



## Wat zijn bioassays en wat kan ik ermee?

Deze Deltafact beschrijft het principe, de toepassingen, de voordelen en de beperkingen van bioassay metingen voor het meten van de waterkwaliteit. Deze informatie kan gezien worden als een introductie op het onderwerp bioassay gebruik voor waterkwaliteit monitoring.

1. INLEIDING
2. GERELATEERDE ONDERWERPEN EN DELTAFACTS
3. STRATEGIE
4. SCHEMATISCHE WEERGAVE
5. WERKING
6. KOSTEN EN BATEN
7. RANDVOORWAARDEN
8. GOVERNANCE
9. PRAKTIJKERVERVARINGEN EN LOPENDE INITIATIEVEN
10. KENNISLEEMTEN
11. BRONNEN & LINKS
12. COLOFON
13. DISCLAIMER

### 1. INLEIDING

Een bioassay is een gestandaardiseerde methode om de aanwezigheid of effecten van mengsels van stoffen te bepalen. Dit wordt gedaan door een biologische respons te meten in blootgestelde levende cellen, weefsels, intacte organismen of combinaties van modelorganismen. Omdat bioassays alleen reageren op biologisch actieve stoffen, kunnen deze inzicht geven in mogelijke gezondheids- of milieurisico's van complexe mengsels van stoffen in water.

## **Waarom bioassays?**

In de Europese Unie zijn meer dan 100.000 chemicaliën geregistreerd, waarvan ruim 20.000 actief worden gebruikt. Nieuwe stoffen worden constant ontwikkeld voor verschillende toepassingen, zoals medicijnen, industriële stoffen of gewasbeschermingsmiddelen. Veel van deze stoffen kunnen het watersysteem bereiken waarin ze als individuele stof, maar ook als complexe mengsels toxische effecten kunnen veroorzaken. Het reguliere monitoren en het in beeld brengen van de effecten van al deze stoffen met behulp van conventionele chemische analyses is praktisch onhaalbaar. Daarbij komt dat afbraakproducten en mengsels van chemische stoffen ook (soms onverwachte) biologische effecten kunnen hebben. Bioassays kunnen een toegevoegde waarde hebben ten opzichte van conventionele chemische analyses, omdat deze testen de gecombineerde effecten van complexe mengsels voor een specifiek biologisch eindpunt (zoals overleving, groei, celdood) in beeld kunnen brengen.

## **Toepassingen van bioassays**

- Meten van variaties in oppervlaktewater-, grondwater-, drinkwater-(bronnen) en afvalwaterkwaliteit.
- Meten van waterkwaliteit in relatie tot regelgeving. Een voorbeeld hiervan is de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW), waarin is vastgelegd dat de kwaliteit van oppervlaktewater inclusief drinkwaterbronnen niet dient te verslechteren.
- Meten van waterkwaliteit bij waterhergebruik.
- Het evalueren van de efficiëntie van waterbehandelingsmethoden, zoals bij de rioolwaterzuivering.
- Het meten van (mogelijke) vorming van toxische transformatieproducten bij waterbehandeling.
- Inzetten bij VTH: Vergunningverlening, Toezicht en Handhaving. Bv. lozingen.

## **2. GERELATEERDE ONDERWERPEN EN DELTAFACTS**

[Norman Network](#)

[Contaminants of Emerging Concern partnership](#)

[Kennisimpuls Waterkwaliteit – Thema Toxiciteit](#)

## **3. STRATEGIE**

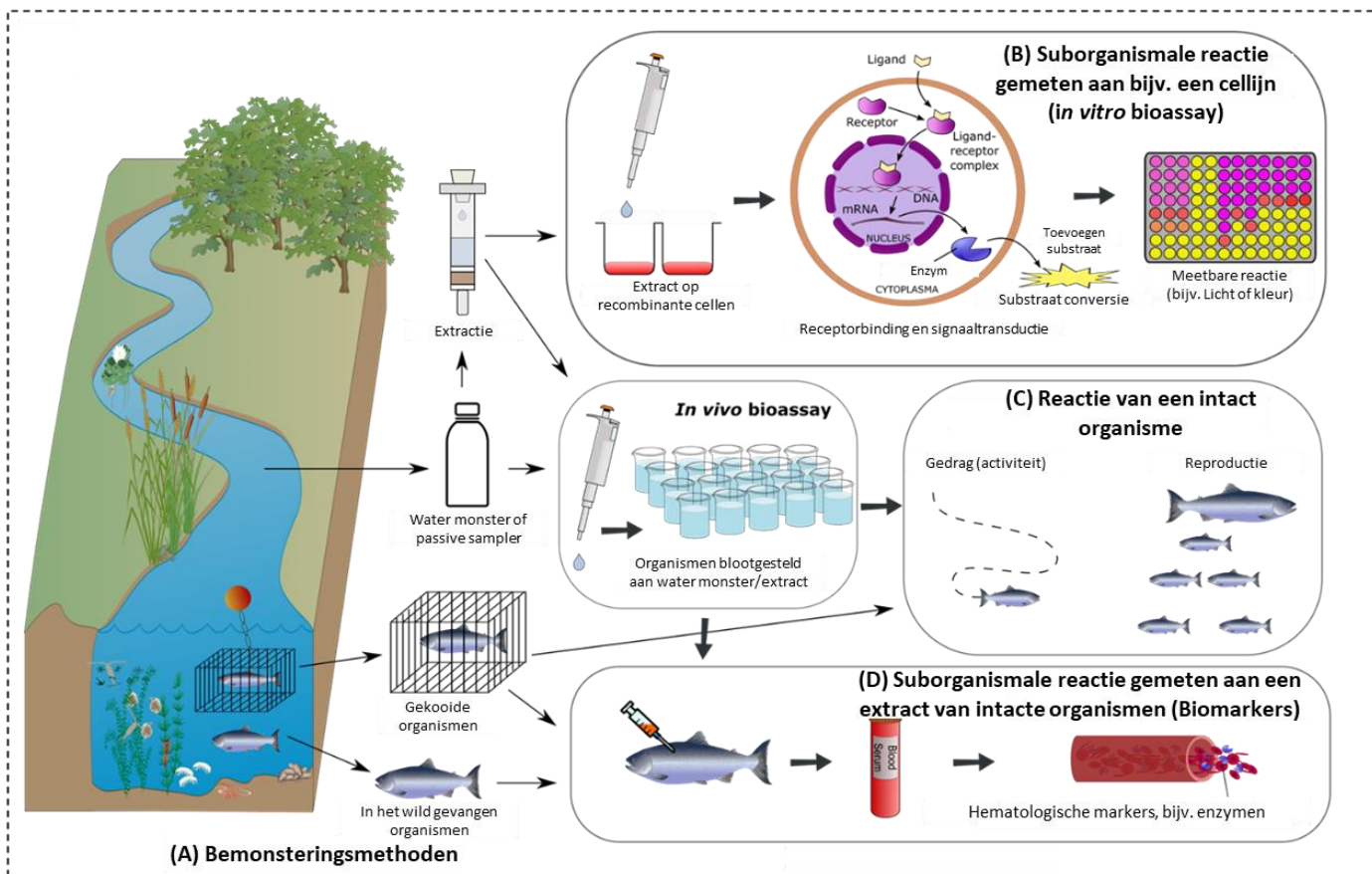
Dit Deltafact is opgesteld binnen het Kennisimpuls Toxiciteit project, in het kader van het realiseren van de chemische en biologische doelen van de KRW en de daarbij behorende monitoring. In de Kennisimpuls Waterkwaliteit werken Rijk, provincies, waterschappen, drinkwaterbedrijven en kennisinstututen 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 die kennis (beter) toepasbaar voor de praktijk.

#### 4. SCHEMATISCHE WEERGAVE

In een bioassay wordt een biologisch systeem meestal blootgesteld aan een mengsel van chemische stoffen in een watermonster, of een extract daarvan (Figuur 1A). Het systeem kan bestaan uit levende organismen (*in vivo*, Figuur 1C en 1D) of uit cellen of weefsels (*in vitro*, Figuur 1B). Een bioassay kan een directe indicatie van toxiciteit geven (bv. verminderde groei, sterfte), of een indirecte maat zijn voor het effect (bv. fluorescentie, luminescentie). In de gekozen bioassay kan een kwantitatief of binair (uit/aan) effect worden gemeten, waaraan verschillende conclusies kunnen worden verbonden. Sommige bioassays kunnen generieke toxiciteit meten (bv. sterfte, populatie-groei), terwijl andere bioassays een specifiek type toxiciteit meten die hoort bij een functionele of anatomische verandering op cellulair niveau. Bij deze laatste spreken we van een specifiek werkingsmechanismen. Stofgroepen met een specifiek werkingsmechanisme kunnen op basis van bioassays met hetzelfde specifieke werkingsmechanisme samen worden gemeten.

Bioassays kunnen plaatsvinden in het veld (zoals bv. een kooitje met watervlooien, Figuur 1A) of in het laboratorium. In het laatste geval is er vaak sprake van monstervoorbereiding, die bestaat uit het concentreren van watermonsters aan een stoffen-bindend materiaal (extractie). Deze extractie kan zowel in het laboratorium als in het veld met zogenaamde passieve samplers worden uitgevoerd. Door de stoffen eerst te bemonsteren, en daarna te concentreren kan er voldoende materiaal worden verzameld voor een scala aan bioassays. De manier waarop deze bemonstering en verdere bewerking wordt uitgevoerd, is bepalend voor de uitkomsten van de bioassays. Om die reden is er binnen de Kennisimpuls Waterkwaliteit een [handleiding voor de bemonstering en monstervoorbewerking](#) van

bioassay monsters opgesteld die door waterbeheerders in Nederland kan worden gebruikt.



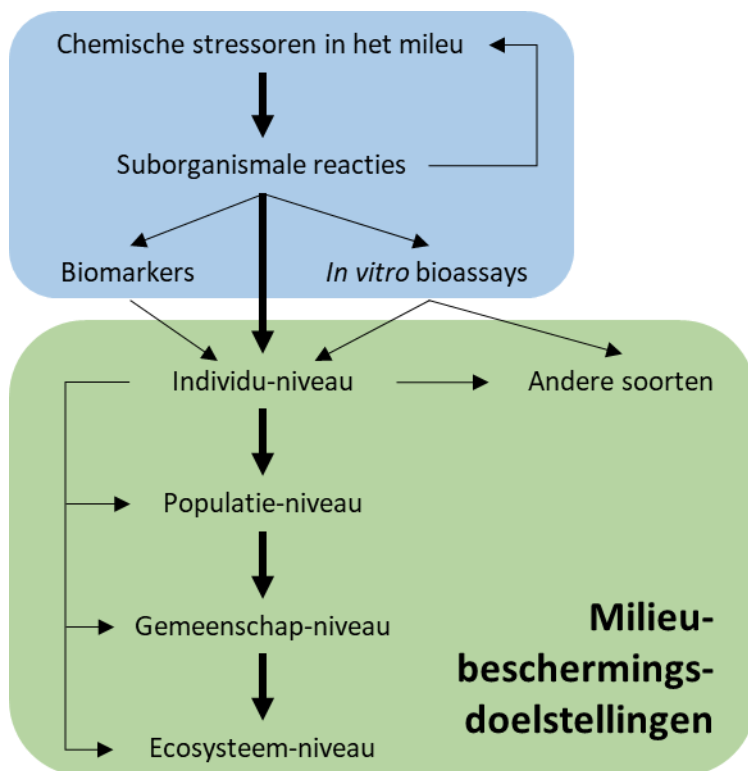
**Figuur 1. Bemonstering en principes van ecotoxicologische testen voor het beoordelen van reacties op chemische stress in aquatische ecosystemen. Schematische weergave van de verschillende bemonsteringsmethoden die mogelijk zijn (A). Nadat organismen of water zijn bemonsterd, kunnen ecotoxicologische tests worden uitgevoerd om de reactie te meten met in vitro bioassays (B), biomarkers (D), of hele organismen (C). Aangepast van Schuijt et al. (2021).**

## 5. WERKING

Reacties op chemische stoffen in aquatische ecosystemen kunnen op verschillende niveaus van biologische organisatie worden gemeten, namelijk op het niveau van sub-organisme, organisme (individu), populatie, gemeenschap of ecosysteem. De meeste bioassays worden op het sub-organisme niveau gemeten. Reacties op sub-organisme niveau omvatten biochemische en/of fysiologische reacties die vaak vooraf gaan aan effecten op hele organismen. Hierdoor zijn ze in het algemeen gevoeliger dan reacties op het niveau van een organisme of de populatie. Daarnaast kunnen dezelfde reacties in meerdere soorten van organismen voorkomen. Om deze redenen kunnen bioassays worden gebruikt als een vroege waarschuwing voor chemische verontreiniging.

In de chemische risicobeoordeling worden gemeten of verwachte effecten vaak gekoppeld aan milieubeschermingsdoelstellingen. Deze doelstellingen hebben meestal betrekking op populaties, gemeenschappen en ecosystemen (Figuur 2). Om deze reden zou het ideaal zijn om een methode te hebben die i) in staat is om reacties op chemische stressoren in een vroeg stadium te meten, ii) in staat is om specifieke chemicaliën of groepen chemicaliën aan te geven die de respons veroorzaken, en tenslotte iii) nauw en consequent verbonden is met effecten op populatie- en gemeenschapsniveau.

In de volgende secties kijken we in wat meer detail naar drie belangrijke aspecten rondom bioassays: i) het gebruik van bioassays als indicator voor (specifieke) chemische stressoren, ii) de extrapolatie van *in vitro* reacties naar ecologisch of humaan relevante effecten, en iii) het gebruik van bioassays als indicator voor de chemische waterkwaliteit.



**Figuur 2. Schematische weergave van het effect van chemische stressoren, met in het blauw de koppeling tussen bioassays en (specifieke) chemische stressoren, en in het groen de koppeling tussen *in vitro* reacties en relevante effecten. Aangepast van Schuijt et al. (2021).**

### **De koppeling tussen bioassays en (specifieke) chemische stressoren**

Bioassays kunnen worden gebruikt om de blootstelling aan chemische stoffen te beoordelen. Zoals eerder uitgelegd, kunnen sommige bioassays als 'specifiek'

worden beschouwd. Dit betekent dat het voor deze bioassays bekend is dat ze primair reageren op een specifieke groep stoffen. Meestal hebben deze stoffen hetzelfde werkingsmechanisme. Een voorbeeld van een specifieke bioassay is de ER (estrogene receptor) CALUX, een bekende indicator voor hormoon verstorende chemicaliën. Om dit te illustreren lichten we eerst het werkingsmechanisme van de CALUX cellijn verder toe.

CALUX® (Chemically Activated LUCiferase eXpression) bioassays vormen een set van zoogdiercellijnen die zijn gemodificeerd om naast hun natuurlijke respons ook een kwantificeerbare respons te produceren. De ER CALUX signaleert specifiek de activatie van estrogene receptoren, die direct betrokken zijn bij de hormoonhuishouding. Als een cel wordt getriggerd door een chemische stof om een respons te genereren, wordt een enzym (luciferase) aangemaakt dat licht produceert tijdens een reactie die het katalyseert. Na toevoeging van een substraat (luciferine) wordt de lichtproductie gekwantificeerd met behulp van een luminometer. Het geproduceerde signaal is evenredig met het veroorzaakte effect.

De ER CALUX kan in variabele mate gekoppeld worden aan chemische stressoren. In een recente studie uitgevoerd in de rivier de Donau zijn gelijktijdig ER CALUX bioassays en gerichte chemische metingen uitgevoerd ([Neale et al. \(2015\)](#)). Op sommige meetlocaties kon slechts 0,3% van de ER CALUX respons gekoppeld worden aan chemicaliën, terwijl op andere locaties rond 80% van de ER CALUX respons verklaard werd door slechts vijf chemicaliën. Deze grote variatie in uitgelegde respons kan door meerdere factoren veroorzaakt worden. Zo kan de natuurlijke aanwezigheid van estrogene hormonen een reactie in de ER CALUX bioassay veroorzaken. Daarnaast kan het zijn dat aanwezige en ER actieve chemicaliën gemist zijn in de chemische analyses, aangezien dit selectief was uitgevoerd op specifieke stofgroepen. Dit laatste laat duidelijk de toegevoegde waarde zien van het toepassen van bioassays naast chemische analyses voor monitoring van de waterkwaliteit.

### **Extrapolatie van in vitro reacties naar relevante effecten**

Een van de voornaamste voordelen van het gebruik van bioassays is het vervangen, verminderen en verfijnen van *in vivo* tests, met name testen met gewervelde dieren ([Rehberger et al., 2018](#)). De meeste bioassays worden daarom *in vitro* gemeten. Een nadeel van dergelijke *in vitro* resultaten is echter dat ze niet direct gekoppeld

kunnen worden aan humaan of ecologisch relevante effecten. Om daarachter te komen is een belangrijke stap nodig, waarmee de effecten gevonden in een *in vitro* bioassay vertaald worden naar effecten op de *in vivo* organismen.

*In vitro* effecten kunnen niet direct gekoppeld worden aan effecten die plaats vinden op het niveau van een individu. Er zijn namelijk een aantal belangrijke processen die afwezig zijn bij *in vitro* bioassays, zoals absorptie, distributie, metabolisme, biotransformatie en excretie/uitscheiding (vaak afgekort als ADME). Daarnaast zijn veranderingen op moleculair niveau (bijvoorbeeld het binden aan een specifieke receptor) niet direct te koppelen aan veranderingen in het individu. Om *in vitro* concentraties te kunnen vertalen naar equivalente doses in organismen zijn daarom (kwantitatieve) *in vitro* naar *in vivo* extrapolatie modellen nodig ([Villeneuve et al., 2019](#)). Als voorbeeld hiervoor kijken we nog een keer naar de ER CALUX bioassay, waarbij deze extrapolatie bestaat uit 6 stappen:

- 1) De eerste stap is dat de actieve stof wordt opgenomen door het organisme.
- 2) Vervolgens verplaatst de stof zich door het organisme, en bereikt het de individuele cellen.
- 3) Daar kan de stof de cel binnendringen, waar het vervolgens kan binden aan de ER receptor (gemeten door de ER CALUX bioassay).
- 4) Het binden van de ER receptor zet de productie van het vitellogenin eiwit in gang (een belangrijk eiwit voor eicelproductie).
- 5) Een toename in vitellogenin concentraties is vervolgens bewezen om tot de vorming van eicellen bij mannelijke vissen te leiden
- 6) Vervolgens leidt deze vorming tot negatieve effecten op de voortplanting ([Kidd et al., 2007](#)).

Door deze zes losse processen kwantitatief aan elkaar te koppelen kan een bioassay-response vertaald worden naar ecologisch relevante effecten op een individu.

### **Bioassays als indicator voor waterkwaliteit**

Bioassays zijn vaak gevoeliger dan de detectielimieten van chemische analyses, en meten meestal effecten van stoffen bij concentraties die lager zijn dan die waar risico's voor mens en milieu verwacht kunnen worden. Om die reden kunnen bioassays waarschijnlijk goed functioneren als indicator voor waterkwaliteit. Op dit moment worden bioassay resultaten gebruikt om het verschil tussen acceptabele en ontoereikende waterkwaliteit aan te geven. Dit wordt gedaan middels het vergelijken van bioassay responsen met effect-sigitaalwaarden (ESW). Een ESW (of *trigger*



*value*) geeft aan vanaf welke bioassay respons een risico voor mens of milieu niet uit te sluiten is. ESW's kunnen gebaseerd zijn op verschillende uitgangspunten, zoals humane toxiciteit, milieukwaliteit of waterkwaliteitsnormen (Tabel 1), en kunnen door experts worden afgeleid op basis van bestaande of, indien nodig, nieuw verzamelde gegevens van individuele stoffen ([Been et al., 2021](#)).

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

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

Echter is het niet zeker dat een ESW het risico van een mengsel van nieuwe, onbekende stoffen goed kan voorspellen. Een reden hiervoor kan zijn dat de gebruikte ESW's 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 van een *in vitro* bioassay sterk verschillen van de daadwerkelijke blootstelling (biobeschikbaarheid) in de mens of organismen in een ecosysteem. De risico's voor mens en milieu kunnen door gebruik van ESW's dus mogelijk over- of onderschat worden. 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. Daarom is het belangrijk om in de praktijk met nader chemisch en bioassay onderzoek te testen of de ESW's een realistische inschatting van de risico's voor mens of milieu aangeven. Er is op dit moment veel onderzoek gaande om ESW's verder te verfijnen en de toepasbaarheid ervan in de praktijk te ondersteunen.

## 6. KOSTEN EN BATEN



In deze sectie hebben we een zogenaamde SWOT-analyse uitgevoerd, waarbij alle Strengths (sterktes), Weaknesses (zwaktes), Opportunities (kansen), en Threats (bedreigingen) op een rijtje zijn gezet. De kosten en baten worden hier ook besproken.

#### Sterktes:

- Met bioassays kunnen effecten van veel stoffen worden gedetecteerd.
- Bioassays geven een betere indicatie van milieurisico's dan chemische analyses, omdat een gedeelte van de aanwezige stoffen en het effect van mengsels wordt gemist met standaard chemische analyses.
- Met bioassays kunnen effecten van onbekende mengsels van stoffen worden gemeten, waarmee een indicatie van de risico's voor mens en milieu kan worden verkregen.
- Afhankelijk van de gekozen bioassays kunnen de effecten van stofgroepen met algemene en specifieke werkingsmechanismen beoordeeld worden.
- Een bioassay kan informatie geven over het optreden van een biologisch relevant effect.

#### Zwaktes:

- Als een effect wordt gedetecteerd, is het meestal onbekend door welke specifieke stoffen dit wordt veroorzaakt.
- Het vergt specialistische kennis om een relevante en effectieve set bioassays te kiezen.
- Het is moeilijk om de gevonden effecten in de bioassays te vertalen naar effecten op ecologische status of humane gezondheid.
- De 'normen' (effect-signaalwaarden of trigger values) voor bioassays zijn in ontwikkeling en nog niet wettelijk vastgelegd.
- Verschillende protocollen voor bemonstering en verwerking kunnen de gemeten effecten in een bioassay beïnvloeden.

#### Kansen:

- Bioassays kunnen bij situaties waar weinig tot niets bekend is over de chemische verontreiniging een eerste indicatie van de risico's voor mens en milieu geven.

- Chemische analyses zijn een goede aanvulling op bioassay analyses, omdat ze de componenten kunnen identificeren die een risicovol effect kunnen veroorzaken.
- Nieuwe stoffen worden direct en vanzelf meegewogen in een mogelijk effect, ongeacht regulatie of normering van die stoffen.
- Bioassays geven een vroege signalering van nieuwe, onbekende, of moeilijk te meten chemische bedreigingen.
- Chemische monitoring kan beperkt worden als een goed gekozen set bioassays de indicatie 'laag risico' geeft, zodat (financiële) middelen gealloceerd kunnen worden naar locaties met een verhoogd chemisch risico.
- Het kan zijn dat monitoring effectiever en efficiënter wordt als bioassays onderdeel worden van een regulier monitoringsprogramma.

#### Bedreigingen:

- Bioassays zijn nog niet verplicht, waardoor heel veel stoffen waarover zorgen bestaan buiten beschouwing blijven.
- Misinterpretatie van extrapolatie van bioassay uitslag naar mogelijke risico's voor milieu en humaan.
- Het gebrek aan sturing op gebied van toe te passen methoden (bijv. selectie van bioassays, bemonsteringmethoden), maakt het gebruik van bioassays onsamenhangend, en bemoeilijkt het onderling vergelijken van de meetresultaten.
- Ondanks grote keuzemogelijkheden uit bioassays, zijn er nog geen standaarden vastgelegd
- Specialistisch werk. Nog niet alle labs kunnen het aan.
- Beschikbaarheid! Wie, waar, hoe?
- Soms werken met levende organismen, zoals watervlooien en muggelarven. Deze regeren niet altijd zoals gewenst.

## 8. GOVERNANCE

Bioassays worden wel toegestaan onder de huidige wet- en regelgeving omtrent chemische stoffen, maar zijn nog niet verplicht zoals concentratie- en normtoetsing van stoffen. Daarom wordt het beschikbare budget voor waterkwaliteitsbeoordeling vooral gealloceerd naar gebruikelijke en/of verplichte analyses.

## 9. PRAKTIJKERVARINGEN EN LOPENDE INITIATIEVEN

Zowel op internationaal niveau als binnen Nederland lopen verschillende initiatieven om de toepasbaarheid van bioassays voor waterkwaliteitsmonitoring te bevorderen. We bespreken hier de meest relevante.

### **ToxCast-programma**

Op internationaal niveau is één van de belangrijkste initiatieven het [ToxCast programma](#) van de United States Environmental Protection Agency (USEPA). ToxCast is een meerjarige inspanning die in 2007 werd gelanceerd en waarbij gebruik wordt gemaakt van geautomatiseerde chemische screeningtechnologieën ("high-throughput screening assays") om bioassays bloot te stellen aan chemicaliën. Het gebruik van dergelijk geautomatiseerde screeningtechnologieën maakt het mogelijk om met weinig moeite grote hoeveelheden stoffen te testen. De eerste fase van ToxCast werd voltooid in 2009 en werd geëvalueerd over 300 goed bestudeerde chemicaliën (voornamelijk pesticiden) in meer dan 500 high-throughput bioassays. Van de meeste fase één-chemicaliën zijn veel gegevens van traditionele toxiciteitstests op dieren beschikbaar, waardoor EPA-onderzoekers de resultaten van de high-throughput bioassays kunnen vergelijken met traditionele dierproeven. De tweede fase van ToxCast werd uitgevoerd in 2015 en beoordeelde meer dan 1.800 chemicaliën uit een breed scala aan bronnen; inclusief industriële- en consumentenproducten, levensmiddelenadditieven en mogelijk "groene" chemicaliën die veiligere alternatieven zouden kunnen zijn voor bestaande chemicaliën. De chemicaliën werden geëvalueerd in meer dan 700 high-throughput bioassays. De derde fase, uitgevoerd in 2018, voegde meer dan 2.000 chemicaliën toe, waarmee de totale bibliotheek meer dan 4.500 chemicaliën bevat. Op dit moment wordt er nog hard gewerkt om alle gevonden resultaten te verwerken in praktijkgerichte vraagstukken. Alle onderliggende data plus achtergrondinformatie zijn beschikbaar op de website van de [USEPA](#).

### **Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit**

Binnen Nederland is één van de bekendste initiatieven naar het onderwerp bioassays de Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit (EFST). Dit project bestaat uit twee fases. Tijdens de eerste fase ([ESFT1](#)) zijn de algemene procedures voor het monitoren van de toxiciteit van stoffen aan de hand van bioassays beschreven. Deze procedures maken onderdeel uit van het toxicologie spoor dat wordt beschreven in het hoofdrapport. Daarnaast is een achtergronddocument opgesteld waarin de afleiding en het gebruik van effect-sigitaalwaarden (ESWs) voor het aangeven van de

ecotoxicologische risico's van (combinaties van) chemische stoffen is toelicht. Momenteel wordt er binnen de tweede fase ([ESFT2](#)) gewerkt om de huidige wetenschappelijke kennis over bioassays verder toegankelijk te maken voor Nederlandse waterbeheerders. Zo worden er onder andere handleidingen en tools ontwikkeld die de selectie, praktische uitvoering en interpretatie van bioassays moeten vergemakkelijken. Een belangrijk onderdeel van de ESFT2 is om tot een set ESWs te komen die als maatstaf voor de Nederlandse waterschappen, provincies en drinkwaterbedrijven zal gaan dienen. Deze ESWs worden vastgesteld aan de hand van de huidige wetenschappelijke kennis, en zullen worden aangepast indien nieuwe wetenschappelijke ontwikkelingen daar noodzaak voor laten zien. Aanpassingen moeten in dergelijke situaties in goed overleg met de betrokken partijen (waterschappen, adviesbureaus, overheidsinstanties, drinkwaterbedrijven, etc.) gedaan worden, en vereist duidelijke afspraken tussen waterbeheerders.

## 10. KENNISLEEMTEN

Bioassays hebben de laatste jaren een aanzienlijke ontwikkeling ondergaan, waardoor het gebruik van bioassays steeds verder is geïntegreerd in het waterbeheer. Echter blijft de integratie van bioassays in (Nederlandse) regulatie nog afwezig. Dit komt voornamelijk doordat er op verschillende vlakken nog belangrijke kennisleemten bevinden. We bespreken er hier drie:

- 1) De koppeling tussen bioassays en chemische stressoren,
- 2) De extrapolatie van *in vitro* reacties naar relevante effecten, en
- 3) De koppeling tussen bioassays en waterkwaliteit.

Eerder werd genoemd dat bioassays die specifieke reacties meten, informatie geven over het werkingsmechanisme van de stoffen die in het watermonster aanwezig zijn. Hoewel de specifieke stof die de reactie in een bioassay veroorzaakt niet bekend is, kan kennis van het werkingsmechanisme de identificatie van de verantwoordelijke chemicaliën ondersteunen ([Brack et al., 2016](#)). Hier hoort echter wel een aantal kanttekeningen bij. Allereerst is het met toenemend onderzoek duidelijk geworden dat zelfs zogenaamde 'specifieke' bioassays niet volledig specifiek zijn en ook reageren op andere (ook niet-chemische) stressoren. In deze gevallen verklaren gedetecteerde chemicaliën vaak slechts een klein deel van de responsen ([Neale and Escher, 2020](#)). Daarnaast zijn er voor sommige werkingsmechanismen niet veel *in vitro* bioassays beschikbaar, zoals voor neurotoxiciteit, immunotoxiciteit, remming van mitose of energiemetabolisme, of voor opkomende verontreinigingen met

alternatieve werkingsmechanismen ([Dingemans et al., 2019](#)). Als gevolg hiervan kunnen relevante chemicaliën aan de aandacht ontsnappen. Uiteindelijk is het niet uit te sluiten dat nieuwe, opkomende stoffen met unieke werkingsmechanismen al in het aquatisch milieu aanwezig zijn voordat deze gedetecteerd worden. Het is dus belangrijk dat er bioassays voor een breed scala aan werkingsmechanismen ontwikkeld worden.

Zoals eerder vermeld zijn kwantitatieve *in vitro* naar *in vivo* modellen nodig om *in vitro* concentraties te kunnen vertalen naar equivalente doses in organismen ([Villeneuve et al., 2019](#)). Deze modellen moeten nog verder ontwikkeld worden. Dat is echter lastig omdat de stoffen (of andere stressoren) die het effect in een bioassay veroorzaken meestal onbekend zijn. Daarnaast zijn de meeste *in vitro* bioassays ontwikkeld voor humane toxicologie en dus niet geschikt voor de meeste aquatische organismen. Om *in vitro* bioassays op basis van zoogdieren te gebruiken om mogelijke effecten van chemische stoffen op waterorganismen te beoordelen, moet de voorspelbaarheid van zoogdierreceptoren voor waterorganismen worden geëvalueerd ([Celander et al., 2010](#)). Dit kan enerzijds gedaan worden aan de hand van experimenten, maar kan anderzijds ook voorspeld worden aan de hand van de aan- of afwezigheid van bepaalde receptoren. Op dit gebied is nog veel onderzoek nodig.

Tot slot is er meer onderzoek nodig om de toepasbaarheid van bioassays als indicator voor waterkwaliteit te valideren. Er is een groot tekort aan studies die op dezelfde tijd en locatie zowel bioassay responsies als waterkwaliteitsparameters hebben gemeten. De data verkregen uit dergelijke studies zijn echter noodzakelijk om de directe relatie tussen deze twee facetten te kunnen begrijpen, en de potentie van bioassays als indicator van de waterkwaliteit te bevestigen.

## 11. BRONNEN EN LINKS

De inhoud van deze Deltafact is gebaseerd op de volgende internationale publicaties en onderzoeksrapporten:

Allen, T. E., Goodman, J. M., Gutsell, S., & Russell, P. J. (2014). Defining molecular initiating events in the adverse outcome pathway framework for risk assessment. *Chemical research in toxicology*, 27(12), 2100-2112.  
<https://doi.org/10.1021/tx500345j>.

Baken, K.A., Dingemans, M. (2017). Rapport BTO 2017.008 Effect-based monitoring with bioassays-a roadmap. <https://library.kwrwater.nl/publication/55476679/>.

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 Research*, 193, 116859. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116859>.

Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R. M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., ... & Krauss, M. (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments—an in-depth overview. *Science of the Total Environment*, 544, 1073-1118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.102>.

Brand, W., de Jongh, C. M., van der Linden, S. C., Mennes, W., Puijker, L. M., van Leeuwen, C. J., ... & Heringa, M. B. (2013). Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environment international*, 55, 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.02.003>.

Celander, M. C., Goldstone, J. V., Denslow, N. D., Iguchi, T., Kille, P., Meyerhoff, R. D., ... & Wheeler, J. R. (2010). Species extrapolation for the 21st century. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), 52-63. <https://doi.org/10.1002/etc.382>.

De Baat, M. L., Kraak, M. H. S., Van der Oost, R., De Voogt, P., & Verdonschot, P. F. M. (2019). Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. *Water research*, 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., Verdonschot, P. F. M., ... & Kraak, M. H. S. (2020). Advancements in effect-based surface water quality assessment. *Water research*, 183, 116017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116017>.

Dingemans, M. M., Baken, K. A., van der Oost, R., Schriks, M., & van Wezel, A. P. (2019). Risk-based approach in the revised European Union drinking water legislation: Opportunities for bioanalytical tools. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 15(1), 126-134. <https://doi.org/10.1002/ieam.4096>.

Escher, B. I., Neale, P. A., & Leusch, F. D. (2015). Effect-based trigger values for in vitro bioassays: Reading across from existing water quality guideline values. *Water research*, 81, 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.049>.

Escher, B. I., Aït-Aïssa, S., Behnisch, P. A., Brack, W., Brion, F., Brouwer, A., ... & Neale, P. A. (2018). 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. *Science of the Total Environment*, 628, 748-765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.340>

Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., Flick, R.W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Science* 104 (21), 8897-8901; <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>

Neale, P.A., Ait-Aïssa, S., Brack, W., Creusot, N., Denison, M.S., Deutschmann, B.r., Hilscherová, K., Hollert, H., Krauss, M., Novak, J. 2015. Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture-toxicity modeling. *Environmental science & technology* 49(24), 14614-14624. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04083>

Neale, P. A., & Escher, B. I. (2020). Mixture Modelling and Effect-Directed Analysis for Identification of Chemicals, Mixtures and Effects of Concern. In *A New Paradigm for Environmental Chemistry and Toxicology* (pp. 87-97). [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9447-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9447-8_7).

Rehberger, K., Kropf, C., & Segner, H. (2018). In vitro or not in vitro: a short journey through a long history. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0151-3>.

Schuijt, L. M., Peng, F., Van den Berg, S.J.P., Dingemans, M. M., Van den Brink, P. J. (2021). (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. *Science of the total environment*, 795, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>.

Van den Brink, P. J., Boxall, A. B., Maltby, L., Brooks, B. W., Rudd, M. A., Backhaus, T., ... & van Wensem, J. (2018). Toward sustainable environmental quality: Priority research questions for Europe. *Environmental toxicology and chemistry*, 37(9), 2281-2295. <https://doi.org/10.1002/etc.4205>.



Van der Oost, R., Sileno, G., Suárez-Muñoz, M., Nguyen, M. T., Besselink, H., & Brouwer, A. (2017a). SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I–model design and effect-based trigger values. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(9), 2385-2399. <https://doi.org/10.1002/etc.3836>.

Van der Oost, R., Sileno, G., Janse, T., Nguyen, M. T., Besselink, H., & Brouwer, A. (2017b). SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: part II–field feasibility survey. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(9), 2400-2416. <https://doi.org/10.1002/etc.3837>.

Villeneuve, D. L., Coady, K., Escher, B. I., Mihaich, E., Murphy, C. A., Schlekot, T., & Garcia-Reyero, N. (2019). High-throughput screening and environmental risk assessment: State of the science and emerging applications. *Environmental toxicology and chemistry*, 38(1), 12-26. <https://doi.org/10.1002/etc.4315>.

## 12. COLOFON

Dit Deltafact is opgesteld in het kader van het Kennis Impuls Water Kwaliteit project Toxiciteit door Sanne van den Berg (WEnR), Milo de Baat (KWR), Milou Dingemans (KWR), Tessa Pronk (KWR), en Leo Posthuma (RIVM). Dit Deltafact is voorgelegd aan ervaringsdeskundige Ron van der Oost (Waternet) en suggesties ter verbetering zijn verwerkt. Dit Deltafact wordt – waar mogelijk – geactualiseerd op basis van nieuw verworven kennis uit het KIWK-project Toxiciteit en (inter)nationale publicaties.

## 13. DISCLAIMER

De in dit Deltafact gepresenteerde kennis is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten bij toepassing ervan de resultaten te allen tijde kritisch worden beschouwd. De auteur(s) en STOWA kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het gedachtegoed uit deze publicatie.