interpret CALUX data for drinking water quality. *Water Res.* 193, 116859.
- van der Oost, R., Sileno, G., Suárez-Muñoz, M., Nguyen, M.T., Besselink, H. and Brouwer, A. (2017), 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*, 36: 2385-2399. <https://doi.org/10.1002/etc.3836>
- GWRC Factsheet (2020) Effect based monitoring (EBM) for the assessment of risks for low-level mixtures of chemicals in water on man and the environment. P. Neale, F. Leusch, B. Escher  
[http://www.globalwaterresearchcoalition.net/\\_r4284/media/system/attrib/file/825/GWRC\\_EBM%20in%20WST\\_Factsheet%203\\_1%206%20April%202020.pdf](http://www.globalwaterresearchcoalition.net/_r4284/media/system/attrib/file/825/GWRC_EBM%20in%20WST_Factsheet%203_1%206%20April%202020.pdf)
- Neale, P., Leusch, F. Escher, B. (2020, 3.2) Effect Based Monitoring in Water Safety Planning. WP3.2: Medium-to-high throughput bioanalytical tools and decision-making tool for selection of bioassays. GWRC report.
- Neale, P., Leusch, F. Escher, B. (2020, 3.4) Effect Based Monitoring in Water Safety Planning WP3.4: Effect-based trigger values for different water quality classes considering hazards for human and the environment health
- Yu, M., Lavonen, E., Oskarsson, A. et al. Removal of oxidative stress and genotoxic activities during drinking water production by ozonation and granular activated carbon filtration. *Environ Sci Eur* 33, 124 (2021).
- Stalter, D., O'Malley, E., von Gunten, U., Escher, B.I. (2016) Fingerprinting the reactive toxicity pathways of 50 drinking water disinfection by-products, *Water Research* 91, 19-30, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.047>
- Napierska D et al. (2018). Modes of action of the current Priority Substances list under the Water Framework Directive and other substances of interest. JRC Technical Reports JRC110117. Office for official Publications of the European Communities
- Wernersson, AS., Carere, M., Maggi, C. et al. (2015) The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ Sci Eur* 27, 7. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0039-4>
- EC (2021) Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive Working Group Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on Effect-Based Methods (EBM) MANDATE 2016-2018  
<https://circabc.europa.eu/faces/jsp/extension/wai/navigation/container.jsp>

## Bijlage A

Tabel 1 Bijlage A. De volgende bioassays kunnen standaard ingezet worden voor oppervlaktewater en afvalwater effecten:

Eindpunt	Assay
<b>In vivo – apicale eindpunten</b>	
Bacteriële inhibitie	Microtox
Algen	Algengroei
Cytotoxiciteit	Cytotox CALUX
<b>In vitro - receptor binding</b>	
Estrogene activiteit	ER $\alpha$ CALUX
<b>In vitro – adaptieve stress respons</b>	
Oxidatieve stress	Nrf2 CALUX
<b>In vitro – xenobiotisch metabolisme</b>	
AhR receptor	PAH CALUX (AhR)

Tabel 2 Bijlage A. De volgende bioassays zijn als basis-set informatief voor de effecten op de mens (drinkwater en oppervlaktewater voor drinkwaterproductie):

Eindpunt	Assay
<b>In vivo</b>	
Bacteriële inhibitie	Microtox
Cytotoxiciteit	Cytotox CALUX
<b>In vitro - receptor binding</b>	
Estrogene activiteit	ER $\alpha$ CALUX
<b>In vitro – adaptieve stress respons</b>	
Oxidatieve stress	Nrf2 CALUX
Genotoxiciteit respons	AMES test
<b>In vitro – xenobiotisch metabolisme</b>	
AhR receptor	PAH CALUX (AhR)

## Bijlage B.

Figuren van de correlatie tussen bioassay rnsponsen. Bovenst figuur: de ln-getransformeerde respons waarden van *in vitro* bioassays tegen elkaar uitgezet. De ln-transformatie zorgt ervoor dat zeer hoge waarden optisch dichterbij de lagere waarden liggen. Voor de GR CALUX is een correctie toegepast omdat mogelijk eenheden door elkaar zijn gebruikt, alle lage waarden zijn vermenigvuldigd met een factor 1000. Mogelijk is voor PPARg voor één van de experimenten ook een eenheidsfout gemaakt omdat sommige punten opmerkelijk hoog zijn. Onderste figuur: de ln-getransformeerde respons waarden van *in vivo* bioassays tegen elkaar uitgezet.

