

Sleutelfactor Toxiciteit



Impact van twee geneesmiddelen op aquatische mesocosms geëvalueerd met een combinatie van effectgebaseerde methoden en structurele en functionele eindpunten

Achtergronddocument beschikbare kennis bij de sleutelfactor Toxiciteit

Auteurs:

Lara Schuijt (WUR)
Sanne van den Berg (WEnR)
Paul van den Brink (WUR & WEnR)

Contact: paul.vandenbrink@wur.nl

Datum: 30 november 2021

Bij verwijzing naar deze notitie graag de volgende gegevens gebruiken:
Schuijt, L., Van den Berg, S. en Van den Brink, P.J. (2021). Impact van twee geneesmiddelen op aquatische mesocosms geëvalueerd met een combinatie van effectgebaseerde methoden en structurele en functionele eindpunten. Kennis Impuls Water Kwaliteit.

Highlights

1. Voor de twee geteste geneesmiddelen wordt een grote overlap gevonden tussen structurele en functionele eindpunten geobserveerd in een semi-veld experiment en bioassay resultaten
2. Structurele en functionele eindpunten geven echter een completer en meer gedetailleerder beeld
3. Relaties tussen bioassay-responsen en ecologische effecten zijn nodig om bioassays te kalibreren naar ecotoxicologisch relevante eindpunten
4. Een combinatie van bioassay-batterijen met landgebruik-scenario's wordt als arbeidsarme oplossing voorgesteld om ecotoxicologische risico's aan te geven

Inhoudsopgave

Highlights	2
Inhoudsopgave	3
Samenvatting	4
1. Inleiding	5
2. Materialen en methoden	6
2.1. Experimentele opzet	6
2.2. Structurele en functionele eindpunten	7
2.3. Bioassay batterij	7
2.4. Statistische analyses	8
3. Voorlopige resultaten	9
3.1. Chemische dynamiek	9
3.2. Structurele en functionele responsen	9
3.3. Bioassay batterij responses	10
4. Discussie en conclusies	12
Colofon	14
Referenties	15
Bijlage A	17
Bijlage B	18

Samenvatting

Geneesmiddelen worden over heel de wereld gebruikt voor het behandelen van mensen en dieren, en eindigen daardoor regelmatig in het aquatische milieu. Eenmaal daar beland kunnen ze door hun sterke biologische activiteit en continue emissie naar het milieu zelfs bij lage concentraties voor schadelijke effecten zorgen bij niet-doelorganismen. Deze effecten zijn vaak niet-lethaal, maar beïnvloeden het gedrag, de reproductie en de groei van deze organismen. De exacte consequenties van deze effecten op ecosysteem niveau zijn echter nog niet voldoende onderzocht. Het doel van deze studie was daarom om de effecten van twee geneesmiddelen (de antidepressiva fluoxetine (FLU), en de antibiotica sulfamethoxazole (SMX)) op het aquatische ecosysteem te onderzoeken. Dit hebben we gedaan met behulp van 30 semi-veld aquatische testsystemen. Zes van deze systemen diende als controle, 12 hebben we blootgesteld aan FLU (0.2, 2, 20, of 200 µg/L, in sets van drie replica's per concentratie), en 12 hebben we blootgesteld aan SMX (0.15, 1.5, 15, of 150 µg/L, in sets van drie replica's per concentratie). De blootstelling duurde 7 weken. De systemen zijn enerzijds geëvalueerd aan de hand van structurele en functionele eindpunten zoals de macro-invertebraten, zoöplankton en fytoplankton samenstelling, en anderzijds aan de hand van een diverse set bioassays. De gezamenlijke evaluatie van zowel structurele en functionele eindpunten en bioassays helpt om inzicht te krijgen in het vermogen van de reeks geteste bioassays om de bioactiviteit en effecten van de twee geneesmiddelen te detecteren.

Uit onze resultaten blijkt dat er voor beide stoffen een grote overlap zit tussen het algemene beeld die de structurele en functionele eindpunten geven en die de bioassay geven. Echter geven de structurele en functionele eindpunten een completer en gedetailleerder beeld geven van de aard en omvang van de veranderingen die optreden in een gemeenschap onder chemische blootstelling, dan de reeks geteste bioassays. Zo was er een afname van Zygotera en Radix soorten in de FLU-behandelingen van respectievelijk 20 en 200 µg/L. Voor SMX was er een stijging van *Dugesia* sp. en *Chaoborus* sp. bij respectievelijk 15 en 1,5 µg/l. Effecten op de relevante bioassays werden echter pas gevonden bij 200 µg/l voor FLU en waren helemaal afwezig bij SMX. In het geval dat individuele soorten een response geven, zou nader onderzoek naar de ecologische rol, de wettelijke beschermingsstatus en het herstelvermogen van deze soorten richtinggevend moeten zijn voor een beslissing over de aanvaardbaarheid van het gevonden effect. Een dergelijk effect zou echter niet worden opgemerkt met alleen bioassay resultaten.

Over het algemeen tonen de huidige resultaten van deze studie aan dat bioassays en structurele en functionele eindpunten resulteren in een vergelijkbare toxiciteitsbeoordeling, hoewel een meer uitgebreide kalibratie in sommige gevallen noodzakelijk blijft. Het zou mogelijk zijn om bioassay-batterijen te gebruiken in combinatie met landschapsscenario's of chemische monitoring om mogelijke ecotoxicologische risico's aan te geven. In een dergelijk schema kunnen landschapsscenario's of chemische monitoring helpen bij het bepalen van de reeks verwachte chemicaliën en de bijbehorende MOA's. Deze informatie kan helpen bij het construeren van een bioassay-batterij die gevoelig genoeg is om de volledige set van mogelijk aanwezige MOA's te dekken. Grootschalige relaties tussen bioassay uitslagen en ecologische effecten zullen echter nodig blijven om deze bioassays te kalibreren naar ecotoxicologisch relevante eindpunten.

1. Inleiding

Geneesmiddelen worden over heel de wereld gebruikt om miljarden mensen te helpen genezen, en komen daarbij regelmatig in het aquatisch milieu terecht. Daar eenmaal aangekomen kunnen deze geneesmiddelen zelfs bij extreem lage concentraties schadelijke effecten hebben op niet-doelwitorganismen (De Lange et al., 2006). Geneesmiddelen, zoals antidepressiva en antibiotica, worden regelmatig aangetroffen in oppervlaktewateren, met concentraties variërend van 0,001 tot 10 µg/L in rivieren en tot 100 µg/L in rioolwater (Desbiolles et al., 2018). Deze milieuconcentraties zijn zodanig laag dat ze meestal niet tot dodelijke effecten op organismen leiden. Het is echter bekend dat ze ecologische kenmerken, zoals gedrag, activiteitsniveau, ontwikkeling en groei kunnen beïnvloeden (De Lange et al., 2006; Peeters et al., 2009; Fursdon et al., 2019).

In de afgelopen decennia is de consumptie van antidepressiva toegenomen (Tisler et al., 2019). Deze groep geneesmiddelen vormt een potentieel hoog risico voor het aquatische ecosysteem, zowel vanwege hun hoge voorkomen als vanwege hun persistentie in het milieu. Fluoxetine (FLU) is een van de meest voorgeschreven antidepressiva (Ford et al., 2018) en valt in de klasse van selectieve serotonineheropnameremmers (SSRI's). Van SSRI's is bekend dat ze de heropname van serotonine uit de synaptische spleet remmen en daardoor de signalen tussen neuronen verhogen. Effecten op individueel niveau zijn voornamelijk getest op vissen en hebben gedragsveranderingen en verminderde reproductie en groei aan het licht gebracht (Ford et al., 2018). De risico's voor het hele ecosysteem zijn echter nog niet uitgebreid bestudeerd (Gonzalez-Rey et al., 2006).

Een ander voorbeeld van een veel voorkomend geneesmiddel in oppervlaktewater is sulfamethoxazol (SMX). Dit antibioticum behoort tot de sulfonamiden en wordt beschouwd als een van de gevaarlijkste klassen van geneesmiddelen voor het milieu (Desbiolles et al., 2018). In Nederland wordt SMX in 30% van de sloten aangetroffen (Straub, 2016). Het antibioticum is zeer mobiel in het milieu en zou het evenwicht van ecosystemen kunnen verstoren door bacteriën (Rademaker en De Lange, 2009) en schimmelgemeenschappen (Bundschuh et al. 2009) te elimineren. Maar ook voor dit geneesmiddel zijn de risico's voor aquatische gemeenschappen en het functioneren van ecosystemen nog grotendeels onbekend.

Het doel van deze studie is om de effecten van de langdurige toepassing van beide geneesmiddelen op het aquatische ecosysteem onder semi-gecontroleerde omstandigheden te onderzoeken met behulp van mesocosms. Enerzijds hebben we de individuele effecten van FLU en SMX op belangrijke componenten van aquatische ecosystemen beoordeeld aan de hand van structurele en functionele eindpunten. Zo hebben we bijvoorbeeld de macro-invertebraten, zoöplankton, fytoplankton en microbiële gemeenschappen en de afbraak van organisch materiaal bestudeerd. Anderzijds hebben we het vermogen van een reeks bioassays beoordeeld om bioactiviteit en effecten van de specifieke verbindingen die in deze studie werden gebruikt te detecteren. Voor het Kennisimpuls-project ligt de focus vooral op het vergelijken van bioassayresultaten met resultaten op structurele en functionele eindpunten.

2. Materialen en methoden

2.1. Experimentele opzet

We hebben het experiment buiten uitgevoerd op het proefstation Sinderhoeve in Renkum (Nederland, www.sinderhoeve.org) van half juni tot half oktober 2019 (4 maanden). In totaal gebruikten we 30 mesocosms met een afmeting van 1,8 x 0,8 m (diameter x diepte), met een totaal watervolume van 1.500 liter en 10 cm sediment. Drie maanden voor de toepassing van de stoffen heeft iedere cosm dezelfde hoeveelheden macro-invertebraten, zoöplankton, fytoplankton, macrofyten (Elodea en Myriophyllum) en wat extra sediment (voor (rust)eieren, diasforen en microbiële gemeenschap) ontvangen, afkomstig uit niet-verontreinigde zoetwaterbassins gesitueerd op de Sinderhoeve. In de achtervolgende drie maanden kreeg de gemeenschap de tijd om te koloniseren en te acclimatiseren.

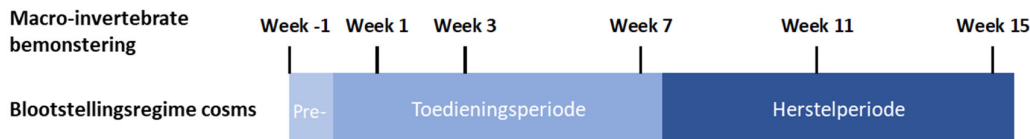
Half juni zijn we begonnen met het toepassen van FLU (99,95%, van Sigma Aldrich) en SMX (100%, van Sigma Aldrich) met elk 4 verschillende blootstellingsconcentraties en een controle behandeling met het gebruikte oplosmiddel (10 ml aceton) (Tabel 1). Dit concentratiebereik omvatte ecologisch relevante chronische blootstellingen, aangezien ze in het bereik van de chronische (langdurige) Predicted No Effect Concentration (PNEC) liggen, welke de grensconcentratie aangeeft waaronder een chronische blootstelling aan een stof niet tot schadelijke effecten op aquatische organismen leidt (Tabel 1). De concentraties (3 herhalingen voor elke concentratie van de geneesmiddelen) werden gedurende 8 weken op de beoogde concentratie gehouden door de chemische stof wekelijks op dinsdag aan te brengen na meting van de resterende niveaus op maandag. Een oplosmiddelcontrolebehandeling (10 ml aceton, 6 herhalingen) werd op dezelfde manier gehandhaafd, waarbij oplosmiddelconcentraties met een wekelijks interval werden toegepast. Elke behandeling werd willekeurig toegewezen aan de cosms. FLU en SMX werden gedurende 2 maanden elke week toegepast, gevolgd door een herstelperiode van 2 maanden (Fig. 1).

Tabel 1. Beoogde concentraties van fluoxetine en sulfamethoxazol die in dit experiment zijn gebruikt, evenals hun chronische voorspelde concentratie zonder effect (PNEC) volgens de NORMAN-database¹. Tussen haakjes staat het aantal cosms dat aan de verschillende behandelingen is toegewezen. Beide chemicaliën deelden dezelfde controle cosm.

Fluoxetine, PNEC = 0.1 µg/L	Sulfamethoxazole, PNEC = 0.6 µg/L
Oplosmiddelcontrole (6)	
0.2 µg/L (3)	0.15 µg/L (3)
2 µg/L (3)	1.5 µg/L (3)
20 µg/L (3)	15 µg/L (3)
200 µg/L (3)	150 µg/L (3)

¹Langdurige PNEC waardes zijn uit het Norman Ecotoxicology Database (www.norman-network.com) gehaald op 6 januari 2021.

Watermonsters van alle cosms werden direct na het aanbrengen (t=0 dagen) en rond 24 uur (t=6 dagen) voor de volgende toediening genomen. De dosering werd aangepast op basis van de gemeten concentratie 24 uur voor de volgende toepassing, om de beoogde concentraties te bereiken. Daarnaast hebben we op 1 dag en 3 dagen na elk toedieningsmoment watermonsters genomen van de FLU behandelingen 2 µg/l en 200 µg/l en SMX behandelingen 1,5 µg/l en 150 µg/l om de precieze afbraaksnelheid vast te stellen.



Figuur 1. Schematisch overzicht van de experimentele opzet, inclusief de blootstellingsregimes en bemonsteringsweken (voor macro-invertebraten). In week 7 hebben we watermonsters verzameld voor de bioassay-batterij.

2.2. Structurele en functionele eindpunten

De structurele en functionele eindpunten die we hebben beoordeeld omvatten fysisch-chemische parameters, primaire producenten, macro-invertebratengemeenschap, zoöplanktongemeenschap en microbiële gemeenschap. Effecten op fysisch-chemische parameters werden beoordeeld door patronen van opgeloste zuurstof, pH, elektrische geleidbaarheid en temperatuur over de tijd te volgen. Primaire producenten hebben we gemeten door de hoeveelheid chlorofyl-a in het water te meten en door daarnaast de dekking van macrofyten per cosm in te schatten door deze te classificeren van 0% (geen planten) tot 100% (cosmoppervlak volledig bedekt met planten). Zoöplankton- en macro-invertebratengemeenschappen zijn beoordeeld door de samenstelling van soorten over de tijd te evalueren.

2.3. Bioassay batterij

Na twee maanden blootstelling (week 7), verzamelden we diepte-geïntegreerde steekmonsters van verschillende locaties in elke mesocosms met behulp van een Perspex®-buis in schone 1L HDPE-flessen en bewaarden deze in een vriezer bij -20°C tot verwerking. Dit water is tevens gebruikt voor het uitvoeren van de bioassay-batterij (behalve de *Daphnia in situ*). Zie bijlage A voor de extractiemethode.

In deze studie is een batterij bestaande uit 10 bioassays uitgevoerd (Tabel 2). Bioassays met hele organismen bestonden uit *Daphnia magna* (watervlo), *Brancionus calyciflorus* (raderdiertje), *Raphidocelis subcapitata* (algen) en *Vibrio fischeri* (bacteriën) en zijn uitgevoerd door Wageningen Marine Research (Den Helder, Nederland). De *in vitro* CALUX-assays zijn uitgevoerd door BioDetection Systems (Amsterdam, Nederland) en MEA zal nog worden uitgevoerd in het laboratorium van IRAS (Utrecht, Nederland).

Tabel 2. Bioassay-batterij toegepast om de toxiciteit van het mesocosm-water te beoordelen. Effect-based trigger (EBT) waarden zijn gedefinieerd door Escher et al., 2018 (anti-AR), De Baat et al., 2020 (Anti-PR) en Van der Oost et al., 2017 (Bacteriële groei inhibitie, Sulfonamides).

	Bioassay	Eindpunt	Referentie stof	EBT	Eenheid
<i>In vivo</i>	Daphnia in situ	Immobilisatie en mortaliteit	NA	20	%
	Daphniatox	Immobilisatie	NA	20	%
	Rototox	Mortaliteit	NA	20	%
	Alगतox	Algen groei inhibitie	NA	20	%
	Microtox	Luminescentie inhibitie	NA	20	%
<i>In vitro</i>	Cytotox	Cytotoxiciteit	TBT		µg TEQ/L
	Anti-AR	Antiandrogene activiteit	flutamide	14.4	µg FEQ/L
	Anti-PR	Antiprogestagene activiteit	Ru486 (Mifepriston)	13	ng REQ/L
	SULFlux	Bacteriële groei inhibitie (Sulfonamides)	sulfamethoxazole	100	ng SEQ/L
	MEA	Neurotoxische activiteit	*	*	*

* data nog niet beschikbaar

2.4. Statistische analyses

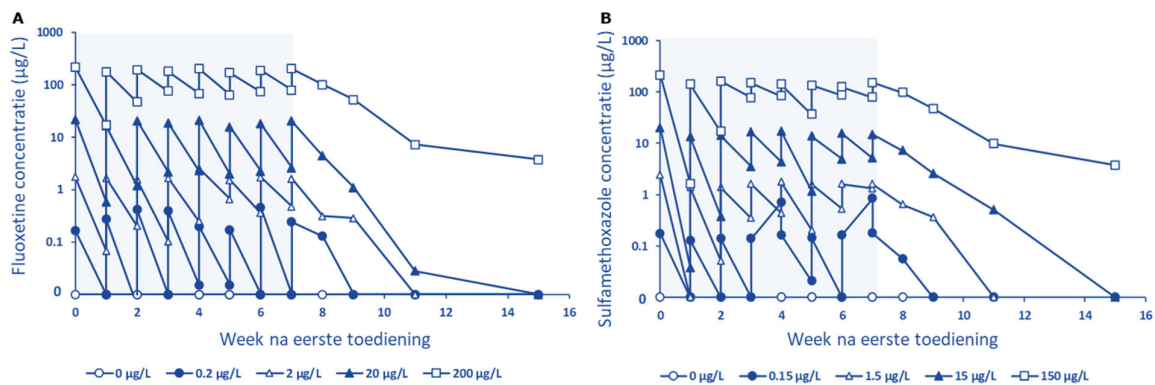
De Williams-test ($p < 0,05$) is uitgevoerd op de macro-invertebraten data om de concentraties zonder waargenomen effect (NOEC's) voor de macro-invertebraten taxa te bepalen (Sumon et al., 2018). Hiervoor is gebruik gemaakt van het computerprogramma Community Analysis, versie 4.3.05 (Hommen et al., 1994).

De fysisch-chemische gegevens zijn beoordeeld met lineaire gemengde modellen (LMM's) met behulp van SPSS Advanced Statistics versie 25 (IBM Corporation 1989, 2013). Hiervoor hebben we eerst gecontroleerd of dat de abiotische waarden normaal waren verdeeld en of dat de variantie homogeen verdeeld was. Voor zuurstof, pH en temperatuur werd het herhaalde covariantietype Compound Symmetry gebruikt, omdat hun structuur een constante variantie en constante covariantie had. Elektrische geleidbaarheid werd geanalyseerd met het heterogene covariantietype Compound Symmetry, omdat de covariantiestructuur heterogeen was en een constante correlatie tussen elementen had. Cosmnummer werd gebruikt als willekeurig effect en de cosmnummers waren genest in de behandeling. Wanneer de p-waarden van de LLM significant waren, werd de post-hoc Sidak-test gebruikt. De Sidak post-hoc-test past het significantieniveau aan en biedt strakkere grenzen dan de Bonferroni-test (IBM Corporation 1989, 2013).

3. Voorlopige resultaten

3.1. Chemische dynamiek

De voorlopige resultaten tonen aan dat FLU en SMX over het algemeen snel uit de waterfase verdwenen (Figuur 2). Eerdere studies hebben gevonden dat de verdwijning van FLU uit de waterfase grotendeels wordt gedomineerd door sorptie aan sedimenten (Kwon et al., 2006), terwijl dit voor SMX voornamelijk door fotodegradatie komt (Isidori et al., 2005). Met ons wekelijkse toepassingsschema zijn we er echter in geslaagd om de beoogde tijdgewogen gemiddelde concentraties te handhaven (Figuur 2). Aan het einde van het experiment (dag 105) worden alleen in de hoogste behandeling nog concentraties boven het detectielimiet gevonden (gemiddeld 3,7 µg/L voor beide).



Figuur 2. Dynamiek van fluoxetine (A) en sulfamethoxazol (B) concentraties in mesocosmwater. De applicatieperiode (week 0 t/m 7) is in grijs weergegeven en de herstelperiode (week 8 t/m 15) in wit.

3.2. Structurele en functionele responsen

We vonden een behandeling gerelateerde afname van de concentraties opgeloste zuurstof (DO) en pH in de hoogste FLU-behandeling. Deze afname was te zien tijdens de gehele applicatieperiode en ook de eerste twee weken van de herstelperiode (van week 0 tot week 9). In dezelfde periode vonden we verhoogde niveaus van elektrische geleidbaarheid (EC) in de hoogste FLU-behandeling. Tabel 3 toont de gemiddelde waarden van de fysisch-chemische parameters van bemonsteringsweek 7.

Tabel 3. Significante functionele en structurele eindpunten gemeten in bemonsteringsweek 7 van het mesocosm-experiment. Een - geeft aan dat er geen significant verschil was ten opzichte van de controlebehandeling, terwijl <0.05 aangeeft dat dit verschil wel significant was. Een * geeft aan dat de data nog niet beschikbaar was. De temperatuur wordt niet weergegeven.

Stof	Conc (µg/L)	EC (µS/cm)	pH	DO (mg/l)	Turbiditeit (FTU)	Micro-organ.	Algen (µg chl-a/L)	Macrofyten (% cover)	Zoo-plankton	Macro-invert
Controle	0	-	-	-	-	*	-	-	*	-
FLU	0.2	-	-	-	-	*	-	-	*	-
FLU	2	-	-	-	-	*	-	-	*	-
FLU	20	-	--	--	-	*	< 0.05	-	*	< 0.05
FLU	200	< 0.05	< 0.05	< 0.05	-	*	< 0.05	-	*	< 0.05
SMX	0.15	-	-	-	-	*	-	-	*	-
SMX	1.5	-	-	-	-	*	-	-	*	< 0.05

SMX	15	-	-	-	-	*	-	-	*	< 0.05
SMX	150	-	-	-	-	*	-	< 0.05	*	-

De afname van de zuurstofconcentratie en pH suggereert een afname van fytoplankton. We vonden inderdaad een afname van de chlorofyl-a-concentratie (Tabel 3). Een verlaging van de chlorofylconcentraties werd ook waargenomen bij de SMX 15 µg/L-behandeling, hoewel dit effect niet significant was. Bij de hoogste SMX-behandelingen vonden we een significante afname van de macrofytenbedekking (Tabel 3).

We hebben in totaal, over de gehele experimentele periode, 75 verschillende macro-invertebraten taxa in de cosms aangetroffen. Univariate analyse toonde aan dat Zygotera (NOEC = 2 µg/L) en *Radix sp.* (NOEC = 20 µg/L) de sterkst beïnvloede macro-invertebraten taxa waren voor FLU (zie tabel B1 in de bijlage). Voor SMX, toonde *Dugesia sp.* (NOEC = 1,5 g/L) en *Chaoborus sp.* (NOEC = 0,15 g/L) een toename in aantallen (Tabel B2).

3.3. Bioassay batterij responses

Van de 10 geplande bioassays zijn 9 bioassays tot nu toe met succes uitgevoerd, alleen de MEA-assays moeten nog worden uitgevoerd. De bioassay responses worden gegeven in Tabel 4. Voor de *in vivo* bioassays zijn effecten waargenomen voor FLU maar niet voor de SMX-behandelingen (Tabel 4). Algenremming was 100% voor de twee hoogste behandelingen in vergelijking met de controles, wat betekent dat algen (*Raphidocelis subcapitata*) de meest gevoelige organismen voor FLU in de bioassay-batterij waren. Bij de hoogste FLU-behandeling werd gemiddeld 90% sterfte waargenomen voor het raderdiertje (*Brachionus calyciflorus*) en 25% immobiliteit voor de watervlo *Daphnia magna* (Tabel 4).

Cytotoxiciteit is alleen waargenomen in de cosms die de hoogste dosis FLU hadden gekregen. Anti-AR CALUX-activiteit werd waargenomen in alle behandelingsgroepen, inclusief de controlegroep. Gemiddeld werd echter de hoogste anti-AR CALUX-activiteit waargenomen in de FLU 200 µg/L mesocosms, hoewel deze activiteit de triggerwaarde in Tabel 2 niet overschrijd. In de met FLU behandelde mesocosms is een dosisafhankelijke toename van anti-AR activiteit gevonden, terwijl voor SMX een lichte dosisafhankelijke afname in anti-PR-activiteit is waargenomen. Zoals verwacht voor de SULFlux-assay, vertoonden alleen de monsters die SMX bevatten activiteit (Tabel 4). De gemiddelde waarden van de activiteit gemeten door de SULFlux-assay overschreden de triggerwaarde van 100 ng SEQ/L in alle SMX-behandelingen.

Tabel 4. Bioassay resultaten van de geëxtraheerde mesocosm-monsters verzameld in week 7. In het wit zijn de *in vivo* bioassays weergegeven en in het grijs de *in vitro* bioassays. Een – geeft aan het bioassay resultaat de bijbehorende EBT-waarde niet overschrijd, terwijl >EBT aangeeft dat het bioassay resultaat boven de EBT van de bijbehorende bioassay viel. Een * geeft aan dat de data nog niet beschikbaar was, en <LOD geeft aan dat het bioassay resultaat onder het detectielimiet van de bioassay viel.

Behandeling	Conc (µg/L)	In vivo				In vitro				
		Daphniatox % effect	Rototox % effect	Microtox % effect	Alगतox % effect	Cytotox (µg TEQ/L)	Anti-AR (µg FEQ/L)	Anti-PR (ng REQ/L)	SULFlux (ng SEQ/L)	MEA assay
Control	0	-	-	-	-	<LOD	-	-	<LOD	*
FLU	0.2	-	-	-	-	<LOD	-	-	<LOD	*
FLU	2	-	-	-	-	<LOD	-	-	<LOD	*
FLU	20	-	-	-	>EBT	<LOD	-	-	<LOD	*
FLU	200	>EBT	>EBT	>EBT	>EBT	>EBT	-	-	<LOD	*

SMX	0.15	-	-	-	-	<LOD	-	-	>EBT	*
SMX	1.5	-	-	-	-	<LOD	-	-	>EBT	*
SMX	15	-	-	-	-	<LOD	-	<LOD	>EBT	*
SMX	150	-	-	-	-	<LOD	-	<LOD	>EBT	>EBT

4. Discussie en conclusies

Het hoofddoel van dit onderzoek in het kader van het Kennisimpuls Toxiciteit-project lag op het vergelijken van bioassay resultaten met resultaten op structurele en functionele eindpunten. Voor FLU leveren de structurele en functionele eindpunten vergelijkbare resultaten op als de *in vivo* bioassays. We vinden bijvoorbeeld een vermindering van algen bij de twee hoogste concentraties, zowel in de chlorofylmetingen (Tabel 3) als in de Algatox-bioassay (Tabel 4). Daarnaast vinden we een verandering in de macro-invertebraten gemeenschap bij de hoogste concentratie, zowel in de macro-invertebratenstructuur (Tabel 3) als in de ongewervelde bioassays (Daphniatox en Rototox, Tabel 4). Gezien de *in vitro* bioassays, komt de respons van de cytotox-bioassay overeen met Daphniatox-, Rototox- en Microtox-bioassays. De resultaten van de micro-organismen en zoöplanktonmetingen, samen met de MEA-bioassay, kunnen bevestigen dat zowel structurele en functionele eindpunten als effect-gebaseerde methoden in staat zijn om effecten van FLU op gemeenschapsniveau te beoordelen.

Voor SMX is het moeilijk om structurele en functionele en bioassay resultaten met elkaar te vergelijken, voornamelijk vanwege het ontbreken van de resultaten van de microbiële gemeenschapsanalyse. Aangezien SMX een antibioticum is, verwachten we dat micro-organismen de meest gevoelige taxonomische groep zullen zijn. Voor de andere taxonomische groepen zijn weinig structurele en functionele effecten waargenomen na blootstelling met SMX, met enkel een vermindering van de macrofytendekking bij de hoogste concentratie. Deze respons kon niet worden waargenomen in de resultaten van de bioassays, waarschijnlijk door het ontbreken van een bioassay die representatief is voor macrofyten. De Algatox-bioassay was fylogenetisch en functioneel de bioassay die van alle geteste bioassays het dichtst in de buurt kwam bij macrofyten, maar deze liet geen reactie zien op SMX. De SULFlux-bioassay gaf een respons die de EBT-drempel bij alle concentraties overschreed, en welke tevens duidelijk toenam met een verhoogde SMX-concentratie (Tabel 4). Deze bioassay is daarom een goede blootstellings-bioassay (in staat om aan te geven wanneer en in welke mate een specifieke stof(groep) aanwezig is in een watermonster). Zodra de resultaten van de microbiële gemeenschap bekend zijn, kan de EBT-drempel van de SULFlux-bioassay worden gekalibreerd op het meest gevoelige structurele en functionele eindpunt, waardoor deze beter voorspellend is voor effecten op gemeenschapsniveau.

Het is duidelijk dat structurele en functionele eindpunten een vollediger en gedetailleerder beeld geven dan een reeks bioassays omtrent de aard en omvang van veranderingen die in een gemeenschap optreden onder blootstelling aan chemische stoffen. Zo was er een afname in Zygotera- en Radix-soorten in de FLU-behandelingen van respectievelijk 20 en 200 µg/L (Tabel B1). Voor SMX was er een stijging in *Dugesia sp.* en *Chaoborus sp.* bij respectievelijk 15 en 1,5 µg/L (Tabel B2). Voor beide chemicaliën werden bij lagere concentraties effecten gevonden als er naar individuele soorten werd gekeken dan als er naar de ongewervelde dieren in de bioassay-batterij (Tabel 4), werd gekeken. Indien er in een standaard cosm studie een effect wordt gevonden op specifieke soorten, moet nader onderzoek naar de ecologische rol, de wettelijke beschermingsstatus en het herstelvermogen van deze soorten richtinggevend zijn voor een beslissing over de aanvaardbaarheid van het gevonden effect. Een dergelijk effect zou echter niet worden opgepikt met alleen bioassay-resultaten.

Over het algemeen laten de hedendaagse resultaten van deze studie zien dat bioassays en structurele en functionele eindpunten resulteren in een vergelijkbare toxiciteitsbeoordeling, hoewel een uitgebreidere kalibratie in sommige gevallen noodzakelijk blijft. Wellicht zou het mogelijk zijn om bioassay-batterijen te gebruiken in combinatie met landschapsscenario's of chemische monitoring om potentiële ecotoxicologische risico's aan te geven. In een dergelijk schema kunnen landschapsscenario's, idealiter in combinatie met chemische monitoring, helpen bij het bepalen van de reeks verwachte chemicaliën en de bijbehorende MOA's. Deze zouden kunnen helpen bij het selecteren van een bioassay-batterij die gevoelig

genoeg is om een groot gedeelte van de potentieel aanwezige MOA's te dekken. Grootschalige beoordeling van de relaties tussen bioassay-responsen en ecologische effecten zal echter nodig blijven om deze bioassays af te stemmen op ecotoxicologisch relevante eindpunten.

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 kennisinstituten 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.

Deze notitie is opgesteld in het kader van het Kennis Impuls Water Kwaliteit project "Toxiciteit" door Lara Schuijt, Sanne van den Berg, en Paul van den Brink van WEnR. Dank aan Chantal van Drimmelen en Hauke Smidt van de WU, en Jasper van Smeden, Laura Buijse, en Ivo Roessink van WEnR voor experimentele ondersteuning en chemische analyses. De inhoud is voorgelegd voor collegiale toetsing aan het kernteam en de gebruikersgroep van het project. Hun suggesties voor verbetering zijn in de eindversie verwerkt. De in deze notitie 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.

Referenties

Bundschuh, M., et al. "Antibiotics as a chemical stressor affecting an aquatic decomposer–detritivore system." *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 28.1 (2009): 197-203.

Desbiolles, F., et al. "Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: is there a risk for the Mediterranean aquatic environment?." *Science of the Total Environment* 639 (2018): 1334-1348.

De Baat, M. L., et al. "Advancements in effect-based surface water quality assessment." *Water research* 183 (2020): 116017.

De Lange, H.J. et al. (2006). "Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals." *Aquatic Toxicology* 78 (2006): 209-216

Escher, Beate I., et al. "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 (2018): 748-765.

Ford, A.T., et al., "The effects of fluoxetine on attachment and righting behaviours in marine (*Gibbula unibilicalis*) and freshwater (*Lymnea stagnalis*) gastropods." *Ecotoxicology* 27 (2018): 477-484.

Furston, J.B., et al. "The pharmaceutical pollutant fluoxetine alters reproductive behaviour in a fish independent of predation risk." *Science of the Total Environment*, 650 (2019): 642-652.

Gonzalez-Rey, M. and M.J. Bebianno, "Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*?" *Environmental pollution*, 173 (2013): 200-209.

Hommen, U., Düllmer, U. and Vith, D. "A computer program to evaluate plank-ton data from freshwater field tests." In: Hill, I. R., Heimbach, F., Leeuwangh, P. Matthiesen, P. (Eds), *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis Publishers, Boca Raton, United States of America (1994).

IBM Corporation 1989 "Chapter 5. Linear Mixed Models." In: *IBM SPSS Advanced Statistics 22*. United States of America (2013): 25-31.

Isidori, Marina, et al. "Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms." *Science of the total environment* 346.1-3 (2005): 87-98.

Kwon, J.W. and K.L. Armbrust, "Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments." *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006. 25(10): p. 2561-2568.

Peeters, E.T.H.M., de Lange, H.J. and Lüring, M. "Variation in the Behavior of the Amphipod *Gammarus pulex*." *Human and Ecological Risk Assessment*, 15 (2009): 41-52

Rademaker, W. and De Lange, M. "De risico's van geneesmiddelen in het aquatisch milieu." *H2O*, 5 (2009): 29-32.

Straub, J.O. "Aquatic environmental risk assessment for human use of the old antibiotic sulfamethoxazole in Europe." *Environmental toxicology and chemistry*, 35 (2016): 767-779.

Sumon, K.A., et al. "Effects of imidacloprid on the ecology of subtropical freshwater microcosms." *Environmental Pollution*, 236 (2018): 432-441.

Tisler, S., et al., "Transformation products of fluoxetine formed by photodegradation in water and biodegradation in zebrafish embryos (*Danio rerio*)."
Environmental science & technology, 2019. 53(13): p. 7400-7409.

Van der Oost, R. et al. "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 (2017): 2385-2399.

Bijlage A

Oasis HLB solid phase extractie (SPE)-patronen zijn gebruikt om fluoxetine, sulfamethoxazol en mogelijke transformatieproducten uit de watermonsters te extraheren voor bioanalyse. Het extractieprotocol is gebaseerd op Houtman et al. (2018). Eerst zijn de watermonsters gefilterd met 0,7 µm poriegrootte glasvezelfilters (47 mm diameter, Whatman, Verenigd Koninkrijk) en zijn de SPE-patronen (500 mg, 6 cm³, 30 m) geconditioneerd met 4 ml methanol/ethylacetaat (50:50 v/v) en in evenwicht gebracht met 5 ml MilliQ. Voor elke cartridge is 1 L monster onder vacuüm geëxtraheerd. Na drogen zijn de verbindingen in drie stappen uit de patronen opgelost met 3 ml methanol/ethylacetaat (50:50 v/v). De gecombineerde extracten zijn vervolgens verdampt bij 35 ° C met N₂ tot ze droog waren en opgelost in 100 L DMSO voor de bioassay-analyse. Extracten zijn tot gebruik in de vriezer bewaard bij -20°C.

Bijlage B

Tabel B1 De No Observed Effect Concentrations (NOEC's) berekend voor de verschillende taxa van macro-invertebraten gemeten op elke bemonsteringsweek voor fluoxetine in µg/L voor de waterbemonsteringsmethode (Williams-test; $p < 0,05$).

Macro-invertebraten	Bemonsteringsweek					
	-1	1	3	7	11	15
<i>Asellidae</i>	>	20↑	0↑	20↑	20↑	0↑
<i>Gammarus pulex</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Caenis sp.</i>	>	>	>	20↓	>	>
<i>Cloeon dipterum</i>	>	20↓	>	20↑	>	>
<i>Erpobdella sp.</i>	20↑	>	>	>	>	>
<i>Leaches other</i>	>	>	>	>	>	20↓
<i>Worms other</i>	>	20↑	20↑	-	-	-
<i>Hydracarina</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Zygoptera</i>	>	>	2↓	2↓	>	>
<i>Anisoptera</i>	20↓	>	>	>	>	>
<i>Flatworms other</i>	-	-	-	>	-	-
<i>Dugesia sp.</i>	>	>	2↑	>	>	>
<i>Mesostoma</i>	>	>	>		>	>
<i>Polycelis nigra/tenuis</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Tanypodinae</i>	>	>	>	>	20↑	>
<i>Tanytarsini</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Chaoborus sp.</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Chironomidae</i>	>	>	>	20↑	20↑	>
<i>Flies and mosquitoes other</i>	>	>	0.2↑	>	>	>
<i>Caddisfly sp.</i>	20↑	-	-	-	>	0↓
<i>Plea sp.</i>	>	>	>	20↑	>	>
<i>Heteroptera other</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Dysticidae</i>	>	>	>	>	-	>
<i>Beetles other</i>	>	>	>	>	20↑	>
<i>Lymnaea sp.</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Radix sp.</i>	>	20↓	20↓	>	>	>
<i>Snails other</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Sphaeridae</i>	>	>	>	>	20↓	>
<i>Parapoynx stratiotata</i>	-	-	20↓	>	>	>
<i>Sialis lutaria</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Triturus vulgaris</i>	>	>	20↑	>	>	-

> = geen significant effect (NOEC > 200 µg/L); (-) significante afname vergeleken met de controle.

Tabel B2 De No Observed Effect Concentrations (NOEC's) berekend voor de verschillende taxa van macro-invertebraten gemeten op elke bemonsteringsweek voor sulfamethoxazol in µg/L voor de waterbemonsteringsmethode (Williams-test; $p < 0,05$).

Macro-invertebraten	Bemonsteringsweek					
	-1	1	3	7	11	15
<i>Asellidae</i>	>	>	>	>	>	1.5↑
<i>Gammarus pulex</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Caenis sp.</i>	>	>	>	>	>	0.15↑
<i>Cloeon dipterum</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Erpobdella sp.</i>	>	>	15↓	>	>	>
<i>Leaches other</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Worms other</i>	>	15↑	-	-	>	>
<i>Hydracarina</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Zygoptera</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Anisoptera</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Flatworms other</i>	>	-	-	-	-	>
<i>Dugesia sp.</i>	>	>	1.5↑	15↑	>	15↑
<i>Mesostoma</i>	>	15↑	>	>	0↑	>
<i>Polycelis nigra/tenuis</i>	>	>	>	>	>	15↑
<i>Tanypodinae</i>	>	>	>	>	0.15↑	>
<i>Tanytarsini</i>	>	>	>	>	>	15↑
<i>Chaoborus sp.</i>	>	0.15↑	15↑	>	>	>
<i>Chironomidae</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Flies and mosquitoes other</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Caddisfly sp.</i>	>	-	-	>	>	>
<i>Plea sp.</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Heteroptera other</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Dysticidae</i>	>	>	>	>	-	>
<i>Beetles other</i>	>	>	-	>	15↑	>
<i>Lymnaea sp.</i>	>	>	0.15↑	>	>	>
<i>Radix sp.</i>	>	>	>	>	>	>
<i>Snails other</i>	>	>	>	>	>	15↓
<i>Sphaeriidae</i>	15↓	>	>	>	>	>
<i>Parapoynx stratiotata</i>	-	15↑	1.5↓	>	>	>
<i>Sialis lutaria</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Triturus vulgaris</i>	>	>	>	>	>	-

> = geen significant effect (NOEC > 200 µg/L); significante afname (-) vergeleken met de controle.