

## Sleutelfactor Toxiciteit



### **Kalibratie van de risicogrenzen voor interpretatie van bioassays**

**Auteurs:**

M.L. de Baat (KWR water)  
T. E. Pronk (KWR water)  
S.J.P. van den Berg (WEnR)  
R. van der Oost (Waternet)

Contact: [tessa.pronk@kwrwater.nl](mailto:tessa.pronk@kwrwater.nl)

**Datum: 21 december 2021**

Bij verwijzing naar deze notitie graag de volgende gegevens gebruiken:  
de Baat, M.L., T.E. Pronk, S.J.P. van den Berg, R. van der Oost (2021) Kalibratie van de risicogrenzen voor interpretatie van bioassays. Versie 1, 21 december 2021. KIWK-Toxiciteit Notitie. Amersfoort, Nederland. Kennis Impuls Water Kwaliteit.

## Colofon

*Deze notitie is geschreven in het kader van het project Toxiciteit van de Kennsimpuls Waterkwaliteit. In de Kennsimpuls 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.*

*Dit stuk is geschreven door Tessa Pronk (KWR water), Milo de Baat (KWR water), Sanne van den Berg (WenR) en data is geleverd door Leo Posthuma (RIVM), Esther van der Grinten (RIVM), Evert-Jan van den Brandhof (RIVM), Jaap Slootweg (RIVM), Anja Derksen (AD eco advies).*

*Waardevolle input op de inhoud is in verschillende stadia van het onderzoek gegeven door Jaap Postma (Ecofide), Anja Derksen (AD eco advies), Gerda Valkering (Waterschap Hunze en Aa's), Gerard Rijs (RWS-WVL), Arjan Verhoef (Waterschap Drents Overijsselse Delta), Leo Posthuma (RIVM), Stefan Kools (KWR water).*

## Inhoudsopgave

<b>Colofon</b> .....	2
Inhoudsopgave.....	2
1. Inleiding.....	3
2. Vaststellen ESW en kleurencode.....	3
1.1 Effect-sigitaalwaarden voor oppervlaktewater.....	3
1.2 Effect sigitaalwaarden voor drinkwater .....	7
1.3 Effect-sigitaalwaarden voor afvalwater .....	9
3. Waterkwaliteitsklasse bepalen.....	10
4. Samenvatting grenzen bioassays .....	11
5. Conclusie .....	11
Bijlage I. Voorbeeld kleurklassen-indeling voor een meetreeks. ....	13



## 1. Inleiding

Om een beeld te krijgen van waterkwaliteit met betrekking tot de aanwezigheid van chemische stoffen kunnen effectmetingen met bioassays worden gedaan. Gemeten effecten representeren het totale effect van de mix van chemicaliën in het water op het eindpunt dat de bioassay meet.

Om te weten of een bepaald effect aanleiding geeft tot nader onderzoek, omdat risico niet is uitgesloten, moeten de waarden van de gemeten effecten geïnterpreteerd kunnen worden. Deze interpretatie geeft aan hoe groot het bijbehorende risico is voor waterorganismen of humane gezondheid. Deze notitie beschrijft hoe de grenzen voor interpretatie van bioassays zijn vastgesteld voor de sleutel factor toxiciteit 2 (SFT2). De interpretatie is zo dat de waterkwaliteit in verschillende waterkwaliteitsklassen wordt opgedeeld, elk met een eigen kleurcode.

## 2. Vaststellen ESW en kleurcode

ESW differentiëren tussen toereikende en ontoereikende waterkwaliteit op basis van de respons van bioassays op watermonsters. Het afleiden van ESW is een onderwerp dat de afgelopen jaren in toenemende mate aandacht heeft gekregen in de wetenschappelijke literatuur. Als gevolg zijn er verscheidene manieren ontwikkeld om deze ESW af te leiden, en zijn er voor veel bioassays meerdere ESW beschikbaar. Om te komen tot bruikbare ESW voor de gebruikers van de SFT2 is daarom besloten een voorlopige selectie te maken van geschikte methoden voor afleiding en de daarbij horende ESW. Om de diagnostische waarde van de ESW te vergroten is er besloten de ESW uit te drukken in vijf kwaliteitsklassen per bioassay, met bijbehorende kleuren van goed naar slecht, waarin de ESW de grens tussen blauw-groen (geen actie nodig) en geel-oranje-rood (actie nodig) aangeeft. Op deze manier is de bioassay aanpak in lijn gebracht met het chemiespoor, waar de kwaliteitsklassen op basis van stofconcentraties op dezelfde manier zijn ingedeeld.

De effecten die horen bij een bepaalde bioassay waarde zijn niet perse gelijk voor oppervlaktewater en humaan. Daarom zijn er twee sets ESW vastgesteld met verdere onderverdeling in kleurklassen: een voor de interpretatie van risico voor oppervlaktewater en een voor mens.

### 1.1 Effect-sigitaalwaardes voor oppervlaktewater

ESW die een tastbaar risico aangeven zijn het makkelijkst te interpreteren. Zo een risico kan worden geïkt aan de hand van responsen van een bioassay op individuele stoffen bij concentraties die schadelijk of bijna schadelijk zijn voor waterorganismen of mens. Voor de ESW voor oppervlaktewater kan deze waarde afgeleid worden van de soortengevoeligheidsverdeling (de species sensitivity distribution, SSD) zoals gerapporteerd in het werk van Van der Oost (2017). Deze SSD geven het verband aan tussen potentieel aangetaste fractie soorten (PAF) en bioassay responsen. De ESW die op deze manier worden afgeleid kunnen qua risicobeoordeling goed vergeleken worden met de meer-stoffen (ms) PAF die wordt gehanteerd in het Chemie-spoor van de SFT2.



Helaas is de respons van sommige bioassays in de praktijk structureel hoger dan de op deze manier afgeleide ESW. De respons zou betekenen dat een groot deel van de soorten aangetast is. Dat is niet de realiteit in alle wateren, ook in water met een goede ecologische status worden namelijk zulke hoge responsen gevonden. Waarschijnlijker is dat er stoffen effect geven in de bioassay die van nature kunnen vóórkomen, en waarvan de blootstelling daaraan dus niet als niet schadelijk zijn geïnterpreteerd moet worden.

Het optreden van een bioassay-sigitaal vanwege effecten van de natuurlijke achtergrondblootstelling maakt het ingewikkelder om een ESW-waarde af te leiden en om eventuele overschrijdingen daarvan te interpreteren. In termen van risico kan niet gezegd worden dat de bioassay respons bij een bepaalde PAF hoort. De verhouding tussen schadelijke en niet-schadelijke stoffen die de respons veroorzaakt is immers onbekend voor een specifieke locatie. Wat wel gesteld kan worden is, hoe hoger de bioassay respons, hoe hoger de kans dat ook schadelijke stoffen de bioassay activeren. Daarom is de ESW in dat geval in studies uit de wetenschappelijke literatuur vermenigvuldigd met een ‘mixture factor’ (Escher et al., 2015) of opgehoogd met een ‘achtergrondconcentratie’ zoals gemeten in wateren met een goede ecologische status (van der Oost et al., 2017). Dan geeft de aldus aangepaste ESW in ieder geval een waarde aan die hoger is dan de achtergrond respons.

Waar data beschikbaar was, is voor de afleiding van de ESW voor oppervlaktewaterkwaliteit uitgegaan van de SIMONI-aanpak van Van der Oost *et al.* (2017), zoals deze ook werd beschreven in de ecologische sleutel factor toxiciteit 1 (ESFT1). Deze waarde is gebaseerd op de voorlopige ESW uit Escher *et al.* (2018), en geijkt aan bioassay responses op watermonsters van een verscheidenheid aan locaties in Nederland. In de SIMONI-aanpak zijn zogenaamde “Species Sensitivity Distributions” (SSD) opgesteld voor bioassays. De SSD’s zijn zo veel mogelijk opgebouwd uit concentraties met 50% effect (EC50). Op basis van deze SSDs en achtergrond waarden op locaties met een goede ecologische status werden in van der Oost *et al.*, (2017) ESW afgeleid. Voor twee bioassays in de basis-set die voor de SFT2 wordt voorgesteld is er geen aanwijzing dat deze beïnvloed worden door een ongedefinieerde achtergrondconcentratie. Dit zijn de ERa CALUX en de PAH CALUX. Redelijkerwijs kunnen deze geïnterpreteerd worden in termen van PAF. Om het onderscheid te maken met de msPAF uit het Chemie-spoor, noemen we dit voor het Bioassay-spoor de ‘effect methode’ PAF (emPAF). De ESW voor deze bioassays is gezet op een waarde van de bioassay waarbij 5% van de soorten potentieel aangetast wordt (emPAF 5%). Dit komt overeen met de msPAF uit het chemiespoor. Het is onbekend wat het potentieel aangetaste fractie soorten, afgeleid met een SSD, betekent voor de ecologische staat. Deze link is in de SFT2 voor bioassays niet gelegd. In de praktijk zien we aan de hand van gemeten respons waarden van de PAH en ERa CALUX dat de wateren die de hoogste respons geven, overeenkomen met een SSD-waarde van rond de 20% potentieel aangetaste soorten. Daarom is deze waarde als bovengrenswaarde genomen. De gebruikte grenzen tussen de klassen, uitgedrukt in emPAF, zijn weergegeven in Tabel 1.

Voor de andere bioassays is besloten de grenzen van de vijf kwaliteitsklassen te bepalen aan de hand van een simpele rekenkundige verdeling. Deze verdeling is gebaseerd op een richtlijn voor vervolgstappen na ESW-overschrijding door Leusch & Snyder (2015). Deze richtlijn wordt ook genoemd in het Global Water Research Coalition (GWRC) rapport (2020). De richtlijn geeft aan dat er zeker nader onderzoek gedaan moet worden na 10x overschrijding van de ESW. Dit



komt (ongeveer) overeen met de emPAF waarde voor ‘rood’ voor ERA en PAH CALUX in Tabel 2. De andere grenzen baseren we ook op deze waarden, en als controlestap kijken we of de 10x ESW-overschrijding in de praktijk niet te vaak of juist nooit voorkomt voor gemeten bioassay responsen. Dit lijkt redelijk te passen. De gebruikte grenzen voor ESW-klassen zijn ook weergegeven in Tabel 1.

*Tabel 1. Grenzen voor waterkwaliteitsklassen gebruikt om effect-sigitaalwaarden voor klassen te definiëren op basis van emPAF en aantal keer ESW.*

Klasse	ESW emPAF	ESW-klassen
	0,00 – 0,025	0,0 – 0,2x ESW
	0,025 – 0,05	0,2x ESW – ESW
	0,05 – 0,1	ESW – 5x ESW
	0,1 – 0,2	5x ESW – 10x ESW
	> 0,2	> 10x ESW

Voor de *in vivo* bioassays (de bioassays die effecten op hele cellen of organismen meten) werden in de SIMONI strategie generieke ESW afgeleid op basis van een acuut-chronische toxiciteitsratio van 10 om te corrigeren voor de korte blootstellingsduur van de bioassays, en een veiligheidsfactor van 2 om te corrigeren voor de beperkte recovery van extractiemethodes. Hiermee werd een relatieve verrijkingfactor (REF; relative enrichment factor) van 20 t.o.v. het water als ESW afgeleid. Dit betekent dat een voldoende kwaliteit wordt aangenomen als een 20x of hoger geconcentreerd watermonster 50% effect in de bioassay veroorzaakt. Omdat de maat REF van hoog (toxiciteit bij veel concentreren) naar laag (toxiciteit bij weinig concentreren) gaat bij toenemende toxiciteit bemoeilijkt dit de interpretatie ten opzichte van de andere bioassays, die van laag naar hoog (in concentratie bioanalytische equivalenten van een referentiestof) gaan. Daarom drukken we de REF weer uit in ‘Toxic Units (TU)’, deze worden uitgerekend als 1/REF. Het betreft hier de Microtox, Daphnia, Algen, en de CALUX cytotoxiciteit bepaling.

Dit heeft geleid tot de indeling van de responsen voor bioassays voor oppervlaktewaterkwaliteit in vijf kwaliteitsklassen per bioassay. Deze klassen kunnen gebruikt worden voor de effect-gebaseerde diagnostische toetsing van de oppervlaktewaterkwaliteit.

Een voorbehoud moet gemaakt worden bij de geldigheid van de niet-emPAF ESW bij het gebruik van steekmonsters ten opzichte van passieve sampling. Mengmonsters via steekmonsters zijn de aanbevolen methode voor monsternamen in de Sleutelfactor toxiciteit 2 (SFT2). Voorheen, in de SIMONI-aanpak, was dit passieve sampling. In de SIMONI-aanpak zijn de ‘achtergrondconcentraties’ voor individuele bioassays ook bepaald met passieve sampling. Een gemeten achtergrondconcentratie kan afwijken bij steekmonsters. Deze kan lager zijn, omdat er bij passieve sampling langere tijd wordt bemonsterd en daardoor stoffen cumulatief worden geadsorbeerd. Anderzijds kan de respons hoger zijn, omdat niet alle stoffen even goed adsorberen in passieve sampling methoden. Het kan ook hetzelfde blijven, als deze processen geen invloed hebben op een bepaalde groep stoffen. Mogelijk klopt voor bepaalde bioassays daardoor de ‘achtergrondconcentratie’ niet met de nieuwe monsternametechniek en



zal de ESW te hoog of juist te laag blijken. Dit betekent dat deze opnieuw afgeleid zullen moeten worden. Voor de ESW op basis van emPAF en de humane ESW heeft dit geen invloed omdat deze gebaseerd zijn op concretere risico's die niet anders zijn bij een andere monsternamen. Hoogstens kan hier blijken dat toxische mechanismen die door deze bioassays worden gemeten, meer of minder relevant zijn voor de waterkwaliteit.

Ook voor de ESW van *in vivo* bioassays zal dit logischerwijs geen effect hebben, ook hier is geen achtergrondconcentratie gebruikt. Er kan wel blijken dat de *in vivo* bioassays andere responshoogten geven omdat er verschil is in de aanwezige stoffen via passieve sampler- of steekmonsters. Desalniettemin is de aanbeveling om ook deze ESW kritisch te evalueren na opgedane ervaring met mengmonsters in Nederlandse wateren. Ook al is de factor 2 voor een niet nader gedefinieerde extractie, SPE heeft een betere extractie van stoffen dan de passieve sampler, waardoor de factor 2 hier mogelijk weg kan vallen. Aan de andere kant is het te beargumenteren dat de redenering om de ESW grens te leggen bij 10x lager dan het 50% acute effect bij géén verdunning (REF 10, TU 0,1) mogelijk niet een 'veilige' ESW aangeeft. Als de factor 10 voor de omrekening van acuut naar chronische toxiciteit wordt aangehouden, betekent dit dat de respons aangeeft dat de effect concentratie bij de ESW zo is dat er een 50% langere termijn chronisch effect wordt veroorzaakt. Het zou beter zijn in de toekomst de acuut 'lowest observable effect level' (LOEL) concentratie hiervoor aan te houden, die begin van hinder aangeeft.

*Tabel 2. Waterkwaliteitsklassen (uitgedrukt in % emPAF) voor oppervlaktewater en bijbehorende grenzen (uitgedrukt als bioanalytische equivalenten van de referentiestof per bioassay) en gebaseerd op ESW klassen voor chemische druk.*

Oppervlaktewater		0-2,5 emPAF	>2,5 emPAF	>5 emPAF	>10 emPAF	>20 emPAF
<b>ER CALUX</b>	ng EEQ/L	0	0,13	<b>0,52</b>	3,2	32
<b>PAH CALUX</b>	ng BaPEQ/L	0	20	<b>41</b>	160	565
Oppervlaktewater		0-0,2 ESW	>0,2 ESW	ESW klassen	>5 ESW	>10 ESW
<b>Nrf2 CALUX</b>	µg CEQ/L	0	2	<b>10</b>	50	100
<b>PXR CALUX</b>	µg NEQ/L	0	0,6	<b>3</b>	15	30
<b>PPAR<math>\gamma</math> CALUX</b>	ng RosEQ/L	0	2	<b>10</b>	50	100
<b>Anti-AR CALUX</b>	µg FEQ/L	0	5	<b>25</b>	125	250
<b>Microtox*</b>	TU	0	0,01	<b>0,05</b>	0,25	0,5
<b>Cytotox</b>	TU	0	0,01	<b>0,05</b>	0,25	0,5
<b>Algen</b>	TU	0	0,01	<b>0,05</b>	0,25	0,5
<b>Daphnia</b>	TU	0	0,01	<b>0,05</b>	0,25	0,5

De klassen die met behulp van SSD zijn afgeleid (Tabel 2) kunnen worden geïnterpreteerd als het percentage soorten dat potentieel wordt aangetast bij de bioassay waarde (emPAF). Op de SSD-curve kan ook worden afgelezen wat het percentage soorten is met potentieel acute toxiciteit. In de toxicologie wordt hiervoor een factor 10 gebruikt. Dus, het percentage op de



SSD-curve dat hoort bij een waarde van de bioassay \* 10 is het percentage dat potentieel acuut wordt beïnvloed.

De klassen die met behulp van ESW zijn afgeleid kunnen worden geïnterpreteerd als potentieel risico op ontoereikende waterkwaliteit op basis van Chemische druk. Hierbij zijn de *in vivo* bioassays een meer directe maat voor toxische druk op organismen. In Tabel 3 staat een overzicht van de interpretatie van de klassen op basis van de bioassay resultaten.

*Tabel 3. Overzicht van de interpretatie die op basis van kleuren kan worden gehanteerd voor de druk die door chemicaliën wordt uitgeoefend.*

	KRW-bescherming		KRW-herstel		
Ecologische toestand / (drink) waterkwaliteit	Lage kans op toxiciteit	Geringe kans op toxiciteit	Matige kans op toxiciteit	Verhoogde kans op toxiciteit	Zeer hoge kans op toxiciteit
Technische grenswaarde indien SSD <u>niet</u> beschikbaar was	<0.2x ESW	0.2x ESW – ESW	≥ESW – 5x ESW	5x ESW – 10x ESW	>10x ESW
Technische grenswaarde indien SSD beschikbaar was	emPAF 0.00 - 0.025	emPAF 0.025-0.05	emPAF 0.05-0.10	emPAF 0.10-0.20	emPAF 0.20-1.00
Woordelijke grenswaarde indien SSD beschikbaar was	Begin van hinder bij maximaal 1 op 40 soorten	Begin van hinder bij maximaal 1 op 20 soorten	Begin van hinder bij maximaal 1 op 10 soorten	Begin van hinder bij maximaal 1 op 5 soorten	Begin van hinder bij meer dan 1 op 5 soorten

## 1.2 Effect signaalwaardes voor drinkwater

Voor de interpretatie van humane risico's wordt de ESW vaak afgeleid als de respons die hoort bij de laagste waarde waarbij een stof die een reactie geeft in de bioassay geen verwacht effect heeft op humane gezondheid bij het drinken van twee liter water een leven lang, zoals in Béen et al. (2021). Deze waardes zijn afgeleid op basis van (voorlopige) drinkwaterrichtwaarden voor stoffen die actief zijn in de verschillende bioassays. Voor de bepaling van humane ESW's kan sowieso geen gebruik gemaakt worden van een curve zoals de SSD, omdat deze voor humane toxicologie niet zijn ontwikkeld. Voor humane toxicologie kan men hierbij bijvoorbeeld denken aan een 'Orgaan Distributie Curve' waarbij de bioassay-respons potentiële effecten op steeds meer humane eindpunten impliceert.



Voor twee bioassays om humaan relevante waterkwaliteit te meten konden betrouwbare ESW's worden afgeleid (ER- en anti-AR CALUX). Voor een andere assay kon een voorlopige ESW worden afgeleid (PAH-CALUX), waarbij vermeld werd dat de grenzen met voorzorg ingezet moeten worden door de beperkte hoeveelheid data waarop ze gebaseerd zijn. Desalniettemin is besloten deze waarden in de SFT2 toe te passen en deze na een tijd te evalueren op hun relevantie. Voor de PAH CALUX is geen andere humane ESW beschikbaar, de ESW valt in ieder geval wel in dezelfde range als gerapporteerde ESW's voor bescherming van het oppervlaktewater (ecologie).

Voor de Nrf2-CALUX assays was niet genoeg data beschikbaar om betrouwbare ESW's af te leiden. In de toekomst kan op basis van effectconcentraties van actieve stoffen in de bioassay met een (voorlopige) drinkwaterrichtwaarde een ESW worden afgeleid volgens de methodiek uit Béen *et al.* De data die gegenereerd worden tijdens effectmetingen volgens de SFT2 zullen een ijkings- en onderbouwingslijn van de af te leiden ESW met realistische metingen mogelijk maken. Dit geldt ook voor de PPAR $\gamma$ -CALUX.

Ook voor de Ames test is geen ESW. Omdat genotoxiciteit in elke mate kan leiden tot een kans op genetische mutaties en/of kanker, is besloten dat zolang er geen betrouwbare en goed onderbouwde ESW voor de Ames beschikbaar is, uit te gaan van de noodzaak tot actie zodra er activiteit in de bioassay wordt gedetecteerd. Toch is het praktisch om een schaal met kwaliteitsklassen te hebben om wateren met elkaar te kunnen vergelijken. De hoogste klasse voor de Ames bioassay zetten we voorlopig bij concentrering waarbij 1,5 keer de controle respons is gezien (EC<sub>rr1.5</sub>) van 0,5 en dat is rond de zes keer zo laag als de waarde die het laagst is gemeten in de verzameling meetwaarden van Neale *et al.*, 2020 in drinkwater (3,2-13,8). In oppervlaktewater werden veel lagere waarden gevonden (0,03-0,22). Als we vervolgens de kwaliteitsklassen van Leusch & Snyder (2015) toepassen zit de grens naar rood rond 5. Deze grenzen zullen verder moeten worden gekalibreerd.

Om de grenzen voor de vijf kwaliteitsklassen te definiëren voor bioassays voor drinkwaterkwaliteit is een systematiek gelijkend op die uit Leusch & Snyder (2015) toegepast (Tabel 4) maar met de grenzen zoals in Tabel 2. De hier aangegeven klassen kunnen gebruikt worden voor de effect-gebaseerde diagnostische toetsing van de drinkwaterkwaliteit. Zij zijn te interpreteren als afstand tot de effect signaalwaarden voor waterkwaliteit die in de literatuur zijn afgeleid. Deze effect signaalwaarden geven een waarde aan waarboven risico niet is uitgesloten. In tegenstelling tot de ecologische waarden die nog gevalideerd zouden kunnen worden omdat ze verbonden zijn met een fractie potentieel aangetaste soorten, zijn de humane waarden niet te interpreteren op zulk risico. Het is wel duidelijk dat 'rood' erger is dan 'groen' maar hoeveel erger, is onbekend. Daarom laten we de grenzen zoals zijn tot er een beter onderbouwd alternatief is, zoals een SSD equivalent of een andere maat voor mengseltoxiciteit voor humane interpretatie.





Tabel 4. Waterkwaliteitsklassen voor drinkwaterkwaliteit en bijbehorende grenzen (bioanalytische equivalenten van de referentiestof per bioassay) voor bioassays voor waterkwaliteitsbepaling gebaseerd op ESW's uit de wetenschappelijke literatuur.

(Bronnen voor) Drinkwater		0-0,2 ESW	>0,2 ESW	>ESW	>5 ESW	>10 ESW
ER CALUX	ng EEQ/L	0	0,05	<b>0,25</b>	1,25	2,5
Ames test	ECrr1.5	0	0,1	<b>0,5</b>	2,5	5
PAH CALUX	ng BaPEQ/L	0	4,9	<b>24,4</b>	122	244
NRF2 CALUX	µg CEQ/L	-	-	-	-	-
Microtox*	TU	0	0,025	<b>0,05</b>	0,25	0,5
Cytotox	TU	0	0,025	<b>0,05</b>	0,25	0,5
Anti-AR CALUX	ug FEQ/L	0	1,0	<b>4,8</b>	25,0	48,0
PXR CALUX	µg NEQ/L	-	-	-	-	-

Niet voor alle bioassays om humaan relevante waterkwaliteit te meten zijn ESW beschikbaar. Dat betekent dat de bioassay responsen voor deze bioassays niet geïnterpreteerd kunnen worden in termen van risico. Tot het moment dat er voor deze bioassays wel een ESW afgeleid wordt kan er wel trend-monitoring gedaan worden. Bijvoorbeeld, wordt de bioassay respons hoger of lager met de tijd? Ook kunnen locaties met elkaar vergeleken worden met betrekking tot de bioassay respons. Bijvoorbeeld verschillende drinkwaterbronnen. Of, de respons vanaf een emissiebron tot aan de drinkwaterbron. Een andere toepassing is de effectiviteit van waterzuiveringsinstallaties te beoordelen door bioassay responsen voor en na zuivering te vergelijken. Zodra een ESW beschikbaar is kunnen deze metingen vervolgens retrospectief geïnterpreteerd worden op risico. De ESW die zijn afgeleid voor oppervlaktewater (zie Tabel 2) kunnen voorlopig ook een ijkpunt vormen voor de interpretatie.

### 1.3 Effect-sigitaalwaardes voor afvalwater

Voor afvalwater zijn op dit moment geen ESW beschikbaar. De aquatische milieurisico's zijn natuurlijk sterk afhankelijk van de mate van verdunning in het rioolstelsel zelf en het ontvangende oppervlaktewater. Voor afvalwater kan gewerkt worden met de ESW van oppervlaktewater, maar de kleurklassen zullen minder informatief zijn omdat afvalwater naar verwachting vaak in klasse 'rood' zal vallen. Voor een risicoanalyse zal een schatting moeten worden gemaakt van de verdunning met het oppervlaktewater. Het advies is hier te werken met risico-quotiënten, die aangeven hoe ver het afvalwater af zit van een ESW-oppervlaktewater. Deze risico-quotiënten worden uitgerekend als:

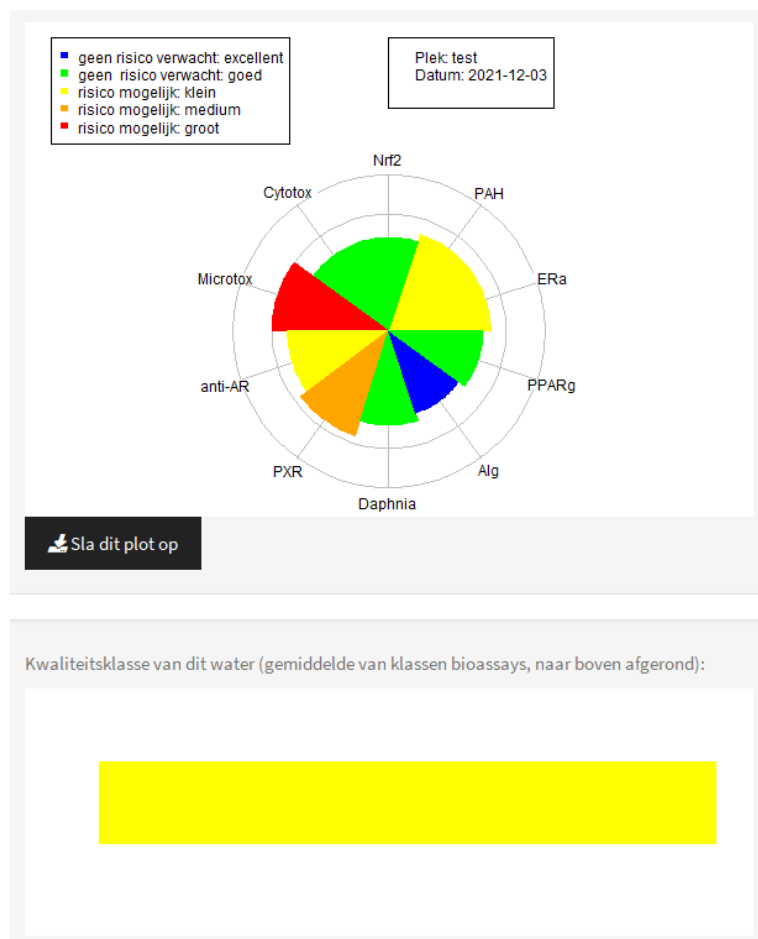
**Quotiënt = 'Meting' / 'ESW-oppervlaktewater'.**

In een vervolgonderzoek kan een methodiek met kleuren speciaal voor afvalwater worden afgeleid, dat is in SFT2 niet gedaan. Voor het beoordelen van zuivering van afvalwater wordt als extra bevestiging / aanvulling de GR CALUX aanbevolen. De ESW oppervlaktewater (ecologie) die voor deze bioassay is afgeleid in van der Oost *et al.*, 2017 is 100 ng/L DEQ en voor drinkwater (humaan) is deze (onder voorbehoud vanwege weinig data) afgeleid op 47,9 ng/L DEQ in Béen *et al.*, 2021.



### 3. Waterkwaliteitsklasse bepalen

Bioassays verschillen in de soort stoffen waar ze op reageren. Elke bioassay afzonderlijk geeft dus inzicht in een bepaald probleem met een type chemische stoffen, dat mogelijk een eindpunt induceert (acuut of chronisch) bij organismen. Het is dus van belang om de resultaten van de verschillende bioassays inzichtelijk te houden. Dit kan het beste op het niveau van stofgroepen die effect veroorzaken in een specifieke bioassay. In andere woorden, de bioassays moeten individueel beoordeeld worden. Voor een ander doel, samenvattend karteren van toxiciteit van alle stoffen samen, kunnen de responsen van alle bioassays worden geaggregeerd. Het weergeven van de bioassay resultaten naar discrete (kleuren)klassen geeft namelijk wel ruimte om de bioassay resultaten te combineren. Drie keer rood in de bioassays is erger dan één keer rood. Een waarde voor de waterkwaliteit kan dan uitgerekend worden als het gemiddelde van de klassen per bioassay, naar boven afgerond om aan de veilige kant te zitten. Klasse ‘blauw’ heeft dan waarde 1, dat bouwt voort tot Klasse ‘rood’ die waarde 5 heeft. Figuur 1 geeft een voorbeeld, uit de bioassay interpretatie tool. Het is wel aanbevolen om naast de gemiddelde kleur ook de resultaten van de individuele bioassays te blijven beschouwen omdat dit meer specifieke informatie bevat over de aard van de stofgroep die mogelijk een slechte waterkwaliteit veroorzaakt.



Figuur 1. Voorbeeldresultaat uit de ‘Bioassay interpretatie-tool’ van de SFT2, met kleurklasse voor de integrale waterkwaliteit.



## 4. Samenvatting grenzen bioassays

In Tabel 5 staat een overzicht van de bioassays die genoemd zijn in deze notitie. In de tabel zijn de waarden van de bioassay weergegeven die bij de overgang van kleur 'groen' naar kleur 'geel' gaat. Over het algemeen zijn de waarden zo gekozen dat er bij blauw en groen geen actie ondernomen hoeft te worden, en bij geel aanvullend onderzoek zou kunnen gaan plaatsvinden. Bij oranje en zeker rood geldt dat natuurlijk nog sterker.

*Tabel 5. Overzicht en vergelijking van grenswaarden tussen 'groen' en 'geel' voor bioassays voor oppervlaktewater en drinkwater die zijn aanbevolen als basis en extra aanvullend/bevestigend. De bioassays die zijn aanbevolen als 'test' zijn hier niet weergegeven, deze staan in de notitie 'Bioassay basisset achtergronddocument'.*

	<b>Oppervlakte water (O) / Drinkwater (D) / Afvalwater (A)</b>	<b>SIMONI ESW (3)</b>	<b>Oppervlakte water Risico</b>	<b>Drinkwater Risico (1)</b>
<b>ERa CALUX (ng EEQ/L)</b>	O/D/A	0,5	0,52 (2)	0,25
<b>anti-AR CALUX (µg FEQ/L)</b>	O/D/A	25	25	4,8
<b>Nrf2 CALUX (µg CEQ/L)</b>	O/D/A	10	10	-
<b>PAH CALUX (ng BEQ/L)</b>	O/D/A	150	41 (2)	24,4 (*)
<b>PXR CALUX (µg NEQ/L)</b>	O/D/A	3	3	-
<b>Microtox (TU)</b>	O/D/A	0,05	0,05	0,05 (3)
<b>Daphnia (TU)</b>	O/A	0,05	0,05	-
<b>Alg (TU)</b>	O/A	0,05	0,05	-
<b>Cytotox CALUX (REF)</b>	O/D/A	0,05	0,05	0,05 (3)
<b>Ames test (ECrr1.5)</b>	D	-	-	0,5 <sup>^</sup>
<b>PPAR<sub>γ</sub> CALUX (ng RosEQ/L)</b>	O/A	10	10	-
<b>GR CALUX ng/L DEQ</b>	A	100	100	47,9 (*)

\* onzeker vanwege weinig data (Béen et al., 2021) <sup>^</sup>gefit voor SFT2 op basis van data van Neale et al, 2020 voor drinkwater. 1. Béen et al., 2021 2. SSD HC5 uit van der Oost et al., 2017 3. ESW uit van der Oost et al., 2017

## 5. Conclusie

Waar mogelijk is met behulp van SSD-curves per bioassay klassen van waterkwaliteit met betrekking tot de (eco)toxiciteit aangegeven. Voor humane klassen van waterkwaliteit kan geen gebruik gemaakt worden van SSD, daarom zijn kleuren voor deze bioassays allen met behulp van ESW's afgeleid. De interpretatie van beide manieren van afleiden is wel verschillend. In het ene geval staat de klasse voor percentage potentieel aangetaste soorten. In het andere geval staat de klasse voor een afstand tot een grens van acceptabele waterkwaliteit naar waterkwaliteit met potentieel risico op nadelige effecten, wat een minder strak gedefinieerde maat is die ook



lastiger geverifieerd zal kunnen worden. Voor *in vivo* bioassays staat de interpretatie meer direct in verhouding tot toxische druk omdat hier organismen effecten laten zien waarvan beargumenteerd kan worden dat ze nadelig kunnen zijn.

In de toekomst moeten de grenswaarden van de bioassays nader vastgelegd worden. Voor oppervlaktewater gaat dit bij voorkeur met het opstellen van nog op te stellen SSD-curves voor de bioassays waar deze nu niet voorhanden zijn. De interpretatie van bestaande SSD's kan ook verbeterd worden door meer onderzoek te doen naar respons door niet-toxische stoffen, en een procedure om de gemeten respons daarmee in mindering te brengen.

**Disclaimer:** De hier weergegeven grenzen zijn afgeleid met op dit moment beschikbare data en inzichten. De voorgestelde kwaliteitsklassen zullen in de praktijk toegepast en geïjkt moeten worden, en zo nodig op basis van de praktijkervaring bijgesteld moeten worden. Dit kan met terugwerkende kracht de interpretatie van de bioassay resultaten veranderen maar uiteraard niet de bioassay respons zelf.

## Referenties

Béén, 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 Res.* 193, 116859.

Escher, B.I., Aït-Aïssa, S., Behnisch, P.A., Brack, W., Brion, F., Brouwer, A., Buchinger, S., Crawford, S.E., Du Pasquier, D., Hamers, T., 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. *Sci. Total Environ.* 628, 748–765.

Leusch FDL and Snyder SA (2015) Bioanalytical tools: half a century of application for potable reuse. *Environmental Science: Water Research and Technology* 1: 606-621.

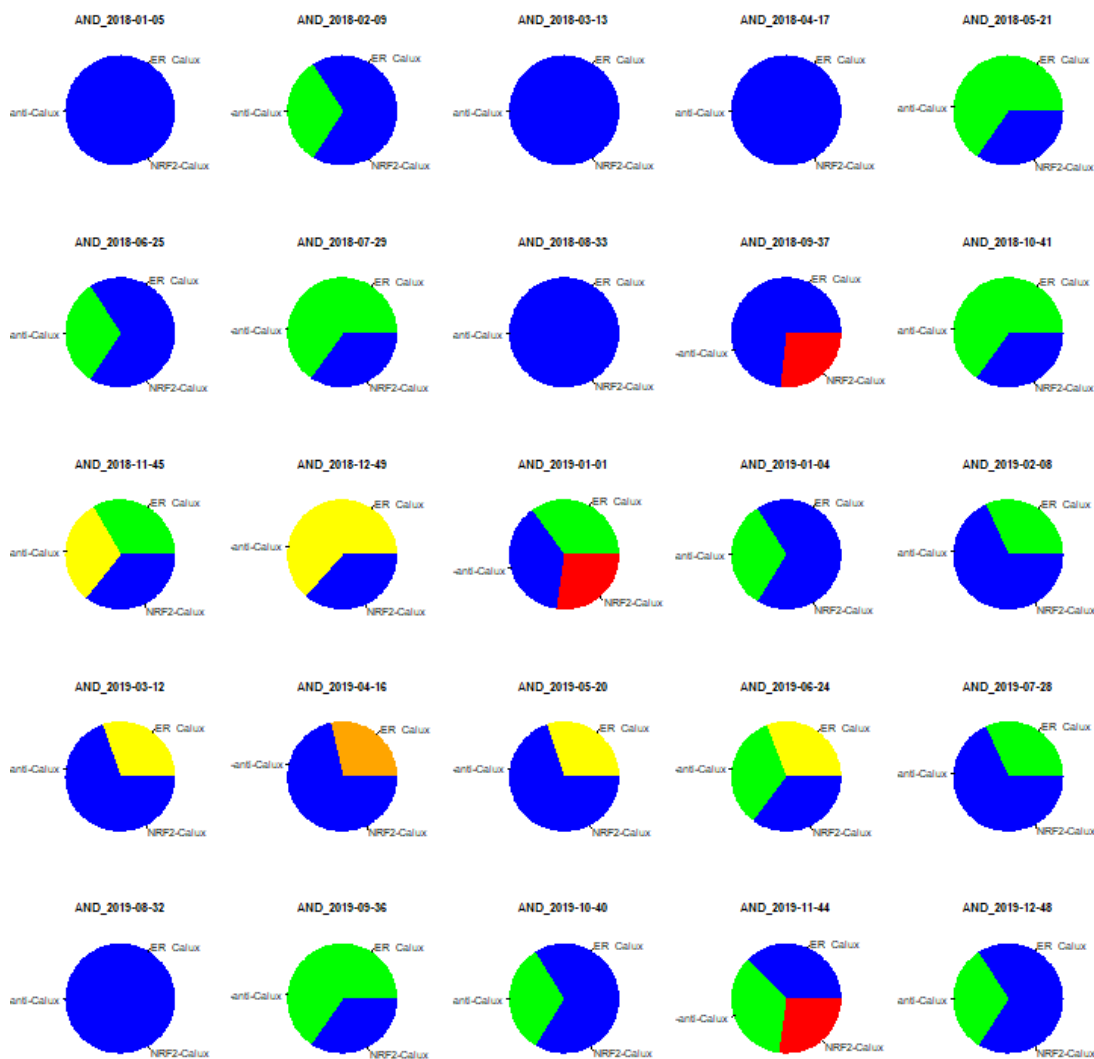
van der Oost, R., Sileno, G., Suárez-Muñoz, M., Nguyen, M.T., Besselink, H. and Brouwer, A. (2017), SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I—model design and effect-based trigger values. *Environ Toxicol Chem*, 36: 2385-2399. <https://doi.org/10.1002/etc.3836>

GWRC Factsheet (2000) Effect based monitoring (EBM) for the assessment of risks for low-level mixtures of chemicals in water on man and the environment. Peta Neale, Fred Leusch, Beate Escher  
[http://www.globalwaterresearchcoalition.net/\\_r4284/media/system/attrib/file/825/GWRC\\_EBM%20in%20WST\\_Factsheet%203\\_1%206%20April%202020.pdf](http://www.globalwaterresearchcoalition.net/_r4284/media/system/attrib/file/825/GWRC_EBM%20in%20WST_Factsheet%203_1%206%20April%202020.pdf)

Neale, P., Leusch, F. Escher, B. (2020) Effect Based Monitoring in Water Safety Planning. WP3.2: Medium-to-high throughput bioanalytical tools and decision-making tool for selection of bioassays. GWRC report.



## Bijlage I. Voorbeeld kleurklassen-indeling voor een meetreeks.



*Extra Figuur Bijlage. Als voorbeeld wordt hier weergegeven de oppervlaktewaterkwaliteit bij Andijk tussen januari 2018 en december 2019, voor drie van de basis-set bioassays anti-AR CALUX, ER CALUX, NRF2 CALUX. De code boven de taartdiagrammen is de plek ('AND') gevolgd door het jaar, maand, en week van de bioassay metingen. Voor andere bioassays uit de basis-set was geen data beschikbaar in deze set. Zowel tijdelijke als incidentele verslechtingen in waterkwaliteit zijn te zien. De dataset is beschikbaar gesteld door RIWA-Rijn en Het Waterlaboratorium (HWL). Dit figuur is niet gemaakt met de SFT2 interpretatie-tool maar met een script geprogrammeerd in de statistische programmeertaal R met het doel dit voorbeeld te genereren.*

