

DPWE Managementsamenvatting

Breed onderzoek Effect-Directed Analysis (EDA) in bronnen en drinkwater bij DPWE geeft inzicht in biologisch actieve stoffen

Auteur Corine Houtman (HWL)

De drinkwaterbronnen en het drinkwater van DPWE-bedrijven zijn onderzocht op de aanwezigheid van chemische stoffen met een specifieke biologische activiteit (BA). Het onderzoek is uitgevoerd met drie technieken: bioassays voor tien verschillende biologische effecten, chemische analyse met hoge resolutie MS-screening, en een combinatie van deze twee benaderingen via Effect-Directed Analysis (EDA). Deze technieken ondersteunen in het waarborgen dat drinkwater vrij blijft van activiteiten veroorzaakt door stoffen die schadelijk kunnen zijn voor de gezondheid. Ze geven DPWE-bedrijven een beeld van BA en de daarvoor verantwoordelijke stoffen in hun bronnen en zuiveringen. Zes van de 10 BA zijn aangetroffen in drinkwaterbronnen, twee in enkele drinkwateren. De aanwezigheid van anti-androgene activiteit en oxidatieve stress in bronnen en drinkwateren verdient aandacht, omdat deze BA niet volledig worden verwijderd tijdens de drinkwaterproductie. Ook andere aangetroffen BA blijven relevant: oestrogene, anti-androgene, anti-progestagene, cytotoxische effecten en oxidatieve stress zijn één of meermaals boven de effectsignaalwaarden aangetroffen. Hormonen veroorzaakten de androgene, oestrogene, progestagene en glucocorticoïde effecten in de bioassays. Met name bestrijdingsmiddelen zorgden voor anti-androgene, anti-progestagene en cytotoxische activiteit.

Assays	MRL	ESW humaan	ESW ecologie	RWZI-effluent	Proceswater	Oppervlaktewater	Drinkwater	Geïdentificeerde stoffen
aantal locaties				1	1	9	5	
AR	0.2 ng DHT-eq/L	4.5	-	1/0	0/0	1/0	0/0	17α-methyltestosterone, DHT
ER	34 pg EEQ/L	250	500	1/1	0/0	8/1	0/0	estron, 17α- en β-estradiol, ethynylestradiol
GR	4.3 ng Dex-eq/L	48	100	1/0	0/0	0/0	0/0	budesonide, norethindrone
PR	0.5 ng org2058-eq/L	1.3	-	1/0	0/0	0/0	0/0	progesteron, medroxyprogesteron
anti-AR	1.4 µg Flt-eq/L	4.8	25	1/0	0/0	9/2	1/1	boscalid, cyproconazole, dimethenamid, diuron, epoxiconazole, fenoxycarb, fluopicolide, metolachlor, myclobutanil, omeprazole
anti-ER	250 ng tam-eq/L	-	-	1/-	0/-	0/-	0/-	
anti-PR	0.2 ng Ru486-eq/L	1.2	13	1/0	0/0	9/1	0/0	boscalid, cyproconazole, dimethenamid, diuron, epoxiconazole, fenoxycarb, fluopicolide, metolachlor, myclobutanil
cytotoxiciteit	% afname signaal (1% blootstelling)	-	-	1/-	0/-	2/-	0/-	cyproconazole, dimethenamid, dinoseb, epoxiconazole, fipronil, metolachlor, myclobutanil
NRF2	100 ng curcumine-eq/L	21 (<MRL)	10 (<MRL)	1/1	0/0	6/6	2/2	glipizide en omeprazole
P53 (+/- S9)	150 µg cyclofosfamide-eq/L; 10 ng Act D-eq/L/I	-	-	0/-	0/-	0/-	0/-	
aantal ESW-overschrijdingen				2	0	9	3	

Overzicht van de gebruikte bioassays, hun minimum reporting limit (MRL) en de effectsignaalwaarden (ESW) per bioassay. Aangegeven zijn per watertype het aantal positieve bioassayresultaten (voor de deelstreep), en het aantal daarvan dat de ESW overschreed (na de deelstreep) en per bioassay de geïdentificeerde actieve stoffen.

Belang: Inzicht in aanwezigheid en identiteit biologisch actieve stoffen in bronnen en drinkwater
Bioassays tonen de biologische activiteit (BA) van stoffen in water. Door bioassays te combineren met chemische screening in Effect-Directed Analysis

(EDA) is inzichtelijk welke stoffen voor de biologische effecten verantwoordelijk zijn. Deze kennis is nodig om juist emissie van deze stoffen te kunnen beperken, mogelijke gezondheidsrisico's te bepalen en zuiveringen te verbeteren zodat drinkwater vrij

blijft van stoffen die schadelijk kunnen zijn voor de gezondheid.

Aanpak: Meetcampagne bronnen en drinkwater DPWE met brede set bioassays, screening en EDA

In het voorjaar van 2021 zijn monsters genomen van bronnen en drinkwateren van DPWE-bedrijven, van één proceswater, van wateren die een bron beïnvloeden en van een RWZI-effluent. Deze monsters zijn geanalyseerd met CALUX® bioassays voor 10 effecten, chemische (hoge resolutie suspect) screening, en een combinatie van beide benaderingen: de EDA. Patronen in de data zijn hierna vastgesteld met multivariate statistiek.

Resultaten: Bioassays, screening en EDA identificeren relevantste stoffen, zoals bestrijdingsmiddelen

In de bronnen zijn zes van de tien onderzochte *biologische activiteiten (BA) in de bioassays* waargenomen en twee BA (anti-androgene activiteit en oxidatieve stress) in sommige drinkwateren. Twee andere BA werden exclusief aangetroffen in RWZI-effluent. Soms werden effectsignaalwaarden (ESW) voor oppervlaktewater overschreden, en in één geval ook de ESW in drinkwater (zie tabel). Een overschrijding van een ESW is een aansporing om nader onderzoek te doen, aangezien een mogelijk risico voor ecologie (oppervlaktewater) of de mens (drinkwater) niet uitgesloten kan worden.

Er zijn met *screening* 683 verschillende stoffen aangetroffen, de meeste in RWZI-effluent, minder in oppervlaktewater en nog minder in drinkwater.

Met *EDA* bleek dat steroïde hormonen verantwoordelijk waren voor de hormoonachtige BA. Vooral bestrijdingsmiddelen droegen bij aan anti-androgene en anti-progestagene BA en vaak ook aan cytotoxische effecten in de bronnen. In het enige drinkwater met anti-androgene activiteit identificeerde EDA metolachlor (bestrijdingsmiddel) als verantwoordelijke stof. Twee geneesmiddelen in

het RWZI-effluent droegen bij aan de daarin gemeten oxidatieve stress.

Multivariate statistische analyse toonde duidelijke verschillen in vervuilende stoffen tussen locaties in het Rijn- en het Maasstroomgebied: de chemische vervuiling is specifiek per stroomgebied.

Het verkregen inzicht in de aanwezigheid van BA in bronnen en drinkwateren van DPWE laat zien dat vooral anti-androgene activiteit en oxidatieve stress aandacht verdienen, omdat deze niet altijd volledig worden verwijderd in de drinkwaterzuivering. Ook andere BA blijven relevant: oestrogene, anti-androgene, anti-progestagene, cytotoxische effecten en oxidatieve stress zijn ook boven de ESW aangetroffen. Bioassays blijven nodig in de monitoring van DPWE-bedrijven om deze effecten te volgen. Bestrijdingsmiddelen zijn veelvuldig aanwezig in drinkwaterbronnen. Dit (bekende) probleem verdient nadrukkelijk aandacht omdat bestrijdingsmiddelen bijdragen aan de anti-androgene, anti-progestagene en cytotoxische BA in de bronnen en bij één bedrijf in dit onderzoek ook in het drinkwater.

Toepassing: Bioassays, screening, EDA en statistiek

Bioassays zijn een waardevol onderdeel van de monitoring voor het bepalen van BA door chemische stoffen. Indien BA boven signaalwaarden wordt aangetroffen is EDA het aangewezen instrument om de verantwoordelijke stoffen te identificeren. Multivariate statistiek helpt om ruimtelijke patronen in de chemische waterkwaliteit op te sporen.

Het Rapport

De resultaten van dit onderzoek zijn vastgelegd in presentatievorm (*Effect-Directed Analysis (EDA) in bronnen en drinkwater*). Daarnaast worden de resultaten beschreven in twee artikelen (één over de bioassays, screening en multivariate statistiek en één over EDA). Het project werd begeleid door de DPWE-Begeleidingsgroep Waterkwaliteit.

Jaar van publicatie
2024

Meer informatie

dr. Corine Houtman

T +31 6 2055 7511

E corine.houtman@hetwaterlaboratorium.nl

Keywords

DPWE, Bioassays

Maart 2024 ©

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier.

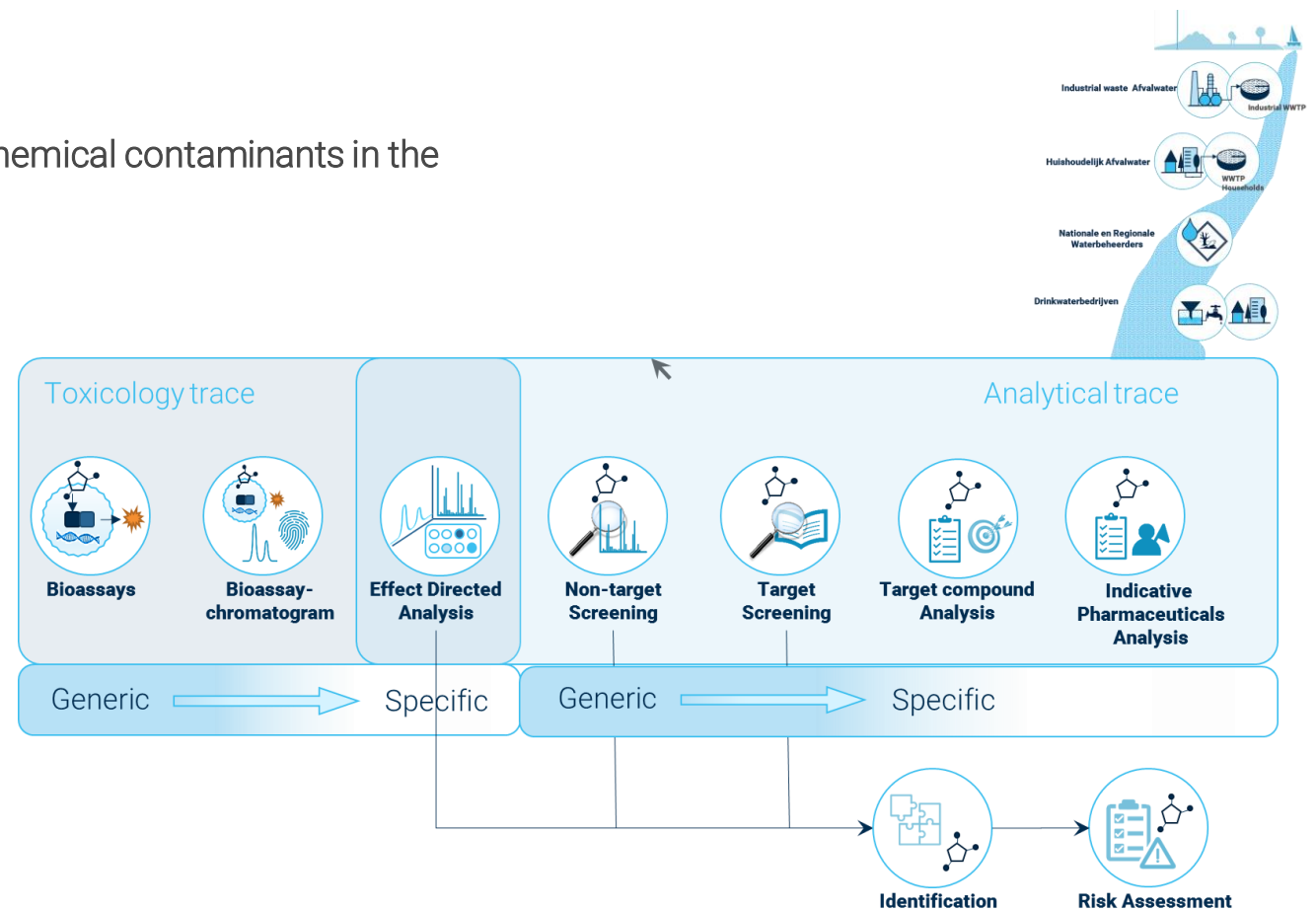
Bioactive compounds in water

Corine Houtman

Bio Detectors 2022, September 13 Prague

The Water Laboratory:

- Central laboratory for 3 Dutch Drinking Water companies
 - Use surface water from rivers Rhine, Meuse and Lake Yssel to prepare drinking water
- Monitoring and Research on presence and toxicology of chemical contaminants in the water cycle
- Using:
 - Bioassays
 - Chemical target analysis
 - Screening
 - Combination: Effect Directed Analysis



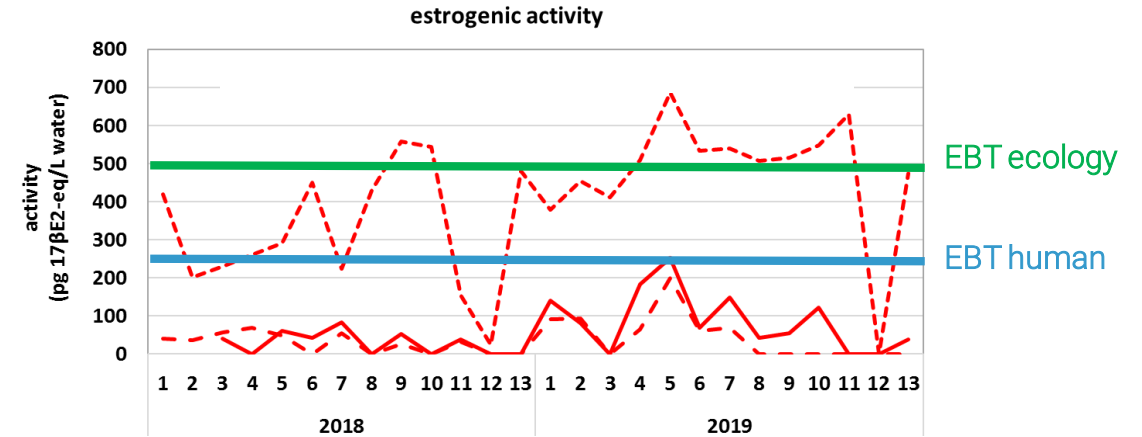
The Water Laboratory:

Bioassay Policy:

- EU DW Legislation: Risk Based Monitoring
- => prioritization of compounds using bioassays & screening

Bioassays in routine monitoring:

- Surface waters (13x/y)
- Drinking water (4x/y)
 - compare concentrations with Effect based Trigger Values
 - 2 consecutive exceedances & unknown cause? => start [Effect Directed Analysis](#) => characterize / identify active compounds



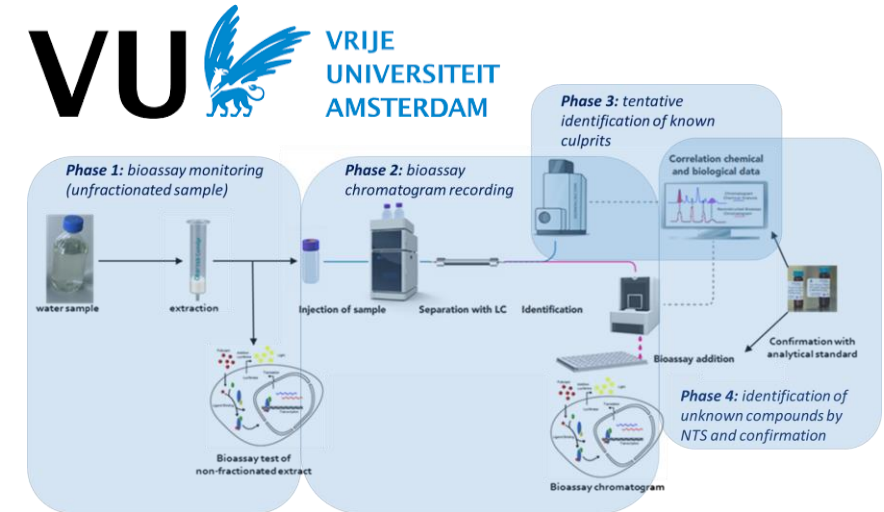
Effect Directed Analysis

EDA Platform Developed in cooperation with VU

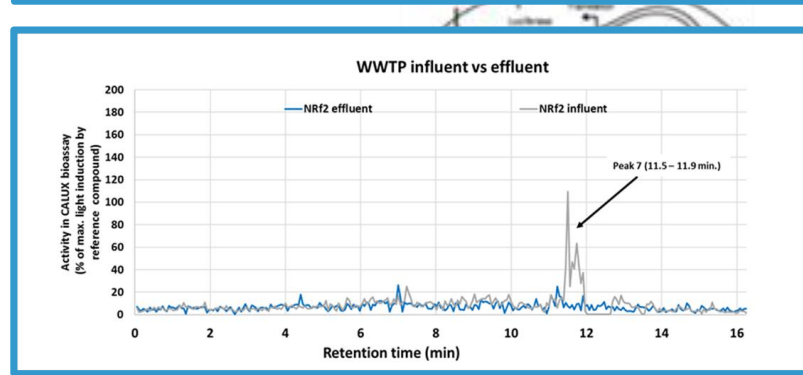
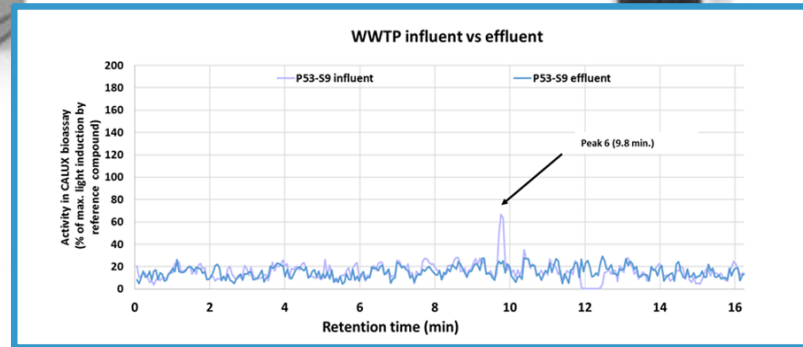
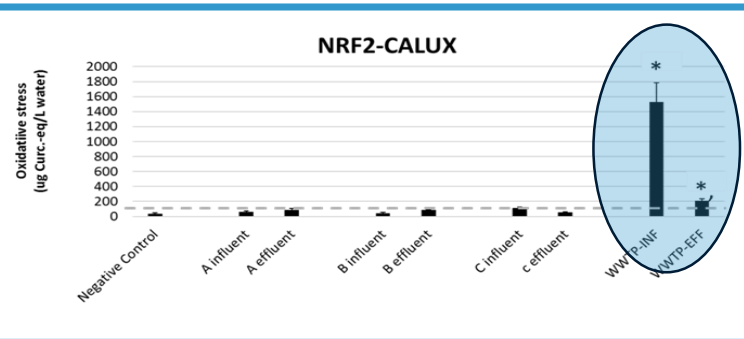
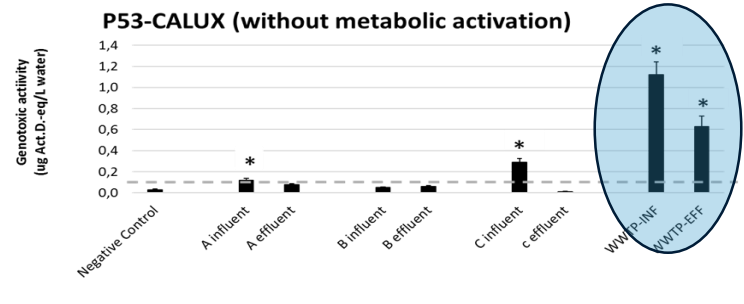
- Jonker et al., 2015 & Zwart et al., 2020

Implemented at the Water Laboratory:

- Application to sources DW and WWTP effluent:
 - AR, ER, GR (Houtman et al., ETAP 2020)
 - PR, AR, anti-AR, anti-PR, cytotox-CALUX (Houtman et al., Env. Int. 2021)
- Coupling new bioassays to Effect-directed Analysis platform:
 - P53-CALUX
 - NRF2-CALUX



Effect Directed Analysis with P53- and NRF2-CALUX



Identification responsible compounds:

Genotoxicity (P53-CALUX):

- One peak
- 10 candidates

Oxidative stress:

- One peak
- 5 candidates

=>activity to be confirmed with pure standards

EDA in sources and DW of 4 DW companies

- Companies:



- common research program



EDA in sources and DW of 4 DW companies

- Locations:
 - Sources (5 + 2 spare)
 - Additional (1 WWTP effluent, 2 impact on source)
 - Process water (1)
 - Drinking water (5)

WWTP-EFF		
Rhine catchment		
SW 1		=> DW 1
SW 2		
SW 3	=>PW 3	=> DW 3
SW 4		
SW 5		=> DW 5
Meuse catchment		
SW 6		=> DW 6
SW 7		=> DW 7
SW 8		
SW 9		



Aim 1: Presence and fate of bioactivities in sources and treatment

1. CALUX 10 endpoints

Hormone like effects:

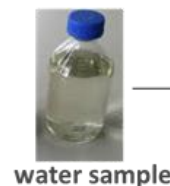
1. Androgenic (AR)
2. Estrogenic (ER α)
3. Glucocorticoid (GR)
4. Progestogenic (PR)

Hormone antagonism:

5. Anti-androgenic (anti-AR)
6. Anti-estrogenic (anti-ER)
7. Anti-progestogenic (anti-PR)

Reactive MoAs:

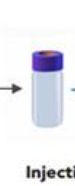
8. Cytotoxicity (cell viability)
9. Oxidative stress (NRF2)
10. Genotoxicity (P53 $\pm$ S9)



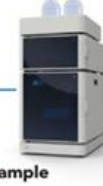
water sample



extraction



Injection of sample



Separation with LC

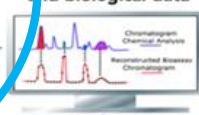


Identification



Bioassay addition

Correlation chemical and biological data



confirmation with analytical standard

bioassay test of non-fractionated extract

3. Targeted hr-QToF screening

>2000 compounds



2. EDA: for a selection of locations / endpoints

Aim 2: Characterisation of bioactive compounds with EDA

Aim 1: Presence and fate of bioactivities in sources and treatment

1. CALUX 10 endpoints

- Hormone like effects:
- Hormone antagonism:
- Reactive MoAs:
1. Androgenic (AR)

2. Estrogenic (ERα)

3. Glucocorticoid (GR)

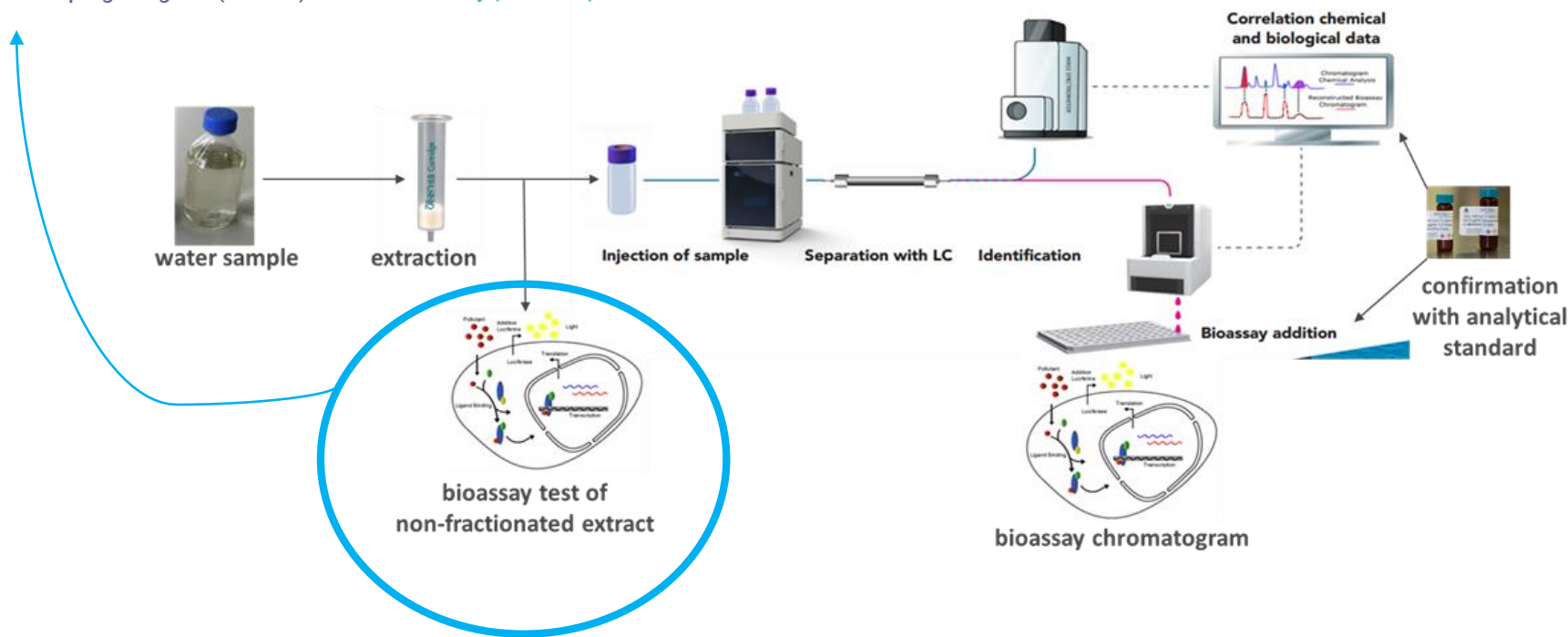
4. Progestogenic (PR)
5. Anti-androgenic (anti-AR)

6. Anti-estrogenic (anti-ER)

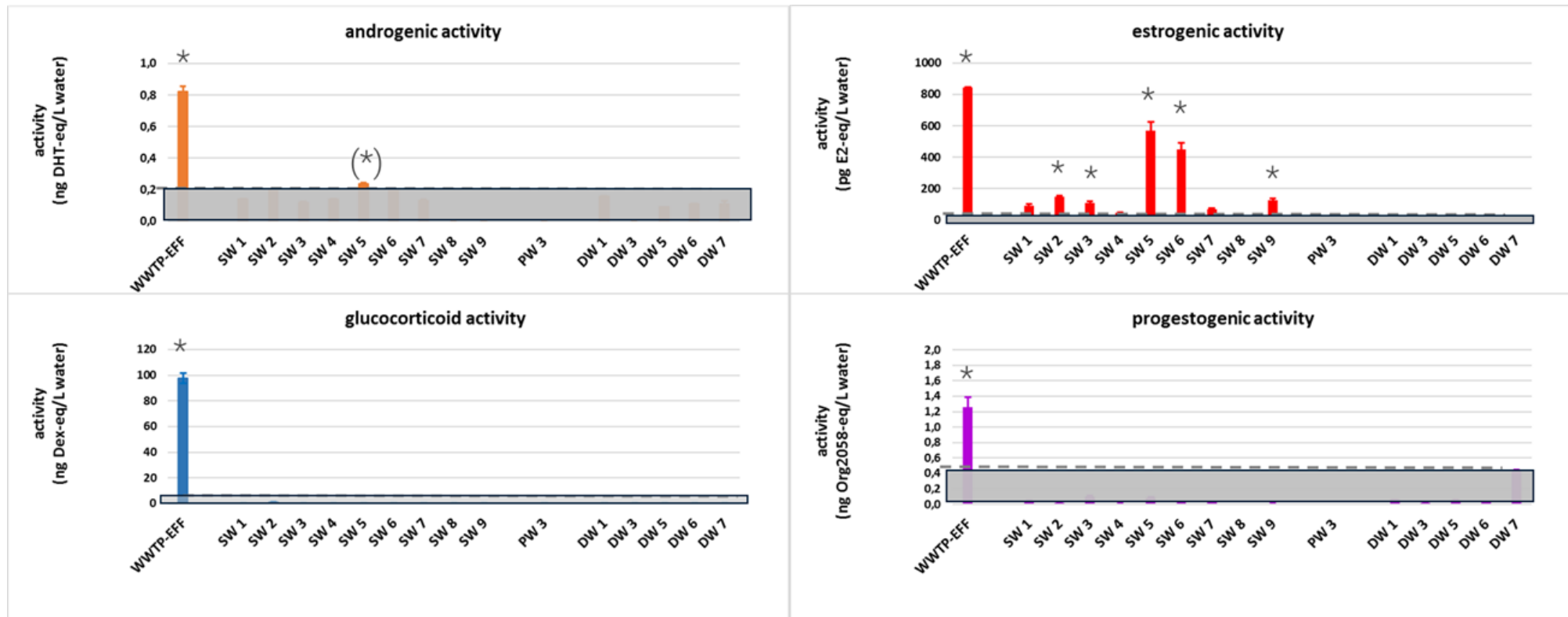
7. Anti-progestogenic (anti-PR)
8. Cytotoxicity (cell viability)

9. Oxidative stress (NRF2)

10. Genotoxicity (P53 ± S9)



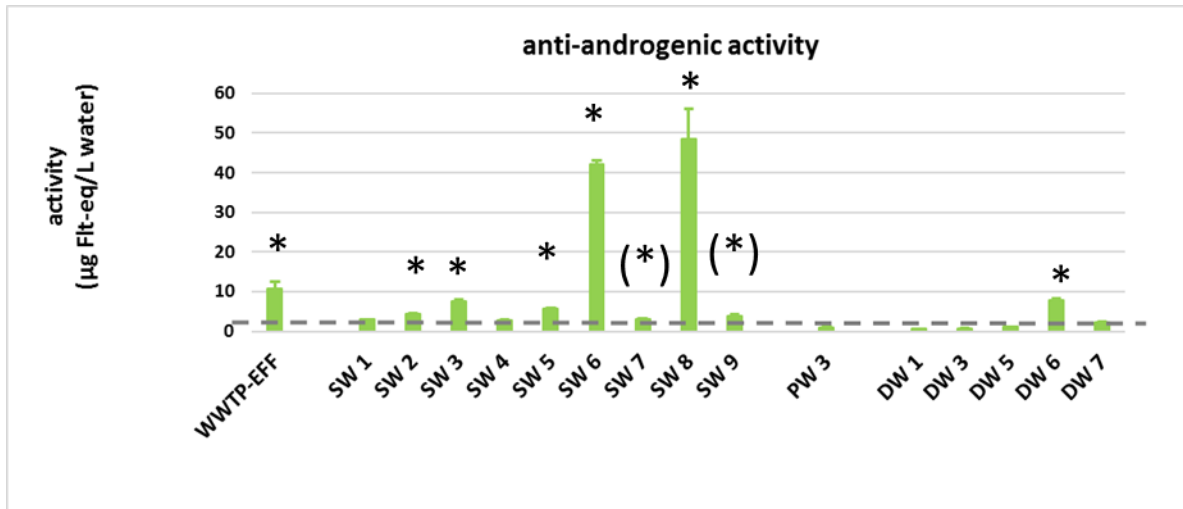
1. Presence and fate of bioactivities in sources and treatment



Hormone-like: complete removal

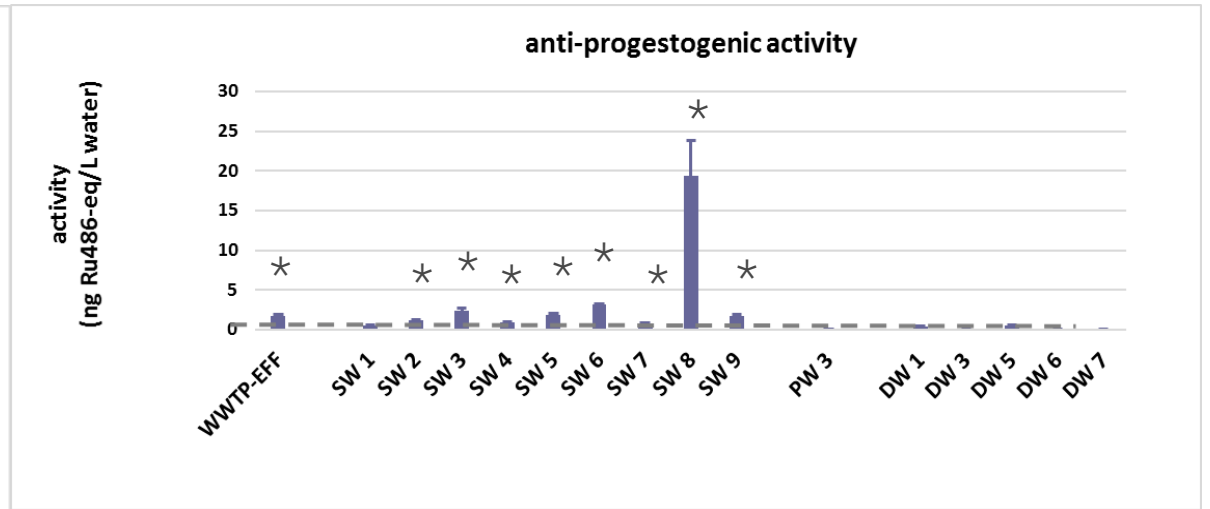
*: act. > 3x MRL
(*): MRL < act. < 3x MRL
Dotted line: MRL

1. Presence and fate of bioactivities in sources and treatment

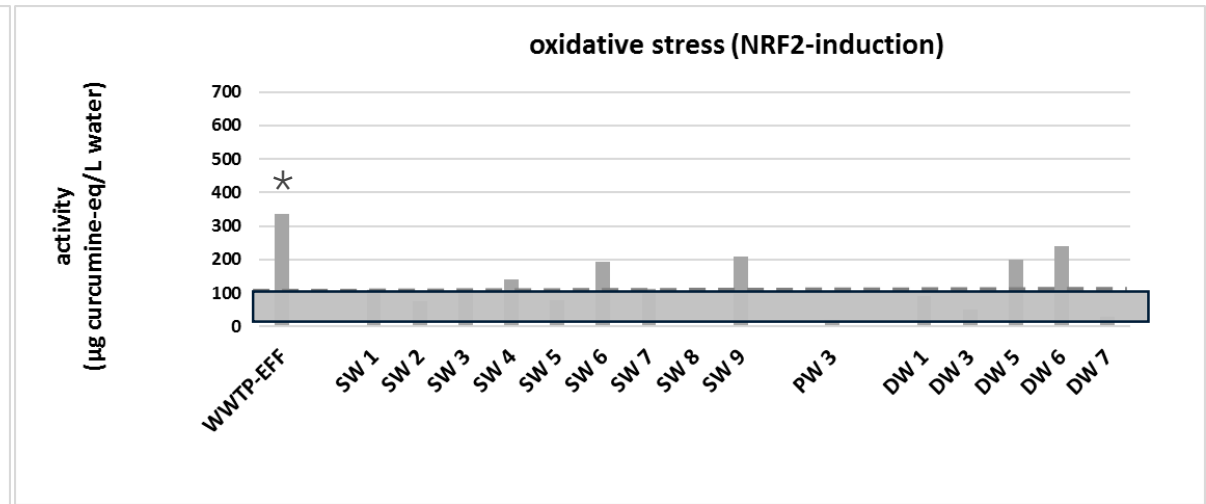
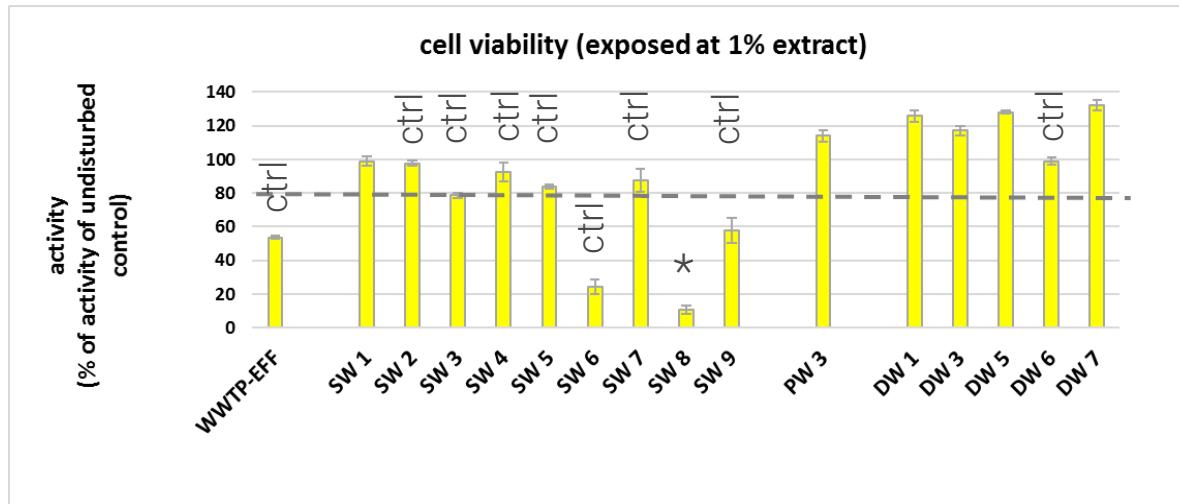


Anti-ER: not detected

Hormone antagonism: **anti-AR** not always completely removed



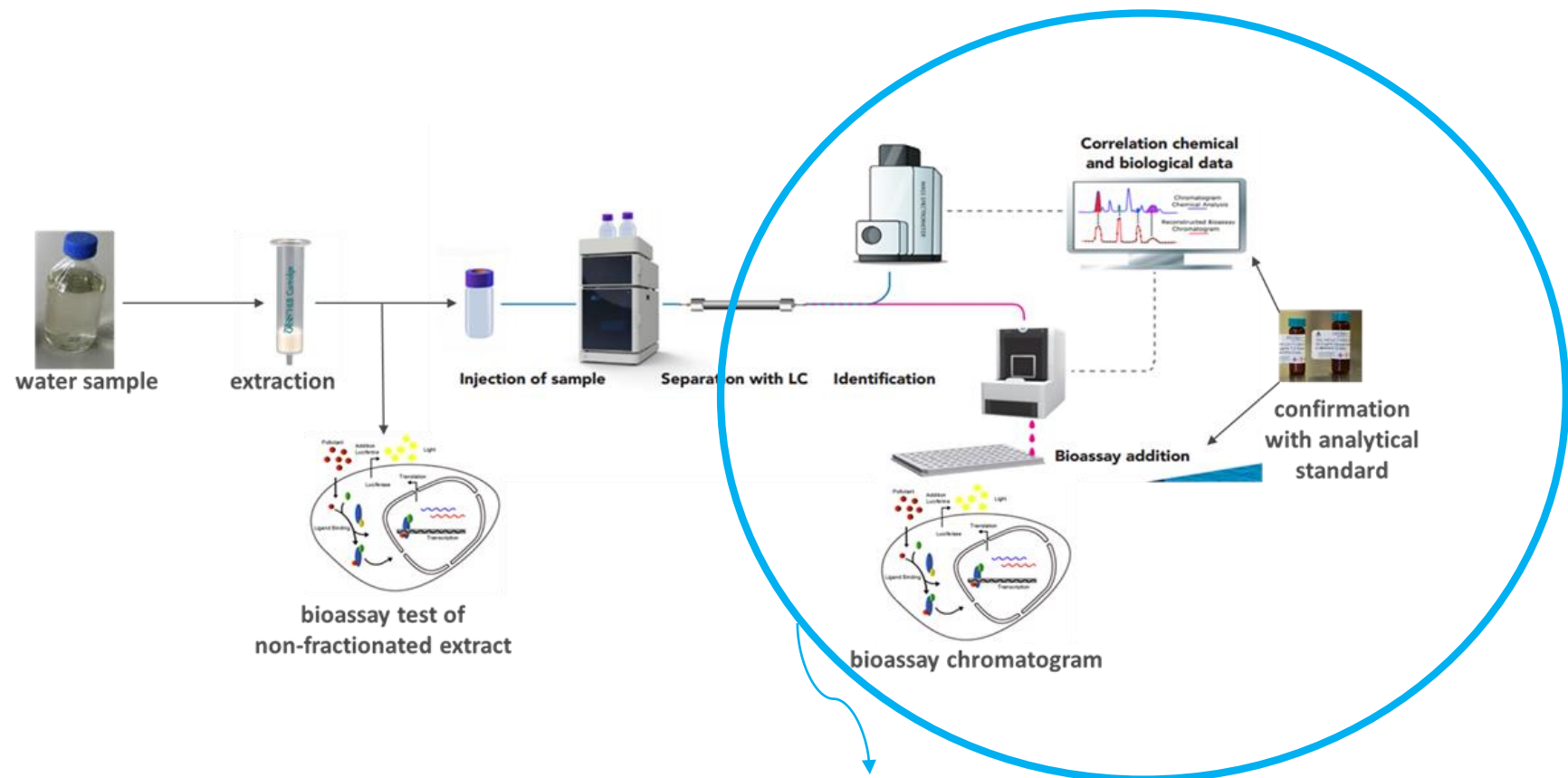
1. Presence and fate of bioactivities in sources and treatment



Genotoxic activity in P53-CALUX (+/-S9): not detected

Presence and fate:

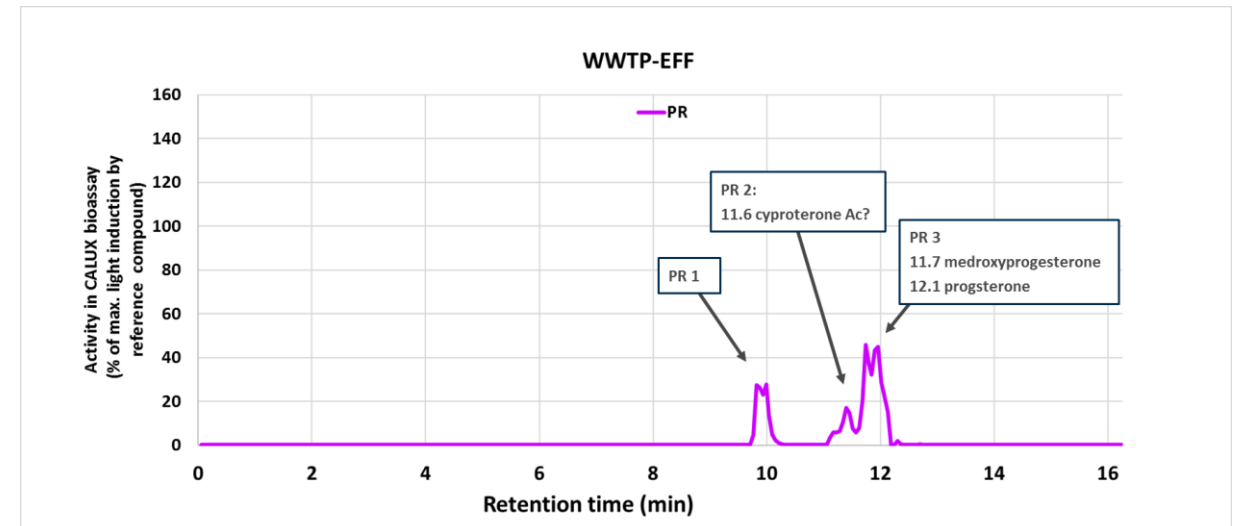
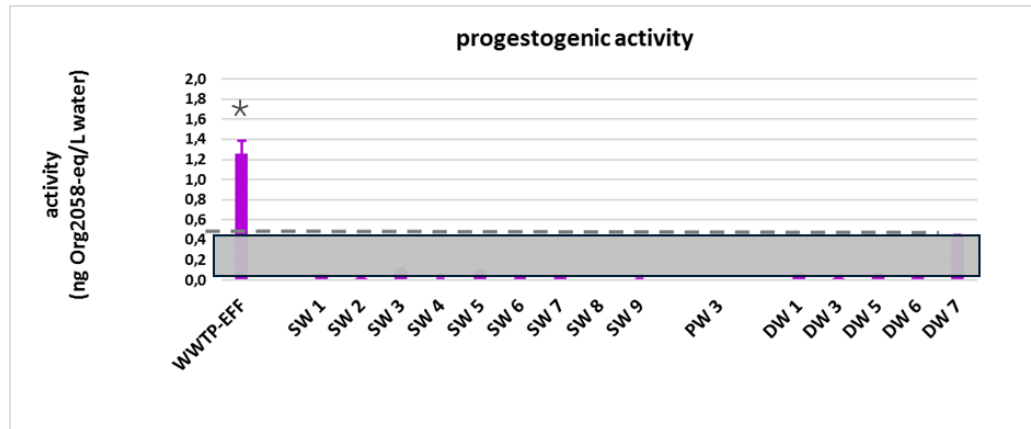
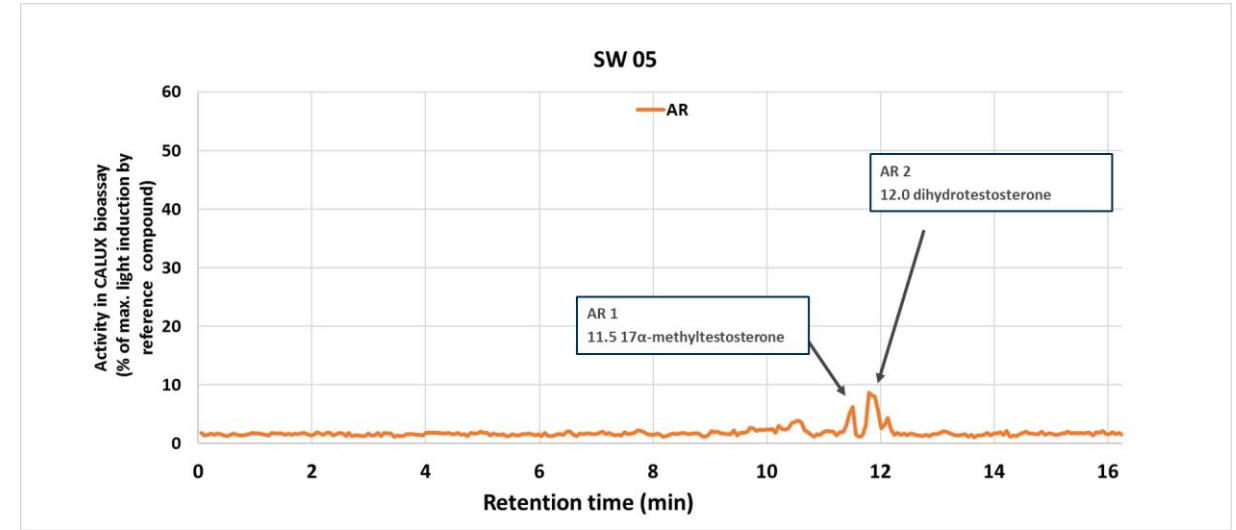
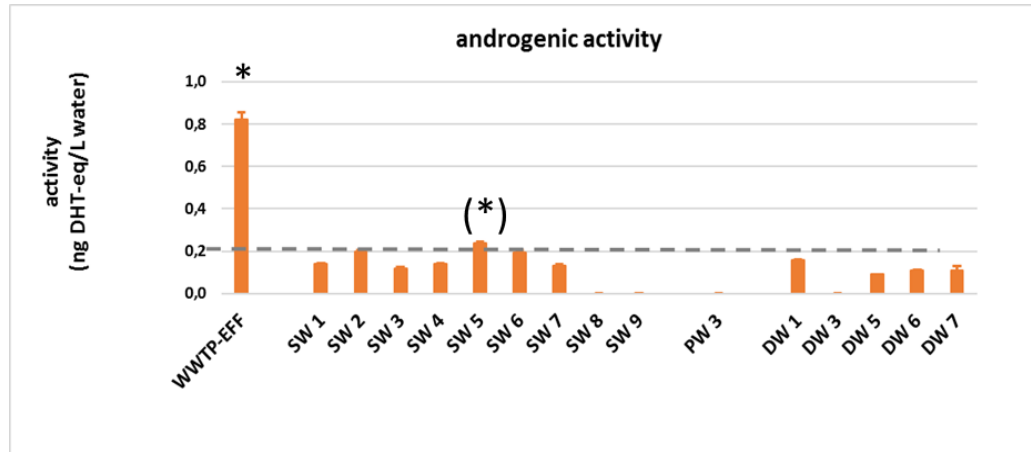
- 8 out of 10 endpoints detected
- Most are completely removed in DW treatment



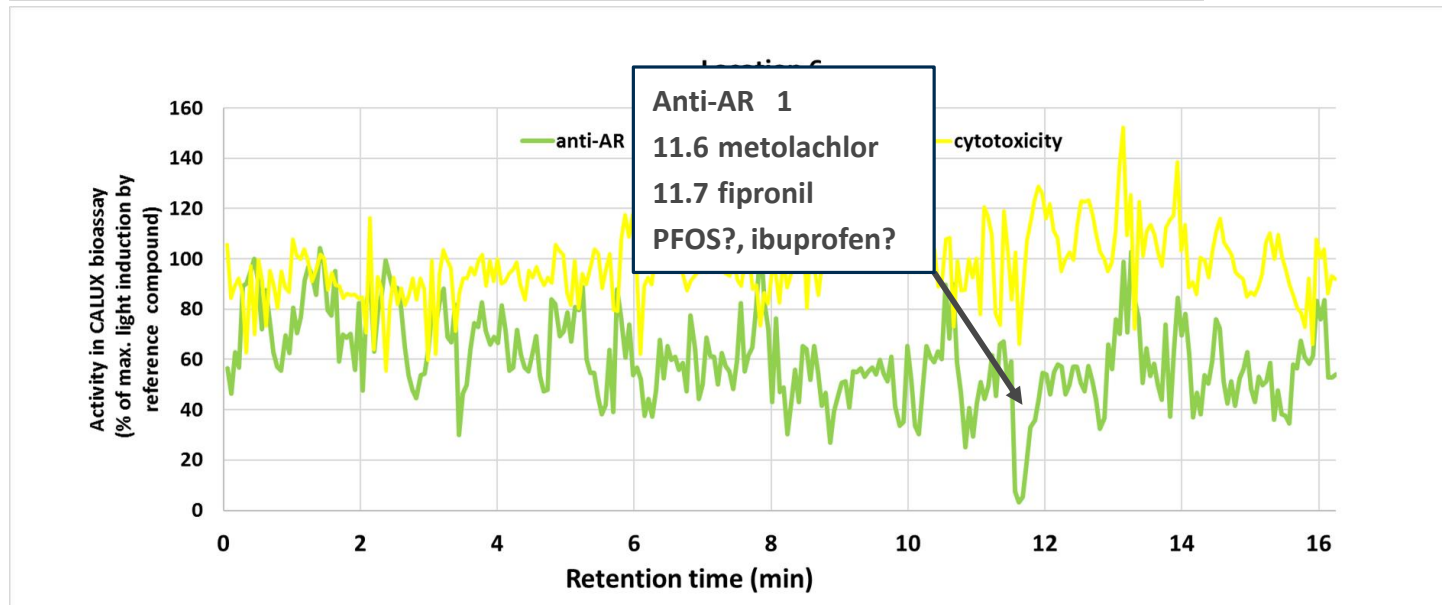
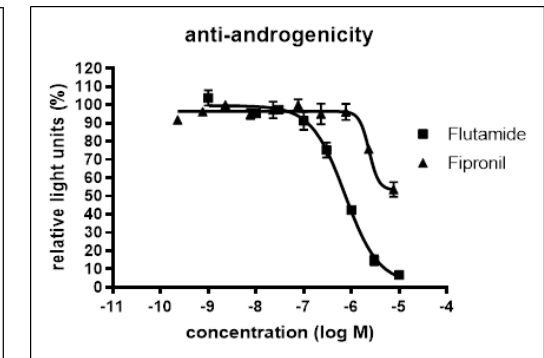
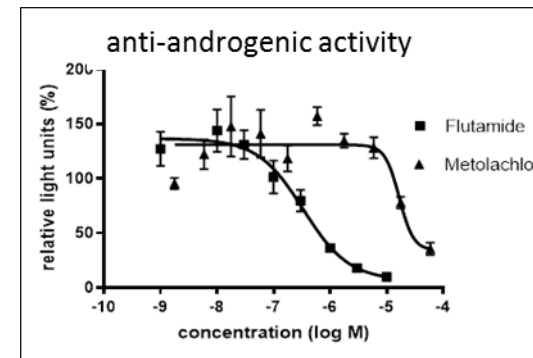
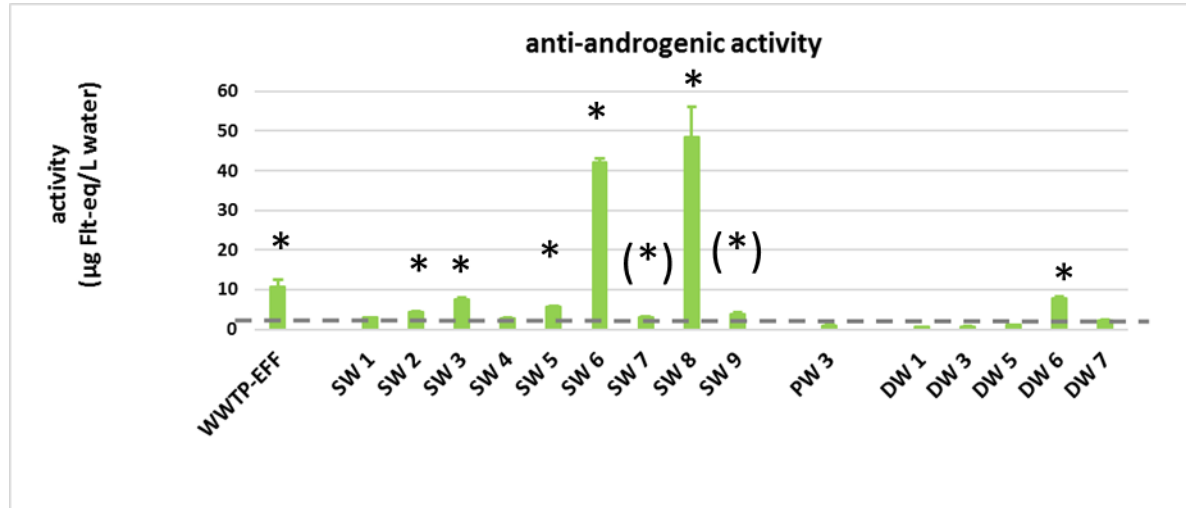
2. EDA: for a selection of locations / endpoints

Aim 2: Characterisation of bioactive compounds with EDA

2. Characterisation of bioactive compounds with EDA



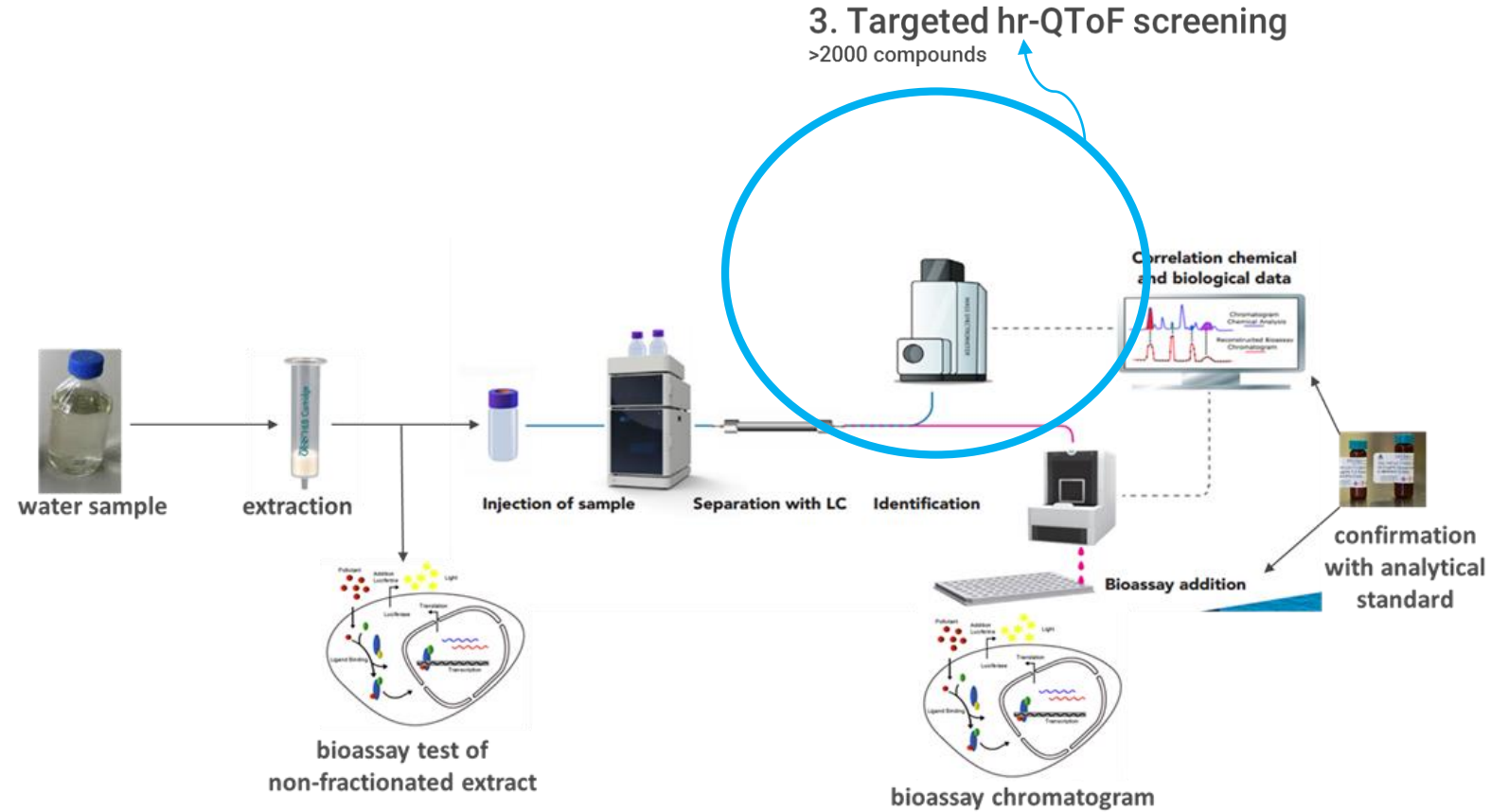
2. Characterisation of bioactive compounds with EDA



=> EDA succesful in identifying bioactive compounds,
although not all peaks are resolved.

Knowing identity necessary for:

- Risk Assessment
- Measures against emission
- Improving treatments



3. Variation WQ in Rhine and Meuse catchments

Correlation between locations according to compounds / bioactivities?

- Data of bioassays and of Targeted Screening
- Multivariate Statistics
 - Pearson's r correlation test
 - Principle Component Analysis (PCA)
 - Hierarchical Cluster Analysis (HCA)



3. Variation WQ in Rhine and Meuse catchments

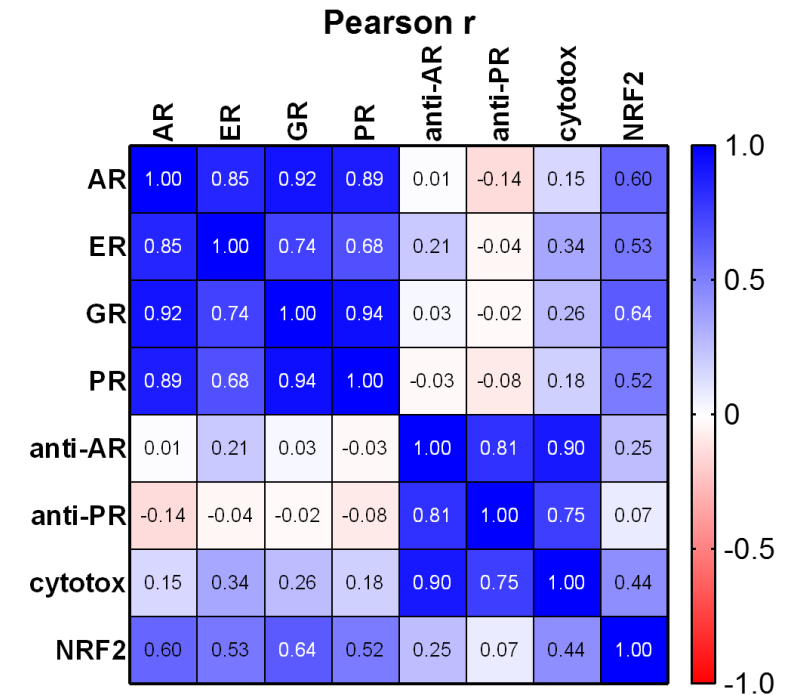
Pearson's r test

- Correlation between bioassay endpoints:
 - Hormone-like
 - Hormone antagonisms & cytotoxicity
 - Ox. Stress more independent

In agreement with (often) responsible compounds and their emission sources

Pearson's r test

- No clear pattern for locations



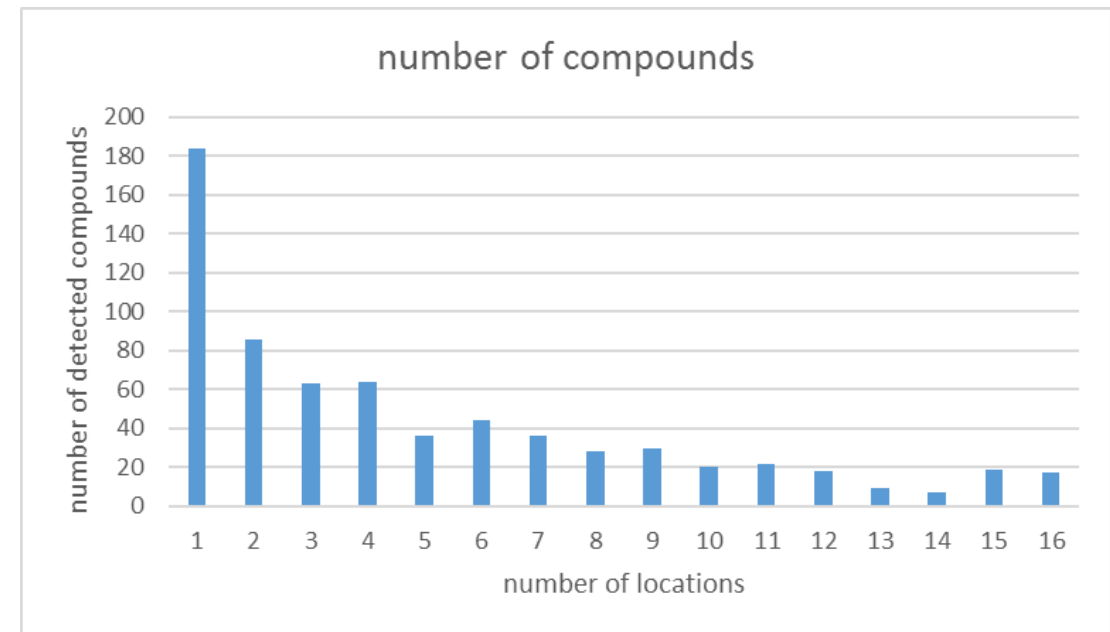
Pearson r Correlation matrix

	WWTP-EFF	SW 1	SW 2	SW 3	SW 4	SW 5	SW 6	SW 7	SW 8	SW 9	PW 3	DW 1	DW 3	DW 5	DW 6	DW 7
WWTP-EFF	1.00	0.67	0.31	-0.67	0.33	0.27	-0.64	0.54	-0.96	-0.29	-0.03	0.59	0.05	0.24	0.10	0.36
SW 1	0.67	1.00	0.86	-0.71	0.88	0.44	-0.83	0.95	-0.71	-0.58	-0.22	0.74	-0.23	0.29	0.21	0.10
SW 2	0.31	0.86	1.00	-0.15	0.05	0.70	-0.30	0.55	-0.33	-0.83	0.30	0.64	0.11	-0.47	-0.50	0.25
SW 3	-0.67	-0.71	-0.15	1.00	-0.65	-0.21	0.36	-0.68	0.76	0.18	0.39	-0.24	0.28	-0.58	-0.59	0.14
SW 4	0.33	0.88	0.05	-0.65	1.00	-0.18	-0.47	0.83	-0.37	0.03	-0.66	0.43	-0.56	0.83	0.78	-0.33
SW 5	0.27	0.44	0.70	-0.21	-0.18	1.00	-0.01	0.21	-0.40	-0.44	0.09	0.06	-0.06	-0.40	-0.43	0.01
SW 6	-0.64	-0.83	-0.30	0.36	-0.47	-0.01	1.00	-0.69	0.49	0.37	-0.18	-0.76	-0.33	-0.30	-0.04	-0.48
SW 7	0.54	0.95	0.55	-0.68	0.83	0.21	-0.69	1.00	-0.55	-0.49	-0.26	0.74	-0.23	0.45	0.36	0.02
SW 8	-0.96	-0.71	-0.33	0.76	-0.37	-0.40	0.49	-0.55	1.00	0.25	0.22	-0.47	0.17	-0.29	-0.20	-0.22
SW 9	-0.29	-0.58	-0.83	0.18	0.03	-0.44	0.37	-0.49	0.25	1.00	-0.50	-0.66	-0.37	0.47	0.45	-0.60
PW 3	-0.03	-0.22	0.30	0.39	-0.66	0.09	-0.18	-0.26	0.22	-0.50	1.00	0.16	0.86	-0.76	-0.82	0.62
DW 1	0.59	0.74	0.64	-0.24	0.43	0.06	-0.76	0.74	-0.47	-0.66	0.16	1.00	0.14	0.02	-0.11	0.51
DW 3	0.05	-0.23	0.11	0.28	-0.55	-0.06	-0.33	-0.23	0.17	-0.37	0.95	0.14	1.00	-0.55	-0.85	0.64
DW 5	0.24	0.29	-0.47	-0.58	0.83	-0.40	-0.30	0.45	-0.28	0.47	-0.76	0.02	-0.55	1.00	0.84	-0.39
DW 6	0.10	0.21	-0.50	-0.59	0.78	-0.43	-0.04	0.36	-0.20	0.45	-0.82	-0.11	-0.85	0.84	1.00	-0.49
DW 7	0.36	0.10	0.25	0.14	-0.33	0.01	-0.48	0.02	-0.22	-0.60	0.62	0.51	0.64	-0.39	-0.48	1.00

3. Variation WQ in Rhine and Meuse catchments

Targeted screening data

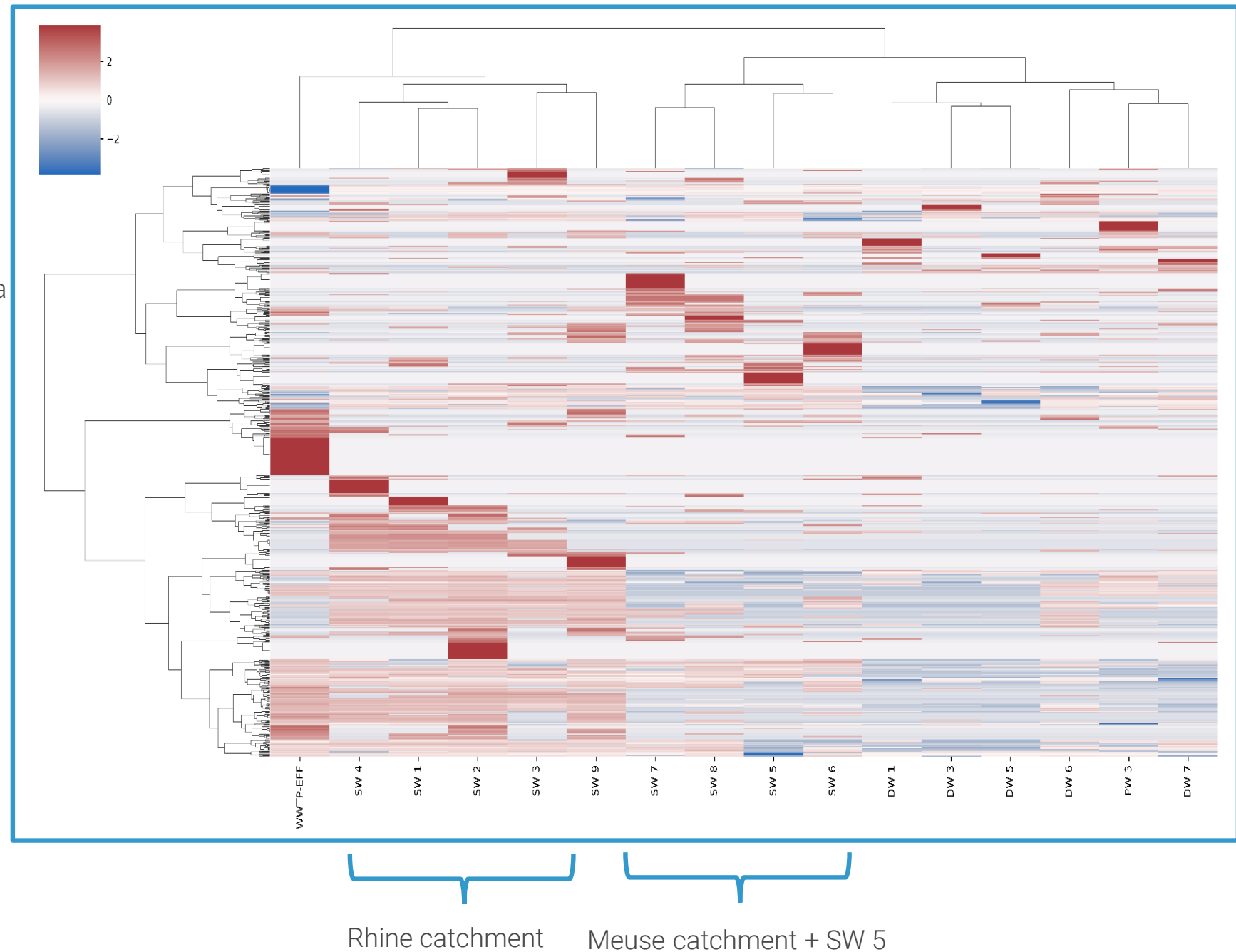
- 683 compounds detected
- WWTP-EFF > SW > DW



HCA with targeted screening data

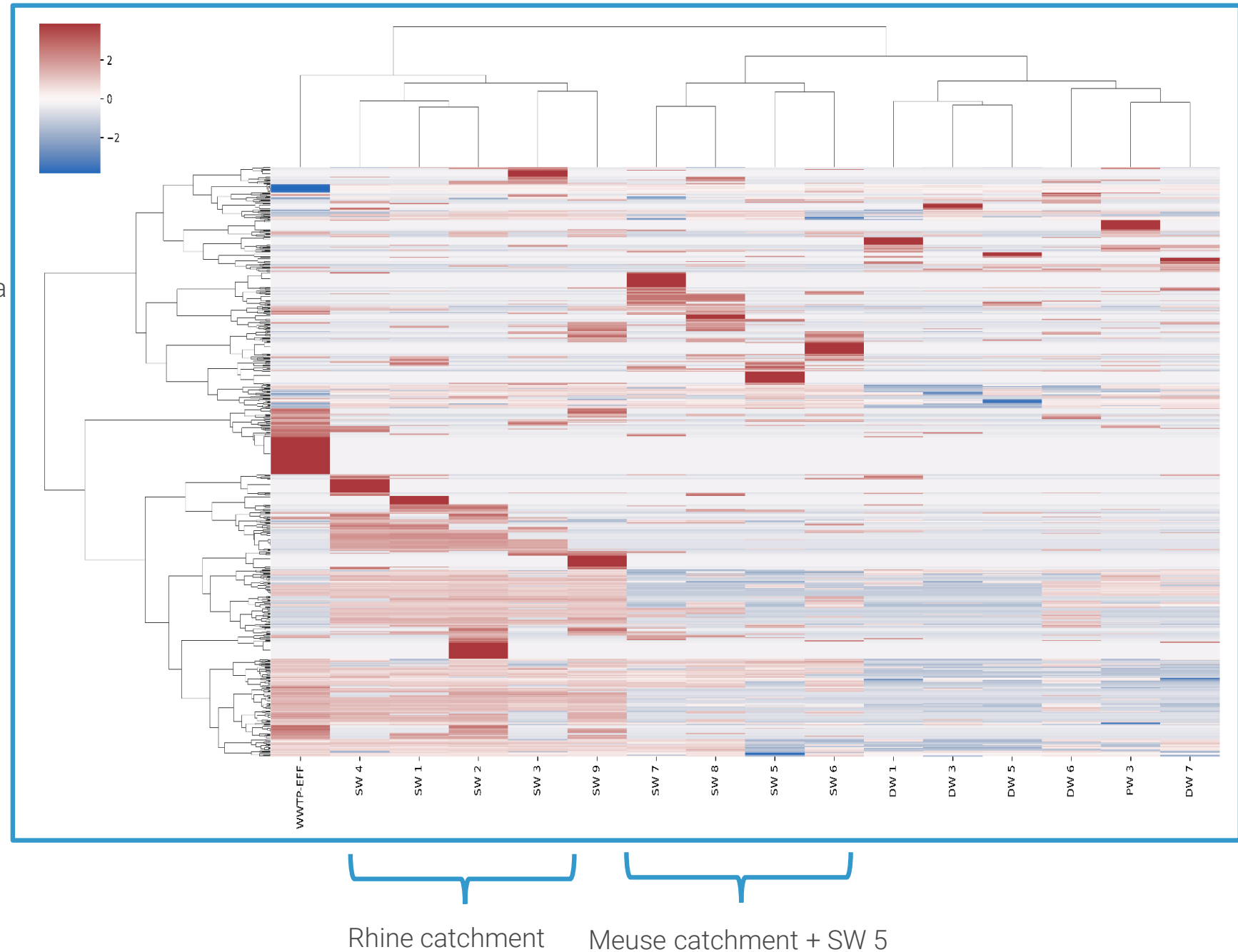
- Log transformed normalized data
- Clustering Rhine vs. Meuse

WWTP-EFF		
Rhine catchment		
SW 1		=> DW 1
SW 2		
SW 3	=>PW 3	=> DW 3
SW 4		
SW 5		=> DW 5
Meuse catchment		
SW 6		=> DW 6
SW 7		=> DW 7
SW 8		
SW 9		



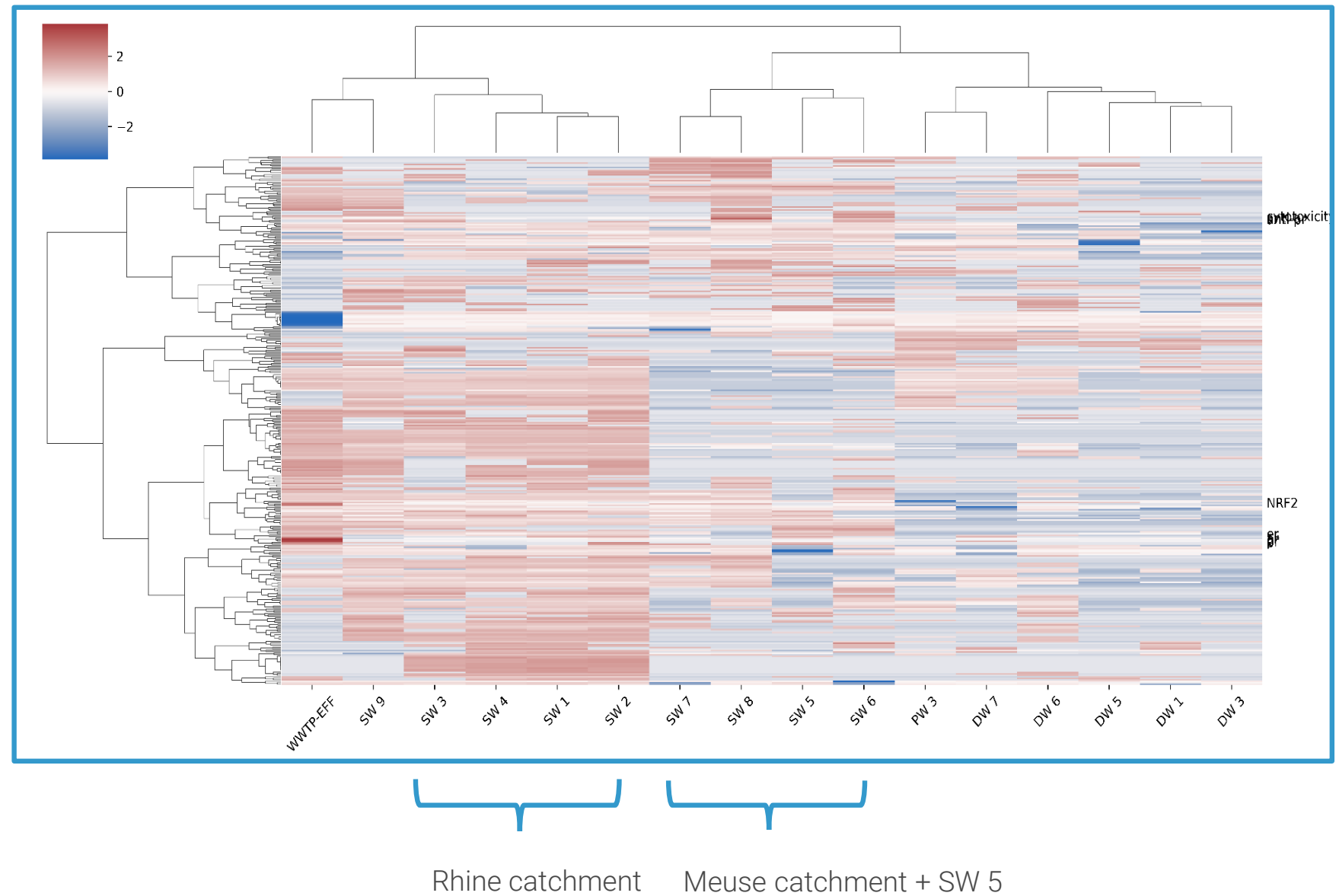
HCA with targeted screening data

- Log transformed normalized data
- Clustering Rhine vs. Meuse
- Related to specific clusters of compounds => catchment specific patterns
- DW clusters far away from own source
=> treatment is key in WQ



HCA with targeted screening data & bioassays:

- Bioassays in clustering => evaluate adjacent compounds as candidate causative compounds
- Next step: bring EDA and data science of targeted screening together



Conclusions

- Bioactive compounds are the ones that matter for WQ, especially for DW
- Bioassays are very valuable instruments for Risk Based Monitoring
- Combination with high resolution chemical screening enables:
 - identification of bioactive compounds
 - pattern analysis to understand spatial differences

Thanks!



BioDetection
Systems



You !





Het Waterlaboratorium

JW. Lucasweg 2

2031 BE Haarlem

023 – 517 5900

info@hetwaterlaboratorium.nl