

Gebruik van bioassays om genotoxische activiteit te meten in alternatieve bronnen

Astrid Reus (KWR), Corine Houtman (Het Waterlaboratorium, Vrije Universiteit Amsterdam), Raymond Pieters (Hogeschool Utrecht), Giel Hendriks (Toxys), Jochen Kuckelkorn (Umweltbundesamt)

De watersector voorziet grote uitdagingen in waterbeschikbaarheid. Het benutten van alternatieve bronnen en waterhergebruik zijn hiervoor mogelijke oplossingen, maar de kwaliteit van het water moet goed worden onderzocht. De waterkwaliteit van alternatieve bronnen en de effectiviteit van waterzuiveringsprocessen kunnen worden onderzocht met bioassays. Dit onderzoek biedt handvatten voor de keuze van bioassays voor het meten van genotoxische activiteit binnen waterkwaliteitsmonitoring van alternatieve bronnen en hergebruikstoepassing. Deze bioassays kunnen worden ingezet bij het nemen van beslissingen op het gebied van alternatieve bronnen en waterhergebruikstoepassingen.

De waterkwaliteit in Nederland is de slechtste van alle EU-lidstaten: slechts één procent van de Nederlandse wateren verdient het predicaat 'goed' volgens de huidige KRW-methodieken [1]. Beschikbaarheid van voldoende water voor menselijke activiteiten is een andere grote uitdaging waar de watersector voor staat. Hergebruik (stedelijk en industrieel afvalwater) en het benutten van alternatieve bronnen (regenwater en/of brak water) zijn hiervoor mogelijke oplossingen, maar de kwaliteit van het water moet echter worden onderzocht. Rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) en afvalwaterzuiveringsinstallaties (AWZI's) zijn namelijk niet in de eerste plaats gericht op het verwijderen van vervuilende stoffen. Omdat de KRW voorschrijft dat de oppervlaktewaterkwaliteit in Europa moet verbeteren en in ieder geval niet verslechteren [2], worden steeds vaker technologische behandelingen ingezet om vervuilende stoffen uit effluent te verwijderen. In afbraakprocessen, zoals geavanceerde oxidatie, kunnen stoffen worden omgezet tot afbraak- of transformatieproducten. De identiteit en de gezondheidskundige relevantie van dergelijke producten is vaak onbekend, maar uit eerdere studies is bekend dat deze nadelige toxische effecten kunnen hebben [3]. Door dit gebrek aan informatie is het vaak lastig om een inschatting te maken van mogelijke risico's van stoffen in water voor de gezondheid en het milieu.

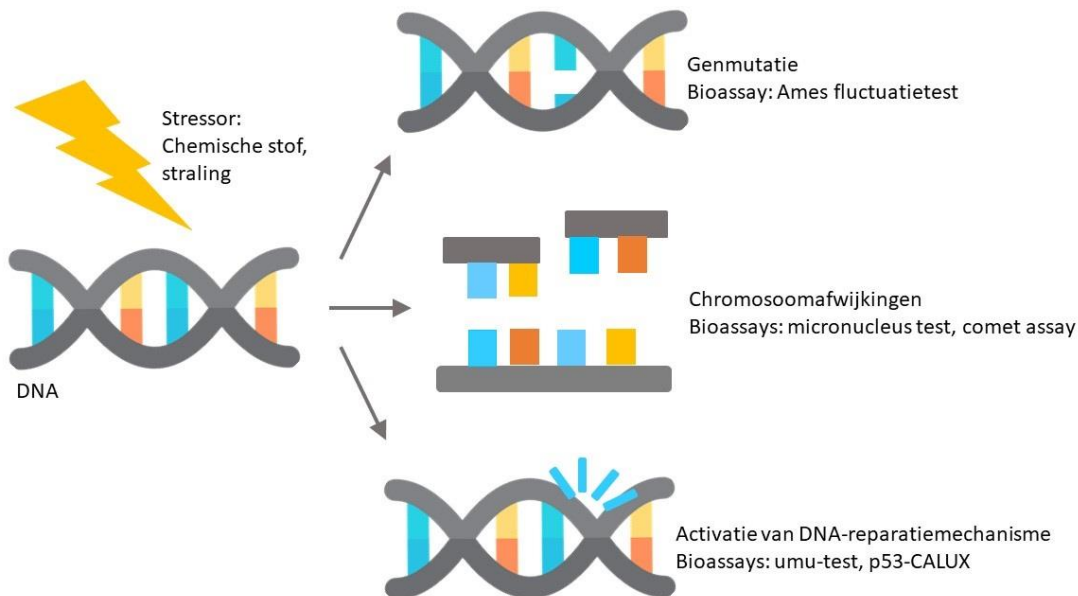
Bioassays voor genotoxiciteit

Bioassays, methodes die gebruik maken van cellen en bacteriën, zijn een effectief instrument om gezondheidsgerelateerde effecten van stoffen in water te onderzoeken. Bioassays meten het gezamenlijke effect van in het mengsel aanwezige stoffen en worden in de watersector al toegepast als aanvulling op metingen van stoffen voor de beoordeling van de kwaliteit van drinkwaterbronnen en de effectiviteit van waterzuiveringsprocessen.

Omdat vervuilende stoffen verschillende voor mens en milieu nadelige effecten kunnen hebben, zijn er voor een goede waterkwaliteitsbeoordeling meerdere bioassays nodig. Daarnaast zijn er voor veel gezondheidsgerelateerde effecten verschillende bioassays voorhanden. Inzicht in de mogelijkheid dat een stof DNA-schade (genotoxiciteit) veroorzaakt, is van belang voor de bescherming van de gezondheid, aangezien DNA-schade een van de triggers voor tumorvorming is. Het ontstaan van

tumoren kan leiden tot kanker, met grote impact op de kwaliteit van leven of levensverwachting. Een eerder artikel gaf een algemeen overzicht van het gebruik van bioassays voor het beoordelen van de milieu- en gezondheidseffecten van waterhergebruik [4]. Dit artikel gaat dieper in op het onderwerp genotoxiciteit.

Er zijn tientallen verschillende bioassays om DNA-schade te meten, die grofweg kunnen worden onderverdeeld in drie verschillende typen: mutaties, chromosomale afwijkingen en de activatie van DNA-reparatiesystemen (afbeelding 1).



Afbeelding 1. Schematisch overzicht van verschillende mechanismen van DNA-schade met bijbehorende bioassays

Naast het mechanisme van genotoxiciteit dat met een assay wordt onderzocht, is een belangrijk verschil tussen de assays of deze gebruik maken van humane cellen of bacteriën. Dit artikel beschrijft een onderzoek waarin een selectie van bioassays voor het meten van genotoxische activiteit is ingezet om verschillende alternatieve bronnen en hergebruikstoepassingen te onderzoeken.

Hulp bij keuze van geschikte bioassays

Voor de toelating van stoffen worden verschillende werkingsmechanismen onderzocht met een set bioassays die tenminste de Ames-test en micronucleustest omvat. Met deze twee bioassays kunnen stoffen die het DNA beschadigen en mogelijk kankerverwekkend zijn voldoende betrouwbaar aangetoond worden [4].

De basisset van bioassays van de Sleutelfactor Toxiciteit, die is ontwikkeld binnen het project Toxiciteit van de Kennisimpuls Waterkwaliteit, omvat voor drinkwater de Ames-test om transformatieproducten te detecteren die mogelijk DNA-schade veroorzaken [5]. De handreiking voor het uitvoeren van biologische effectmonitoring bij geavanceerde zuivering van RWZI-effluenten beveelt daarom bij oxidatieve technieken de uitvoering van de p53-CALUX aan [6]. Door in een testbatterij maar één bioassay voor genotoxiciteit op te nemen worden echter niet alle mechanismen die genotoxiciteit veroorzaken onderzocht.

De afdeling ‘Toxicologie van drinkwater en zwembadwater’ van het Duitse Milieugentschap (Umweltbundesamt) heeft samen met andere Duitse organisaties binnen een consortium (Tox-Box) een testbatterij ontwikkeld die de Ames-, umu- en in-vitro-micronucleustest omvat. Met deze testbatterij worden meerdere mechanismen van genotoxiciteit onderzocht. De gecombineerde resultaten geven een indicatie van mogelijke schadelijke effecten op de gezondheid [7].

Bioassays voor genotoxiciteit in de praktijk

In het programma ‘Water in de Circulaire Economie (WiCE)’ zijn zes verschillende bioassays (tabel 1) gebruikt om genotoxische activiteit te meten bepalen in verschillende watermonsters (regenwater en effluënten van RWZI’s en een AWZI, al dan niet na additionele zuiveringsstappen). De Ames-fluctuatietest en de p53-CALUX worden in de drinkwatersector al vaak toegepast. De micronucleustest wordt in Nederland niet routinematig uitgevoerd voor waterkwaliteitsbeoordeling, maar is toegevoegd omdat deze specifiek bedoeld is voor het meten van afwijkingen aan chromosomen en onderdeel is van de teststrategie van het Duitse Milieugentschap [7]. De umu-test is ook onderdeel van deze teststrategie en meet net als de p53-CALUX de activatie van DNA-reparatiemechanismen. De comet-assay meet voornamelijk chromosoomafwijkingen. Aangezien dit effect door DNA-reparatiemechanismen kan worden hersteld is de comet-assay een indicatortest. De ToxTracker, ten slotte, was toegevoegd vanwege ervaring uit voorgaand verkennend onderzoek [8]. Van de gekozen monsters (tabel 2) werd op basis van de verschillende waterkwaliteiten verwacht dat er zowel aanwezigheid als afwezigheid van genotoxische effecten kon worden vastgesteld.

De monsters zijn gekozen om verschillende waterkwaliteiten mee te kunnen nemen in het onderzoek. Voor risicobeoordeling zijn echter meer gegevens nodig zijn (o.a. herhaling van metingen, stofidentiteit en gegevens over blootstelling). Ook moet worden benadrukt dat de uitkomsten per locatie en per seizoen kunnen verschillen. Het doel van het onderzoek was om een testbatterij voor te stellen die de verschillende werkingsmechanismen van genotoxiciteit afdekt met zo weinig mogelijk bioassays. De aan- of afwezigheid van een effect voor de watermonsters in de gekozen bioassays is weergegeven in tabel 3.

Tabel 1. Eigenschappen van de gekozen bioassays voor het experimentele onderzoek binnen het WiCE-programma. Details met betrekking van de uitvoering van de bioassays is te vinden in [15]

	Ames fluctuatie-test	Comet-assay	Micronucleus-test	Umu-test	p53-CALUX	ToxTracker
Biologisch effect	Genmutaties	Chromosoomschade		Reactie op DNA-schade		
Teststelsel	Bacteriën	Menselijke cellen	Menselijke cellen	Bacteriën	Menselijke cellen	Dierlijke cellen

Tabel 2. Beschrijving en eigenschappen van de gekozen watermonsters voor bioassay-onderzoek in dit project binnen het WiCE-programma [15]

Type water	Omschrijving
Regenwater	Opslag in een open vijver en beschouwd als oppervlaktewater op basis van het hogere gehalte totale organische koolstof (TOC) in vergelijking met regenwater
Behandeld regenwater	Regenwaterbehandeling met ultrafiltratie (UF) en omgekeerde osmose (RO)
RWZI A-effluent	Afvalwaterbehandeling met conventionele biologische actiefslibzuivering
RWZI B-effluent	Afvalwaterbehandeling met conventionele biologische actiefslibzuivering
Behandeld RWZI B-effluent	Aanvullende afvalwaterbehandeling met ozonisatie en actieve koolfiltratie
AWZI-effluent	Afvalwaterbehandeling met anaerobe en aerobe slibbehandeling, gevolgd door een secundaire zuiveringsstap en vijver met natuurlijke zuivering

Tabel 3. Genotoxiciteit werd vastgesteld als ten minste één van de geteste condities een respons gaf op basis van de assay-specifieke criteria. Rood: genotoxiciteit waargenomen, oranje: geen eenduidige respons, groen: geen genotoxiciteit waargenomen. UF-RO: ultrafiltratie gekoppeld aan omgekeerde osmose, O₃: ozonbehandeling [9]

	Genmutaties	Chromosomale schade		DNA schade respons		
	Ames	Comet	Micronucleus	umu	p53-CALUX	ToxTracker
Regenwater	Green	Green	Orange	Green	Green	Green
Regenwater (na UF-RO)	Green	Green	Green	Green	Green	Green
RWZI A-effluent	Green	Red	Green	Red	Green	Green
RWZI B-effluent	Green	Green	Green	Red	Green	Green
RWZI B-effluent (na O ₃)	Green	Green	Green	Green	Green	Green
AWZI-effluent	Red	Green	Green	Red	Green	Green

Bovenstaande resultaten laten zien dat niet elke bioassay hetzelfde resultaat geeft voor een bepaald watermonster. Dat bij blootstelling aan hetzelfde monster de ene genotoxiciteitsassay wel reageert en een andere niet is te verklaren door verschillen in werkingsmechanisme en hoe goed de bioassay de aan- of afwezigheid van het effect waarop getest wordt juist aantoont (gevoeligheid en specificiteit). Afwezigheid van een bioassayrespons kan er dus op wijzen dat er geen stoffen met het voor de bioassay specifieke werkingsmechanisme aanwezig waren, of dat de concentraties van deze stoffen in het concentraat te laag waren.

Uitgangspunten voor de inzet van bioassays voor genotoxiciteit

Op basis van de huidige resultaten is het nog niet mogelijk een definitieve selectie van assays te maken voor een basisset voor genotoxiciteit, omdat niet kan worden bepaald of de bioassays de juiste voorspelling geven. Desalniettemin brengt het onderzoek de verschillen tussen de uitkomsten van zes bioassays toegepast op alternatieve bronnen en waterhergebruikstoepassingen in beeld. Momenteel is in de praktijk van waterkwaliteitsbeoordeling de meeste ervaring met de Ames-fluctuatietest en p53-CALUX. Afhankelijk van de vraagstelling in een onderzoek, kunnen andere bioassays (ook) relevant zijn. Daarnaast kunnen praktische overwegingen een rol spelen bij de keuze van bioassays.

Het meten van de twee mechanismen die leiden tot onherstelbare DNA-schade (genmutaties en chromosomale afwijkingen), zoals de Ames-test en micronucleus-test doen, kan relevant zijn voor risicobeoordeling van stoffen. Een basisset voor waterkwaliteitsmonitoring die de Ames-test en micronucleus-test omvat, is in lijn met de testbatterijen voor de toelating van medicijnen, chemicaliën en voedingsingrediënten. Een dergelijke testbatterij voor genotoxiciteit wordt vooral relevant geacht voor drinkwatertoepassingen, maar wellicht in mindere mate voor andere vormen van water(her)gebruik, omdat directe menselijke consumptie daar geen rol speelt.

Welke assay?

De comet-assay, micronucleus-test, p53-CALUX en ToxTracker zijn uitgevoerd met menselijke of zoogdiercellen en kunnen worden gezien als relevanter voor de inschatting van humane gezondheidseffecten dan bioassays waarvoor bacteriën worden gebruikt. Er zijn namelijk aanzienlijke verschillen tussen menselijke en bacteriële cellen op het gebied van opname en afbraak van stoffen. Bioassays met bacteriën waren in het huidige onderzoek de Ames-fluctuatietest en umu-test.

De Ames-fluctuatietest was in dit onderzoek de enige bioassay waarmee genmutaties worden gemeten. Er zijn wel bioassays die genmutaties met menselijke en zoogdiercellen, maar deze zijn niet kostenefficiënt voor watermonsters. De uitvoering hiervan vraagt namelijk veel manuren. Wanneer een belangrijk uitgangspunt van een teststrategie is om de twee mechanismen van onherstelbare DNA-schade goed af te dekken, kan men dus eigenlijk niet om de Ames-test heen.

Van afbraak- of transformatieproducten die gevormd worden tijdens bijvoorbeeld geavanceerde oxidatie, is bekend dat deze DNA-schade kunnen veroorzaken [3]. Daarom zijn de Ames-fluctuatietest en p53-CALUX opgenomen in bestaande basissets [5], [6]. Of de andere bioassays in dit kader vergelijkbaar relevant zijn moet nog verder worden onderzocht [9]. Op basis van het huidige onderzoek kunnen hier geen uitspraken over worden gedaan.

De met de comet-assay gemeten DNA-schade kan worden hersteld, waardoor deze assay mogelijk geen goed beeld geeft van daadwerkelijke DNA-schade. De comet assay kent daarnaast praktische beperkingen (hij is gevoelig voor variatie en arbeidsintensief). Er zijn echter mogelijkheden voor opschaling en automatisering. De micronucleus-test en comet-assay kunnen ook in het veld (*in situ*) worden uitgevoerd en zijn niet gebonden aan een specifieke bacteriestam of cellijn, zoals bij andere bioassays wel het geval is.

De ToxTracker-assay is primair ontwikkeld voor het voorspellen van verschillende genotoxische eigenschappen van nieuwe medicijnen, chemicaliën, persoonlijke verzorgingsproducten en voedingsingrediënten. De test kan door het gedegen protocol (hij meet effecten op zes verschillende mechanismen) worden gezien als een vergaande test in waterkwaliteitsmonitoring.

De umu-test en p53-CALUX zijn vergeleken met de andere bioassays het meest kostenefficiënt. Wanneer in het geval van een calamiteit snel resultaten gewenst zijn, zijn sommige bioassays minder geschikt vanwege de relatief lange doorlooptijd (bijvoorbeeld ongeveer drie dagen voor de Ames-fluctuatietest en één tot twee weken voor de micronucleus-test en comet-assay). De resultaten van de umu-test kunnen binnen een dag beschikbaar zijn. Op basis van het relatief hoge aantal gevonden effecten voor de hier geteste monsters is het nog niet duidelijk of de voorspelling van de umu-test mogelijk te streng is of juist reëel. De huidige resultaten laten wel zien dat de umu-test geschikt lijkt om te prioriteren voor vervolgonderzoek (mogelijk worstcasescenario), wat bijvoorbeeld in het geval van calamiteiten en screening nuttig is.

Het wordt aanbevolen om de responsen van de bioassays die genotoxische activiteit meten in het kader van waterkwaliteitsbeoordeling verder te onderzoeken om een betere onderlinge vergelijking te kunnen maken. Echter, als de samenstelling van de vervuilende stoffen in een watermonster niet (volledig) bekend is, is het niet altijd mogelijk vast te stellen welke stof of stoffen zorgen voor het effect in een bioassay, omdat niet van elke stof bekend of deze DNA-schade veroorzaakt. Het testen van bekende mengsels met (water)relevante concentraties van stoffen waarvan dergelijke gegevens beschikbaar zijn, kan hierbij helpen. De voorspellende waarde van bioassays voor een bepaald effect binnen waterkwaliteitsmonitoring of een risico voor de mens kan verder worden onderzocht aan de hand van gegevens van individuele stoffen in water. Hierbij worden de gevonden effecten vergeleken met gegevens van effecten in de mens (of in dieren). Een dergelijk onderzoek zou goed passen naast lopende initiatieven binnen het NORMAN-netwerk [10] en het Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals (PARC) [11].

Conclusie

Dit onderzoek laat zien dat de onderzochte bioassays toepasbaar zijn op de verschillende watermonsters en geeft een eerste indruk van de mogelijke effecten van verschillende typen water. Daarnaast biedt dit onderzoek handvatten voor de keuze van bioassays voor het meten van genotoxische activiteit binnen waterkwaliteitsmonitoring van alternatieve bronnen en hergebruikstoepassing. Tegelijkertijd geeft het aanbevelingen voor vervolgonderzoek om de positie van verschillende bioassays in een basisset voor het meten van genotoxische activiteit verder te onderzoeken.

Dankwoord

Dit onderzoek is gefinancierd uit het gezamenlijke onderzoeksprogramma Water in de Circulaire Economie (WiCE) van de Nederlandse waterbedrijven en het Vlaamse waterbedrijf De Watergroep. Met bijdragen van Leonie Veldhuizen-Pap, René van Doorn, Milou Dingemans (KWR), Yvonne van Oorschot (Het Waterlaboratorium), Laila Kuipers, Evie Egelmeers en Ruben Addie (Hogeschool Utrecht), Remco Derr (Toxys), Andrea Sehr (Umweltbundesamt), Evelyn de Meyer (De Watergroep), Ron van der Oost, Manon Bechger, Christa Morgenschweis (Waternet).

Referenties

1. Didde, R. (2022). 'Een dikke onvoldoende voor waterkwaliteit'. *Wageningen World* 2022, nummer 3, p10-15.
2. Europese Commissie (2000). *RICHTLIJN 2000/60/EG VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 23 oktober 2000 tot vaststelling van een kader voor communautaire maatregelen betreffende het waterbeleid*. <https://eur-lex.europa.eu>.
3. Baken, K. et al. (2015). 'Ontstaan en opsporing van nevenproducten bij UV-processen'. *H2O-online* 30 november 2015.
4. Reus, A. Hofman-Caris, R., Oost, R. van der, Meyer, E. de, Hoekstra, M. (2024). 'De hergebruiksmogelijkheden van water beoordelen met bioassays'. *H2O-Online*, 1 juli 2024. <https://www.h2owaternetwerk.nl/vakartikelen/de-hergebruiksmogelijkheden-van-water-beoordelen-met-bioassays>
5. Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., Vanparys, P.A. (2011). 'Core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins'. *Mutat Res*. 2011 Mar 18;721(1):27-73.
6. Baat, M. de, Berg, S., van den, Pronk, T (2022). *Het toepassen van bioassays binnen Nederland*. Deltafact, versie 1.0, 20 december 2022.
7. Ecofide (2023). *Handreiking voor het uitvoeren van biologische effectmonitoring bij vergaande zuivering van RWZI-effluenten*. Versie 0.8, 8 juni 2023.
8. Grummt et al. (2020). *Tox-Box Guideline - Hazard-based risk management of anthropogenic trace substances in drinking water to secure a long-term drinking water supply*. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/5620/dokumente/2020-04-23_leitfaden_toxbox_engl.pdf
9. Baken, K., Dingemans, M. (2017). *Effect-based monitoring with bioassays – a roadmap*. BTO report 2017.008, KWR Water Research Institute, October 2017.
10. Reus, A. (2023). *Bioassays for water quality assessment in the circular economy*. KWR rapport 2023.043. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, juni 2023.
11. *NORMAN, Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances*. [WELCOME TO THE NORMAN NETWORK | NORMAN \(norman-network.net\)](https://www.norman-network.net).
12. Marx-Stoelting, P. et al. (2023). 'A walk in the PARC: developing and implementing 21st century chemical risk assessment in Europe'. *Arch Toxicol*. 2023 Mar;97(3):893-908.