

Reactieve stoffen in waterzuiveringen achterhalen met bioassays en Effect Directed Analysis

Corine Houtman (Het Waterlaboratorium, Vrije Universiteit Amsterdam), Yvonne van Oorschot (Het Waterlaboratorium), Marja Lamoree (Vrije Universiteit Amsterdam)

Wanneer met bioassays toxische effecten in water aangetoond worden, kan Effect Directed Analysis (EDA) achterhalen welke stoffen in het water deze veroorzaken. Er kunnen steeds meer typen effecten worden onderzocht door EDA te combineren met verschillende bioassays. In deze studie zijn DNA-schade (genotoxiciteit), inductie van oxidatieve stress en algemene celschade (cytotoxiciteit) onderzocht, in drinkwaterzuiveringen en in een rioolwaterzuiveringsinstallatie. Hiervoor zijn de bioassays p53-, Nrf2- en cytotox-CALUX gebruikt. Door ze te koppelen aan EDA werden stoffen gevonden die de effecten in RWZI-influent (deels) konden verklaren.

Chemische stoffen die worden gebruikt in landbouw, industrie en huishoudens kunnen in het oppervlaktewater terecht komen door afspoeling van landbouwgronden, lozing van vervuild afvalwater en onvolledige verwijdering in rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's). Als deze stoffen biologisch actief zijn, kunnen ze schade toebrengen aan het ecosysteem [1]. Wanneer ze bij de productie van drinkwater uit oppervlaktewater niet volledig verwijderd worden, zouden ze daarnaast een negatief effect kunnen hebben op de gezondheid van de mens.

Analyse van reactieve effecten met bioassays

Het onderzoeken van biologische activiteiten in de watercyclus is gezien bovenstaande van groot belang. Om de verschillende effecten (toxicologische eindpunten) van aanwezige stoffen zo goed mogelijk te kunnen detecteren past Het Waterlaboratorium (HWL) bioassays toe, die voor humane gezondheid relevante effecten zo goed mogelijk afdekken [7], [8]. Deze meten bijvoorbeeld hormoonverstorende effecten en reactieve werkingsmechanismen.

Stoffen met een reactief werkingsmechanisme kunnen in het lichaam schade aanrichten door een chemische reactie aan te gaan met belangrijke bouwstenen van het lichaam, zoals DNA, eiwitten en vetten. Genotoxiciteit, oxidatieve stress en cytotoxiciteit (celschade) zijn voorbeelden van effecten die hiervan het gevolg zijn. Deze effecten kunnen worden gemeten met drie CALUX[®]-bioassays die ontwikkeld zijn in menselijke botkankercellen [2]. De Nrf2- en cytotox-CALUX maken onderdeel uit van de bioassaysets die de Kennisimpuls Waterkwaliteit met de Sleutelfactor Toxiciteit heeft voorgesteld als relevant voor drinkwater, oppervlaktewater en afvalwater [3]. De p53-CALUX is deel van de set bioassays die is opgenomen in de strategie van Rijkswaterstaat voor de beoordeling van de vergaande zuivering van RWZI-effluent.

Genotoxiciteit, oxidatieve stress en cytotoxiciteit

Genotoxiciteit (DNA-schade) is een belangrijk effect van chemische stoffen, aangezien het een van de triggers is voor het ontstaan van kanker. DNA-schade kan in het lichaam via verschillende mechanismen ontstaan. De bioassay p53-CALUX signaleert dat er DNA-schade is opgetreden doordat de reparatiemechanismen van cellen in actie komen [2].

Oxidatieve stress is een toestand in de lichaamscellen waarbij meer dan de normale hoeveelheid reactieve zuurstofverbindingen wordt gevormd of aanwezig is. Deze verbindingen kunnen schade veroorzaken in de cellen, bijvoorbeeld aan DNA, eiwitten en vetten. Oxidatieve stress kan veroorzaakt worden door blootstelling aan veel verschillende stoffen. Het wordt gezien als een zeer gevoelige en selectieve indicator van milieuvervuiling [4]. Met de bioassay Nrf2-CALUX kan dit eindpunt onderzocht worden. Het meet de inductie van het eiwit Nrf2 dat de cel inzet in antwoord op oxidatieve stress om schade tegen te gaan of te repareren [2].

Cytotoxiciteit (celschade) is een specifiek toxicologisch eindpunt, omdat celschade door veel verschillende werkingsmechanismen kan ontstaan. Cytotoxiciteit wordt bij HWL onderzocht met de bioassay cytotox-CALUX [2]. Deze assay geeft informatie over de chemische waterkwaliteit op zichzelf, maar dient ook als kwaliteitscontrole bij de analyse van andere bioassays voor andere eindpunten.

Effect Directed Analysis

Bioassays kunnen met een hoge gevoeligheid screenen op mogelijk toxische effecten. Bioassays alleen geven echter niet aan welke stoffen de gemeten activiteiten veroorzaken. De identiteit (naam en structuurformule) van een stof is echter wel nodig voor de risicobeoordeling. Dit omdat daarmee gegevens over de opname, distributie, omzetting en uitscheiding door het lichaam onderzocht kunnen worden. Bovendien kan op basis van alleen het bioassayresultaat nog niet vastgesteld worden of het om een enkele stof gaat die de gemeten activiteit veroorzaakt, of dat meerdere stoffen daaraan bijdragen.

Effect Directed Analysis (EDA) is een krachtig hulpmiddel om de drijfveren achter een bioassay-activiteit in complexe milieumonsters te achterhalen en te identificeren [5]. EDA combineert bioassays met chromatografische scheiding ('fractionering', het sorteren van stoffen naar hun polariteit) en vervolgens chemische analyse in de actieve fracties. De resultaten daarvan – de bioassaychromatogrammen – kunnen direct gecorreleerd worden aan de parallel opgenomen massaspectrometrie (MS)-chromatogrammen. Hiermee kan de stofidentiteit worden vastgesteld.

Zo'n tien jaar geleden hebben de Vrije Universiteit en HWL samen een Effect Directed Analysis (EDA)-platform met hoge resolutie ontwikkeld [6], [7]. Beide werken er sindsdien veelvuldig mee. De nadruk heeft in eerste instantie gelegen op onderzoek naar hormoonverstorende effecten. Hiervoor zijn succesvolle identificaties verkregen en vastgelegd in wetenschappelijke publicaties [8], [9]. De VU en HWL streven er voortdurend naar meer bioassays aan het EDA-platform te koppelen, zodat voor meer typen effecten actieve verbindingen geïdentificeerd kunnen worden. Voor het onderzoek in dit artikel zijn voor het eerst de bioassays p53- en Nrf2-CALUX gekoppeld aan het EDA-platform (met de cytotox-CALUX was dit al eerder gedaan [8]).

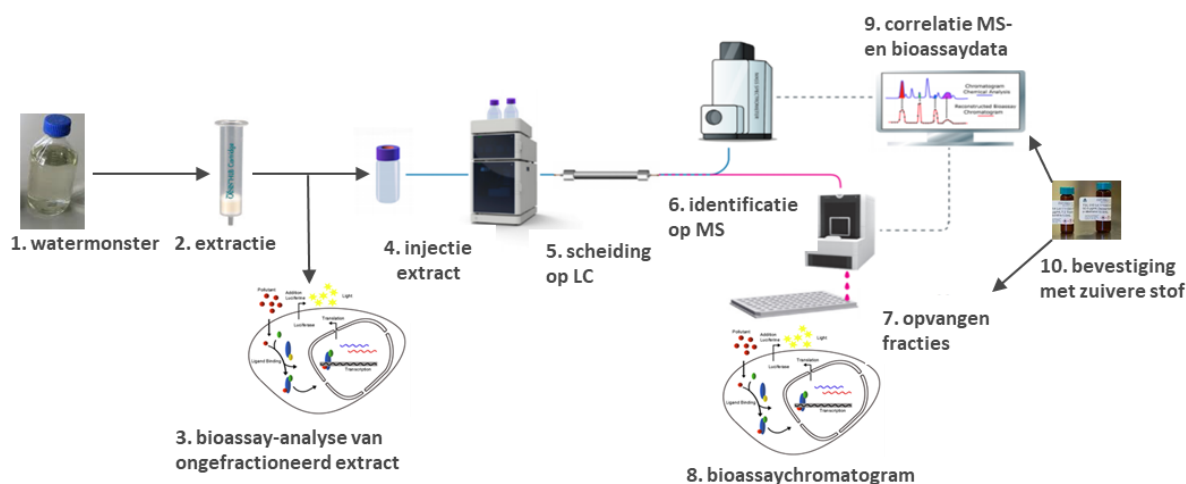
Dit onderzoek

Dit artikel is het resultaat van een onderzoek naar de aanwezigheid van reactieve activiteiten in drie drinkwaterzuiveringen voor en na behandeling met een Advanced Oxidation Process (AOP). AOP's zijn onderzocht omdat hierbij soms transformatieproducten van stoffen kunnen ontstaan met eigen biologische activiteiten. Drinkwaterbedrijven moeten deze vervolgens weer verwijderen. Dit doen ze bijvoorbeeld met een actiefkoolstap. Ook zijn het influent en effluent van een conventionele RWZI onderzocht als voorbeelden van watermonsters die rijk zijn aan chemische stoffen. Vervolgens zijn voor het RWZI-influent stoffen geïdentificeerd die hebben bijgedragen aan de gemeten reactieve activiteiten.

Werkwijze

Genotoxische activiteit, inductie van oxidatieve stress en cytotoxiciteit zijn gemeten met respectievelijk de bioassays p53-, Nrf2- en cytotox-CALUX in extracten van de watermonsters (afbeelding 1, stap 1-3).

Voor de identificatie van reactieve stoffen in het extract van het RWZI-influent is EDA ingezet volgens de stappen 4 t/m 10 in afbeelding 1 [9]. De stoffen in de extracten werden van elkaar gescheiden naar polariteit met vloeistofchromatografie (LC; stap 4 en 5) en in fracties verdeeld opgevangen (stap 7). De van elkaar gescheiden stoffen zijn ook geanalyseerd met MS met hoge resolutie (stap 6). Alle fracties uit stap 7 werden gemeten met de bioassays en de resultaten werden geplott (stap 8) als functie van de retentietijd: de tijd na injectie waarop stoffen in stap 5 uit de chromatografiekolom komen. Door de MS-data van de retentietijden waarop activiteit gemeten was, te vergelijken met MS-data uit een stoffenbibliotheek (gevuld met voornamelijk geneesmiddelen en bestrijdingsmiddelen) werden kandidaatstoffen gevonden die mogelijk hadden bijgedragen aan de gemeten activiteiten (stap 9). Van deze stoffen is in een publieke database (ToxCast van de Amerikaanse milieudienst EPA) gezocht naar aanwijzingen dat de stoffen inderdaad genotoxisch, oxidatieve stress-opwekkend of cytotoxisch waren. Van de kandidaatstoffen waarvoor dit zo was, is (voor zover verkrijgbaar en betaalbaar) een zuivere standaard gekocht en getest met de bioassays om hun activiteit te bevestigen (stap 10). De hoogste geteste concentratie was 1 mmol/l.

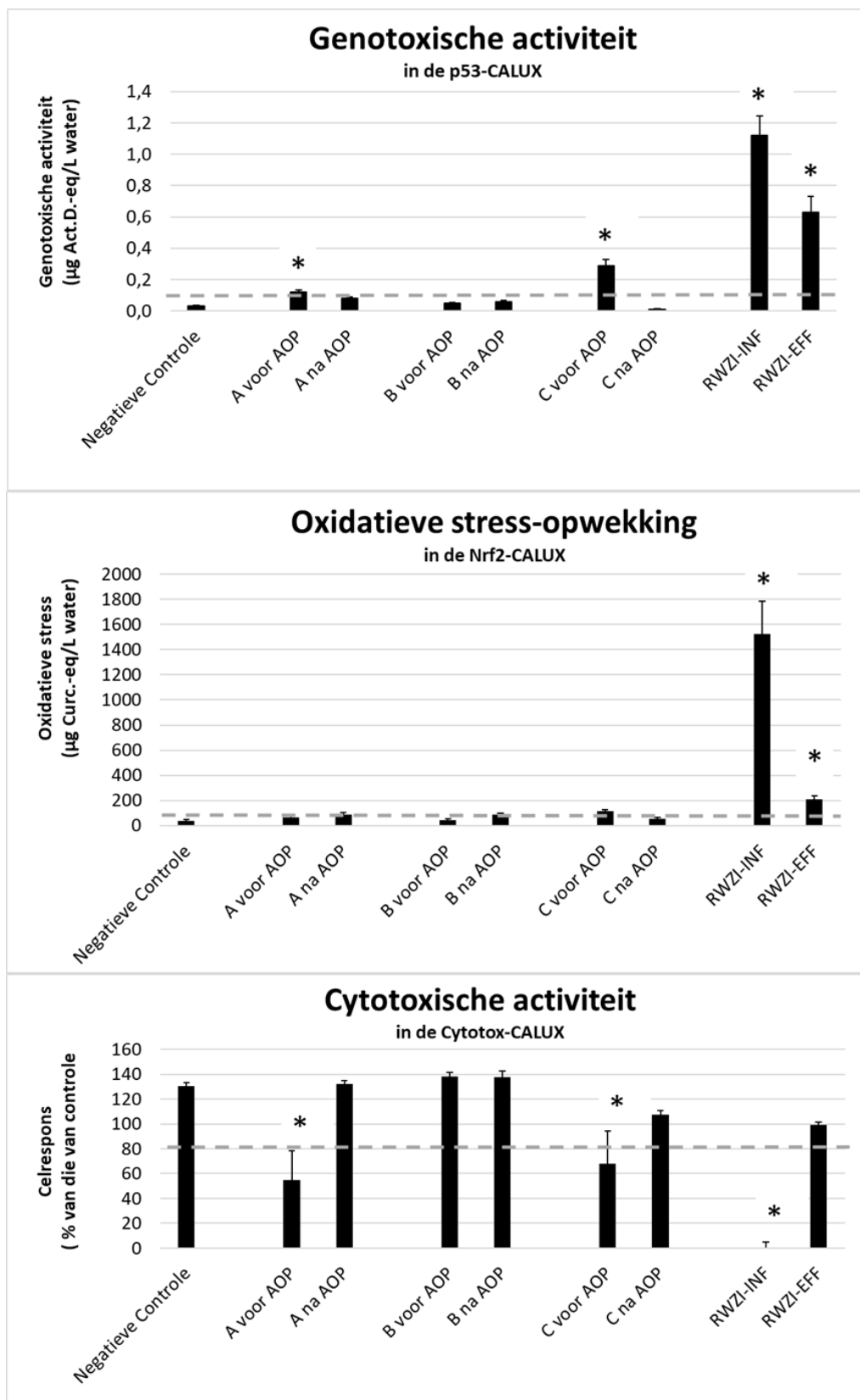


Afbeelding 1. Schematisch overzicht van de stappen van het EDA-platform [9]

Reactieve effecten in water

De resultaten van genotoxische, oxidatieve stress-opwekkende en cytotoxische activiteit in extracten van de watermonsters zijn weergegeven in afbeelding 2. Bij de drinkwaterzuiveringen zijn alleen meetbare genotoxische activiteit en cytotoxiciteit waargenomen vóór AOP-behandeling, en dat uitsluitend op locaties A en C. Deze activiteiten zijn ná de behandeling niet meer aanwezig. In geen enkel monster van drinkwaterzuiveringen is inductie van oxidatieve stress waargenomen. In dit onderzoek is dus geen vorming van reactieve activiteiten door gevormde transformatieproducten gezien, maar op twee locaties juist verwijdering.

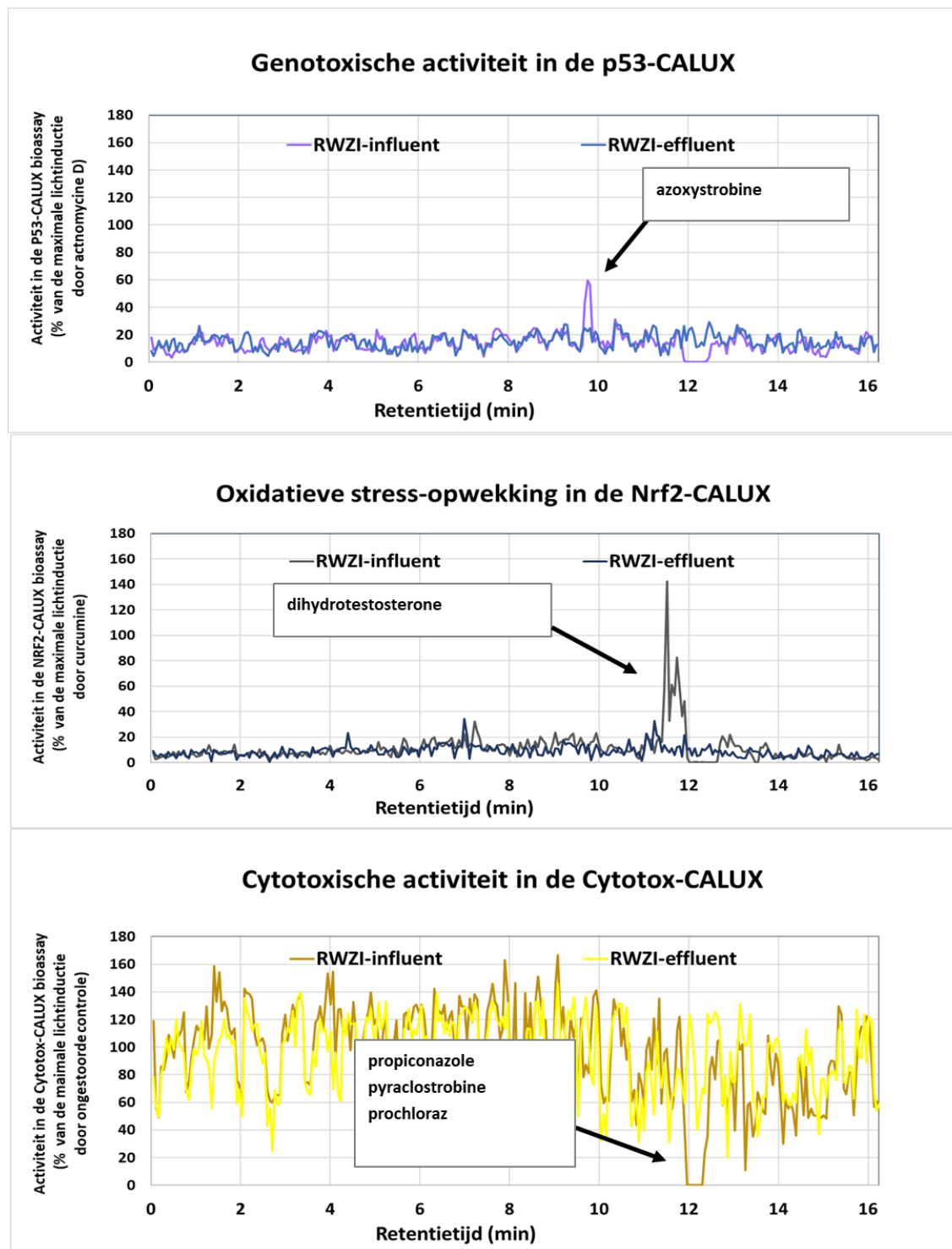
In het RWZI-influent werden genotoxische activiteit en oxidatieve stress-inductie waargenomen. Beide waren in het effluent weliswaar lager, maar nog wel meetbaar. Hoewel dit onderzoek slechts een eenmalige bemonstering omvatte en geen rekening hield met verblijftijd van water in een RWZI, lijkt de verwijdering van genotoxische en oxidatieve stress-opwekkende activiteit in de onderzochte RWZI niet volledig. Cytotoxiciteit werd ook in het RWZI-influent aangetoond, maar was in het effluent niet meer meetbaar. Het RWZI-influent was duidelijk het monster met de hoogste activiteiten voor alle drie de effecten. Aangezien de verantwoordelijke stoffen daarin onbekend waren, is dit monster uitgekozen voor vervolgonderzoek met EDA.



Afbeelding 2. Genotoxische, oxidatieve stress-opwekkende en cytotoxische activiteit, voor en na geavanceerde oxidatieprocessen (AOP) van drie drinkwaterproductielocaties (A, B en C) en in in- en effluent van een RWZI. Links de respons van de negatieve controle. Stippellijn: rapportagegrens. Significante activiteiten zijn aangeduid met een asterisk. NB: in de onderste grafiek betekent een respons onder de rapportagegrens van 80% een significante cytotoxiciteit

Reactieve stoffen RWZI-influent bepaald met EDA

Het extract van het RWZI-influent is onderworpen aan de stappen 4 t/m 10 uit afbeelding 1. De verkregen bioassaychromatogrammen (stap 8) zijn weergegeven in afbeelding 3. Ter vergelijking zijn ook van het RWZI-effluent bioassaychromatogrammen opgenomen en in de afbeelding weergegeven.



Afbeelding 3. Bioassaychromatogrammen van genotoxische (boven), oxidatieve stress inducerende (midden) en cytotoxische activiteit (onder) van in- en effluent van een rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI). In ieder bioassaychromatogram is een piek gevonden. De geïdentificeerde stoffen die (in ieder geval deels) de activiteit verklaren zijn aangegeven

Genotoxische activiteit is in het bovenste bioassaychromatogram terug te vinden als één duidelijke piek bij een retentietijd van 9,8 minuten. Vergelijking van de MS-data bij deze retentietijd met die in de stoffenbibliotheek leverde tien kandidaatstoffen op, waarvan er zeven volgens ToxCast eerder alleen niet-genotoxisch waren gebleken. Voor twee andere kandidaten – de geneesmiddelen aliskiren en levocetirizine – bevatte ToxCast geen meetgegevens. Deze stoffen konden helaas niet als zuivere stof worden getest. Het wordt echter niet heel waarschijnlijk geacht dat deze stoffen genotoxisch zijn. Het zijn algemeen toegepaste geneesmiddelen tegen respectievelijk hoge bloeddruk en hooikoorts en zouden waarschijnlijk niet toegelaten zijn als ze genotoxisch waren. De laatste kandidaatstof, het antischimmelmiddel (fungicide) azoxystrobine, kon wel worden getest als zuivere stof in de p53-CALUX en bleek inderdaad actief. Dit komt overeen met eerder onderzoek, waarin blootstelling van slakken aan azoxystrobine leidde tot DNA-schade [10]. Azoxystrobine heeft dus bijgedragen aan de genotoxische activiteit in het RWZI-influent.

In het bioassaychromatogram van de Nrf2-CALUX (afbeelding 3, midden) is ook één piek te zien voor het influent. Deze piek is gevonden bij een andere retentietijd (11,3 – 11,9 min) dan die van genotoxiciteit. Dit betekent dat beide effecten door andere stoffen worden veroorzaakt. Voor de Nrf2-piek kwamen vijf kandidaatstoffen naar boven, die allemaal als zuivere stof getest zijn. De geneesmiddelen altretamine, diclofenac en telmisartan en het herbicide terbutryn bleken niet actief, maar het steroïde hormoon dihydrotestosteron wel. Deze laatste stof heeft dus bijgedragen aan de inductie van oxidatieve stress in het RWZI-influent.

Het onderste deel van afbeelding 3 toont de bioassaychromatogrammen voor cytotoxiciteit van RWZI-influent en -effluent. Bioassaychromatogrammen van de cytotox-CALUX hebben doorgaans een vrij hoge experimentele spreiding en dat is ook hier het geval. Er is echter wel één duidelijke en significante piek zichtbaar bij een retentietijd van 11,8 tot 12,5 min. (omdat de cytotox-CALUX remming meet, gaat de piek, i.t.t. de andere twee gebruikte assays, naar beneden in plaats van omhoog). De MS-data leverden vijf kandidaatstoffen op. Voor de drie antischimmelmiddelen (fungiciden) propiconazole, pyraclostrobine en prochloraz werden meetgegevens in ToxCast gevonden waarin de stoffen actief waren bevonden en bij testen van de zuivere stof bleken ze alle drie inderdaad cytotoxisch. Datzelfde gold voor de vierde stof, het steroïde hormoon progesteron. Deze vier stoffen verklaren dus elk deels de gemeten cytotoxiciteit. De vijfde kandidaatstof was een metaboliet van prochloraz. Deze was niet als zuivere stof leverbaar. Aangezien de moederstof prochloraz wel actief was, is het niet uitgesloten dat het metaboliet ervan ook nog cytotoxisch is. In ToxCast waren hier echter geen data over beschikbaar.

In de bioassaychromatogrammen van genotoxiciteit en oxidatieve stress is de cytotoxiciteitspiek ook terug te zien; bij de retentietijd hiervan (11,8 – 12,5 min) valt het achtergrondsignaal weg. Aangezien de p53- en Nrf2-pieken bij andere retentietijden werden waargenomen, is dit geen probleem. Het toont echter wel de goede reproduceerbaarheid van de bioassaychromatogrammen.

Bij genotoxiciteit noch oxidatieve stress zijn pieken te zien in het bioassaychromatogram van het effluent. Dit terwijl er in het effluent vóór fractionering wel activiteit was gemeten. Blijkbaar zijn de stoffen die dit veroorzaakten zodanig over verschillende fracties verdeeld dat dit geen meetbare activiteit meer opleverde.

Zijn nu alle bijdragende stoffen zichtbaar?

Bij alle drie de onderzochte effecten is het zeer goed mogelijk dat er nog andere stoffen in het RWZI-influent aanwezig waren die ook hebben bijgedragen. Deze kunnen gemist zijn door het bovengenoemd verdeeld raken van bijdragende stoffen over meerdere fracties, die vervolgens individueel elk te weinig respons geven om zichtbaar te zijn in het bioassaychromatogram. In dit onderzoek is daarnaast gewerkt met een stoffenbibliotheek die voornamelijk gevuld was met bestrijdingsmiddelen en geneesmiddelen. Logischerwijs waren de stoffen die als kandidaat naar voren kwamen dan ook representanten van die categorieën. Stoffen met andere toepassingen, zoals industriële stoffen, blijven met de gebruikte bibliotheek onopgemerkt. Deze kunnen voor reactieve werkingsmechanismen echter ook relevant zijn, aangezien bijvoorbeeld oxidatieve stress een effect is dat veel verschillende stoffen kunnen hebben.

Veel van het eerdere EDA-onderzoek was gericht op hormoonverstorende effecten. Daarbij werden de actieve stoffen juist gevonden binnen de stoffenbibliotheek, namelijk hormonen (oestrogene, progestagene, androgene en glucocorticoïden) en bestrijdingsmiddelen (anti-androgenen, anti-progestagenen). Om breder te kunnen kijken dan de stoffen in de huidige bibliotheek gaat HWL in de toekomst EDA uitvoeren in combinatie met non-target screening (NTS), die meer generiek is in het opsporen van stoffen [11].

Betekenis geïdentificeerde stoffen

In dit onderzoek zijn met name bestrijdingsmiddelen en twee hormonen aangewezen als stoffen die bijdroegen aan de waargenomen effecten. De twee steroïde hormonen zijn natuurlijke stoffen die door mensen en dieren in de urine worden uitgescheiden en in het rioolwater terechtkomen. Ze worden doorgaans in aanzienlijke mate, maar niet volledig, verwijderd. Het in dit onderzoek aangetoonde dihydrotestosteron is een androgeen (mannelijk) hormoon en progesteron een progestageen (zwangerschapshormoon). Deze bleken bij te dragen aan de inductie van oxidatieve stress en cytotoxiciteit in de bioassay. Dit hoeft in het lichaam onder normale omstandigheden niet zo te zijn, aangezien de daar werkzame concentraties veel lager zijn dan die waarbij de hier onderzochte effecten optreden.

Dat bestrijdingsmiddelen al decennia een groot probleem zijn voor de waterkwaliteit is bekend. Deze stoffen zijn bedoeld om biologisch actief te zijn, namelijk om planten of dieren die gewassen bedreigen te bestrijden. Ze verspreiden zich ver buiten hun toepassingsgebied en hebben vaak ook neveneffecten. In dit project kwamen antischimmelmiddelen en herbiciden naar voren als genotoxisch of cytotoxisch. Eerder EDA-onderzoek liet zien dat verschillende antischimmelmiddelen ook belangrijke veroorzakers van hormoonverstorende effecten in water zijn (anti-androgeniteit en anti-progestageniteit) [14], [15]. Reden te meer voor waterbeheerders om zich sterk te maken tegen het grootschalig gebruik van bestrijdingsmiddelen in de Nederlandse agrarische sector.

Conclusie

Om vast te stellen of verhoogde bioassay-activiteiten op een risico duiden, is identificatie van de actieve stoffen nodig. Het EDA-platform maakt de identificatie van biologische actieve stoffen in water mogelijk. Door de koppeling van de bioassays p53-CALUX en de Nrf2-CALUX aan het EDA-platform is het nu ook mogelijk reactieve stoffen (genotoxische en oxidatieve stress-veroorzakende) stoffen in water te achterhalen. In dit onderzoek is dit gedemonstreerd voor RWZI-influent.

Het EDA-platform kan in de drinkwatersector ingezet worden voor onderzoek naar onbekende stoffen met biologische activiteit. Het is hiermee een krachtig hulpmiddel bij de duiding van bioassayresultaten.

Dankwoord

In dit artikel gepresenteerd onderzoek is uitgevoerd in opdracht van drinkwaterbedrijven Dunea, PWN en Waternet. De auteurs danken Tineke Slootweg, Carla van der Neut-Marchand, Martine Rosielle en Sanne Brekelmans (HWL) voor hun bijdragen aan het project. CALUX-bioassays zijn gebruikt onder licentie van BioDetection Systems B.V., Amsterdam.

Contact

Corine Houtman, Het Waterlaboratorium. corine.houtman@hetwaterlaboratorium.nl

Referenties

1. Petrovic M, Sabater S, Elosegi A, Barceló D (2016). 'Emerging contaminants in river ecosystems'. *The Handbook of Environmental Chemistry* 2016, 46(10.1007):978-973.
2. Linden, S.C. van der et al. (2014). 'Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress'. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014, 760:23-32.
3. Pronk, T.E., Baat, M.L. de, Berg, S.J.P. van den, Van der Oost, R. van der (2021). 'Sleutelfactor Toxiciteit. Achtergronddocument Basis-Set Bioassay Selectie. Achtergronddocument beschikbare kennis bij de sleutelfactor Toxiciteit'. In: *KIWK-Toxiciteit Notitie Kennis Impuls Water Kwaliteit*. Amersfoort; 2021: 29.
4. Neale, P.A., Escher, B.I., Baat, M.L. de, Enault, J., Leusch, F.D. (2023). 'Effect-Based Trigger Values Are Essential for the Uptake of Effect-Based Methods in Water Safety Planning'. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2023, 42(3):714-726.
5. Houtman, C.J., Slootweg, T., Brekelmans, S. (2021). 'EDA onderzoekt watervervuiling en achterhaalt onbekende stoffen.' *H2O Magazine* 2021, december 2021(11/12):46-47.
6. Jonker, W. et al. (2015). 'Rapid activity-directed screening of estrogens by parallel coupling of liquid chromatography with a functional gene reporter assay and mass spectrometry.' *J Chromatogr A* 2015, 1406:165-174.
7. Zwart, N. et al. (2020). 'Identification of mutagenic and endocrine disrupting compounds in surface water and wastewater treatment plant effluents using high-resolution effect-directed analysis'. *Water Research* 2020, 168:115204.
8. Houtman, C.J. et al. (2020). 'High resolution effect-directed analysis of steroid hormone (ant)agonists in surface and wastewater quality monitoring'. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2020, 80:103460.
9. Houtman, C.J. (et al.) (2021). 'Characterisation of (anti-)progestogenic and (anti-)androgenic activities in surface and wastewater using high resolution effectdirected analysis'. *Environment International* 2021, 153:106536.
10. Ali, D., Ibrahim, K.E., Hussain, S.A., Abdel-Daim, M.M. (2021). 'Role of ROS generation in acute genotoxicity of azoxystrobin fungicide on freshwater snail *Lymnaea luteola* L.'. *Environmental Science and Pollution Research* 2021, 28(5):5566-5574.

11. Meekel, N., Leerdam, T. van, Vughs, D., Been, F., Kotte, M. (2023). 'Suspect en non-target screening; wat is het verschil?' *H2O-online*, 2 juni 2023. <https://www.h2owaternetwerk.nl/h2o-podium/uitgelicht/suspect-en-non-target-screening-wat-is-het-verschil>