

In vivo bioassays

Werkingsmechanisme

Organismen reageren op de stoffen waaraan ze worden blootgesteld. Hoe toxischer de stof, of het mengsel van stoffen, en hoe hoger de concentratie van die stoffen, hoe sterker de respons van het organisme zal zijn. Door de respons van levende (*in vivo*) organismen op stoffen onder gecontroleerde omstandigheden te meten kunnen de toxische effecten van de stoffen gekwantificeerd worden. Vaak gebruikte eindpunten zijn sterfte, groei en ontwikkeling, waarin de effecten van meerdere toxiciteitstrajecten worden vastgelegd die tot hetzelfde effect leiden in het levende organisme. Voor *in vivo* testen worden meestal modelorganismen gebruikt, welke worden gekozen omdat ze gemakkelijk te kweken of fokken zijn, er veel over de organismen en hun responsen bekend is, en omdat de verkregen onderzoeksresultaten goed reproduceerbaar zijn. *In vivo* testen worden al decennialang toegepast voor toxiciteitstesten en de verkregen resultaten daarvan zijn vaak de bron waarop waterkwaliteitsnormen voor individuele stoffen worden gebaseerd. Maar *in vivo* testen kunnen ook worden ingezet als bioassays om de gecombineerde toxische effecten van stoffen in veldmonsters te kwantificeren. In het bioassay-spoor van de ESFT2 ligt de focus op het gebruik van *in vivo* assays die in wellsplaten kunnen worden uitgevoerd om de uitvoering in hoge capaciteit en relatief lage kosten mogelijk te maken.

Procedure

Voorheen werden *in vivo* testen meestal als bioassay ingezet door de organismen direct bloot te stellen aan een veldmonster. Op deze manier worden de gecombineerde effecten van alle stressoren, zoals microverontreinigingen, maar ook van nutriënten, het zoutgehalte, ammonium, etc., op de organismen gekwantificeerd. De laatste jaren wordt het echter steeds gebruikelijker om *in vivo* testen bloot te stellen aan waterextracten. Zo worden de stoffen geïsoleerd en wordt het effect van enkel de microverontreinigingen op de levende organismen zichtbaar. Deze laatste aanpak sluit goed aan bij het doel van de ESFT2 om de effecten van microverontreinigingen in water te kwantificeren.

Voordat de bioassays uitgevoerd kunnen worden moeten de testorganismen gekweekt of geactiveerd worden. Voor een bioassay met watervlooien (*Daphnia*) moet er bijvoorbeeld een gezonde kweek worden aangelegd waaruit voldoende individuen van dezelfde leeftijd kunnen worden geoogst, terwijl voor een bacteriële inhibitie bioassay (bijv. Microtox) simpelweg de gevriesdroogde bacteriën in testmedium moeten worden geactiveerd. Vervolgens worden de organismen voor de voorgeschreven tijdsduur blootgesteld aan een verdunningsreeks van het waterextract. Dit kan een periode zijn van enkele minuten tot meerdere dagen. Gelijktijdig worden de organismen ook blootgesteld aan een positieve en negatieve controle om de validiteit van de test te controleren. Na de blootstellingstijd worden de effecten op de organismen gekwantificeerd door bijvoorbeeld overleving te tellen of lichtproductie te meten. Omdat er een concentratiereeks van het extract wordt gebruikt kunnen er dosis-respons relaties worden gemaakt, waarin het waargenomen effect wordt uitgedrukt als een functie van de relatieve concentrering van het watermonster (relative enrichment factor; REF). Door vervolgens de inverse te nemen van de REF waarbij het beoogde effect wordt bereikt, bijvoorbeeld de concentratie waarbij 10 of 50 procent inductie van het effect t.o.v. de controle wordt waargenomen (EC₁₀ of EC₅₀), kan de toxiciteit van het watermonster uitgedrukt worden in zogenaamde toxic units (TU):

$$1/REF = TU$$

Hieruit volgt dat hoe lager de concentrering waarbij het monster een effect veroorzaakt in de bioassay is, hoe hoger de respons, uitgedrukt in TU, is.

Voor de binnen ESFT2 geselecteerde *in vivo* assays is geen aanvullende monster bewerking nodig, en kunnen de standaard bemonstering- en monstervoorbewerking procedures gevolgd worden.

In vivo assays in de basis-set

Een aantal *in vivo* assays is zeer geschikt voor de reguliere monitoring van de potentiële toxiciteit van oppervlaktewater. De *in vivo* assays geven allemaal een indicatie voor de algemene toxiciteit van het watermonster, waarin de gezamenlijke effecten van alle bioactieve stoffen worden samengevat. Daarnaast kunnen de assays indicatief zijn voor specifieke effecten op bepaalde organisme(groep)e(n). Zo is de *Daphnia* immobilisatie assay indicatief voor effecten op macrofauna, terwijl de algentesten indicatief zijn voor effecten op primaire producenten zoals algen en waterplanten (Tabel 1). Microtox dekt dan weer de gevolgen voor bacteriën af.

Gezamenlijk dekken deze assays een groot deel van de activiteiten van de toxische stoffen die mogelijk aanwezig zijn in oppervlaktewater, terwijl ze ook indicatief zijn voor effecten op een groot deel van de organismegroepen die tegen de vervuiling van oppervlaktewater beschermd moeten worden. Ook zijn deze testen uit te voeren in wellsplaten, wat de uitvoering in hoge capaciteit (high-throughput) mogelijk maakt. Daarom zijn deze testen opgenomen in de bioassay basis-set van de ESFT2 (Tabel 1). Voor de twee algentesten kan gekozen worden voor één van de twee testen, of, waar mogelijk, de gecombineerde algentest die beide eindpunten (fotosynthese inhibitie én groei) tegelijk meet, afhankelijk van de beschikbaarheid, kosten en tijdsduur van de bioassays. Standaard in de bioassay basis-set is de 'Algen groei inhibitie' opgenomen. Voor specifieke vragen met betrekking tot de effecten van microverontreinigingen op vissen kan de zebravis (embryo)test worden ingezet (zie ook het achtergronddocument [Basis-set bioassays](#)). Deze test is ook zeer geschikt voor het meten van de algemene toxiciteit van een breed scala aan stoffen. Echter, gezien de hoge kosten van deze test en de geschiktheid van de andere *in vivo* bioassays is ervoor gekozen de zebravis bioassay niet op te nemen in de bioassay basis-set van de ESFT2.

Tabel 1. *In vivo* assays opgenomen in de bioassay basis-set voor oppervlaktewater (Milieu) van de ESFT2.TU = Toxic unit

Naam	Effect	Duur	Indicatief voor	Eenheid effect	Onderdeel van ESFT1
Microtox	Bacteriële inhibitie	15-30 min	Algemene toxiciteit, effecten op bacteriën	TU	JA
Daphnia immobilisatie	Watervlooien immobilisatie	48 u	Algemene toxiciteit, effecten op macrofauna	TU	JA
Alg groei	Algen groei inhibitie	72 u	Algemene toxiciteit, effecten op algen en macrofyten	TU	JA
Alg fotosynthese	Algen fotosynthese inhibitie	2-4,5 u	Activiteit fotosynthese remmers, effecten op algen en macrofyten	TU	NEE

Aanbieder(s) en kosten

De hierboven genoemde *in vivo* bioassays worden aangeboden door verschillende laboratoria en kennisinstituten in Nederland. Voor een overzicht van de aanbieders van de verschillende assays kan het document [Overzicht aanbieders advies en uitvoering](#) geraadpleegd worden. De kosten voor het uitvoeren van de bioassays bedragen enkele honderden euro's per monster.