



Ron van der Oost, Waternet

Minne Heringa, KWR Watercycle Research Institute

Annemarie van Wezel, KWR Watercycle Research Institute

Toxiciteit stofmengsels in drinkwater naast stofgericht ook effectgericht beoordelen

Met streefwaarden voor milieuvreemde stoffen in drinkwater⁸⁾ willen de Nederlandse waterbedrijven nu en straks zorgen voor drinkwater van zeer goede kwaliteit. Een betrouwbare beoordeling van de chemische waterkwaliteit is hierbij van belang. De huidige chemische analyses kunnen niet het enorme aantal aan vaak onbekende stoffen detecteren dat in de bronnen voor de drinkwaterproductie kan voorkomen⁵⁾. Daarnaast ontbreken voor veel stoffen en hun afbraakproducten toxicologische gegevens, zodat hun gezondheidsrisico's niet goed te schatten zijn²⁾. Ook is onbekend hoe de gecombineerde werking van verschillende stoffen de totale toxiciteit beïnvloedt. In het kader van het bedrijfstakonderzoek voor de waterbedrijven is onderzocht hoe de toxicologische risicobeoordeling van complexe mengsels van stoffen in drinkwater het best vorm kan krijgen. Een evaluatie van de beschikbare methoden pleit voor integrale monitoring door toxicologische en chemische methoden te combineren.

De giftigheid van een mengsel van stoffen hangt af van de toxische werking van de individuele stoffen en hun mogelijke interacties. Stoffen kunnen eenzelfde werkingsmechanisme hebben en daarmee een gecombineerde werking vertonen, of elkaars effect beïnvloeden zonder dat sprake is van eenzelfde werkingsmechanisme. Soms is sprake van een interactie, waarbij het gecombineerde effect van het mengsel kleiner of groter is dan de som van afzonderlijke effecten⁷⁾.

Hoewel de concentraties van stoffen in drinkwater zeer laag zijn, kan drinkwater worden beschouwd als een complex mengsel. Vanwege de lage concentraties lijkt vooral combinatiewerking van stoffen met gelijke werking van belang. Er is dan sprake van dosisadditie: de concentraties maal de toxische potenties van alle stoffen met eenzelfde werking bepalen opgeteld het effect. Bij complexe mengsels is het echter niet mogelijk om de totale toxiciteit nauwkeurig te voorspellen op basis van individuele stofgehalten, omdat de exacte samenstelling van een complex mengsel vrijwel niet te analyseren is. Bovendien is over de toxische potentie van de meeste stoffen onvoldoende informatie bekend en

is er nog te weinig kennis over de werkingsmechanismen van de meeste stoffen. Daarom is een visie op mengseltoxiciteit geformuleerd waarin een alternatief wordt voorgesteld voor risicoanalyse van complexe mengsels, op basis van een effectgerichte naast een stofgerichte benadering.

Effectgerichte testen

Effectgerichte testen meten het biologische effect na blootstelling van organismen of cellen aan een testmonster. De testen meten het totale effect van het mengsel van (onbekende) verontreinigingen in water. Achterhalen van de oorzaak van een zo waargenomen effect (de toxische stof/stoffen) vraagt dan nader onderzoek. Zowel testen voor algemene acute toxiciteit als voor specifieke chronische effecten kunnen nuttig zijn. Algemene acute toxiciteitstoetsen met aquatische organismen (*in vivo* bioassays) worden reeds toegepast als bioalarming voor calamiteiten bij de drinkwaterbronnen en kunnen ingezet worden voor alarming bij calamiteiten. Bij calamiteiten zijn de concentraties van stoffen hoog. De organismen kunnen dan snel reageren, bijvoorbeeld door veranderd zwemgedrag of sterfte. *In vitro* bioassays, op basis van celkweek of bacterietesten, geven resultaat bij lagere concentraties van stoffen en zijn

gericht op specifieke toxische effecten die relevant zijn voor de menselijke gezondheid bij chronische blootstelling. Zulke specifieke toxische effecten zijn DNA-beschadiging, tumorfvorming en -promotie, hormoonverstoring, verstoring van het afweersysteem, effecten op het zenuwstelsel, afwijkingen van de ongeboren vrucht, effecten op de voortplanting, effecten op het ontgiftingsstelsel en bioactiviteit van geneesmiddelen. Omdat zowel de oorspronkelijke stoffen als de omzettingsproducten giftig kunnen zijn, kunnen de bioassays worden uitgevoerd zonder of juist met metabolisme (door toevoeging van leverenzymen).

De concentraties van stoffen in drinkwater en de toeleverende bronnen zijn doorgaans zo laag dat van acute effecten geen sprake is. Vaker zullen specifieke effecten aan de orde zijn. Van genotoxische en hormoonverstorende effecten is inmiddels duidelijk dat *in vitro* bioassays (bijvoorbeeld Ames II-test, Comet-assay, batterij-CALUX-testen) relevant en voldoende gevoelig zijn voor screening van (drink)waterkwaliteit^{1),9)}. Van de overige genoemde specifieke effecten is de verwachting dat zij relevant zijn, maar dit vergt nog nader onderzoek. In de tabel staan suggesties voor bioassays die op dit moment het meest geschikt

lijken om genoemde effecten te analyseren. De ontwikkelingen op het gebied van *in vitro* bioassays gaan echter snel. Deze lijst kan dus veranderen. Om in aanmerking te komen voor implementatie bij de kwaliteitsbeoordeling van drinkwater zal een *in vitro* bioassay robuust, reproduceerbaar, gevoelig, selectief en internationaal geaccepteerd en gevalideerd moeten zijn. Natuurlijk zijn ook praktische aspecten als kosten, gebruikersgemak en snelheid van belang.

Effectgerichte streefwaarden

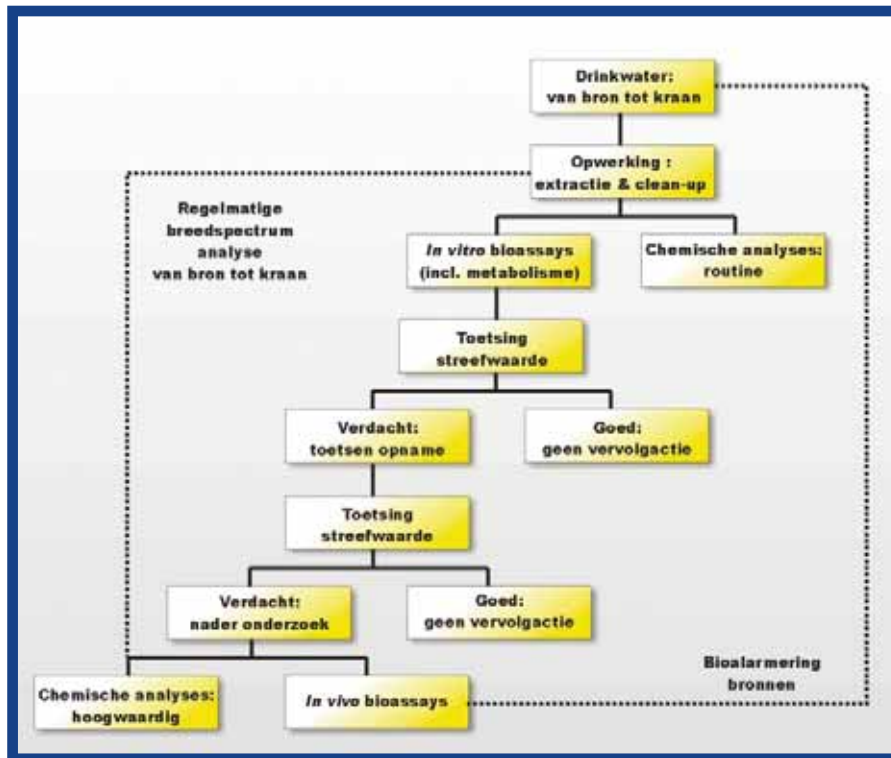
Bij het toepassen van bioassays voor risicoanalyse van mengsels zijn effectgerichte normen of streefwaarden nodig waarmee het gemeten resultaat een betekenis krijgt. Voor de algemene *in vivo* bioassays voor bioalarmering is eerder door Rijkswaterstaat een indicatieve norm voorgesteld: een effect mag pas optreden bij 20 maal concentreren van het water. Onduidelijk blijft vooralsnog of deze indicatieve norm goede aanwijzingen geeft over eventuele chronische toxiciteit bij mensen.

Tot nu toe is geen directe relatie vastgesteld tussen effecten in *in vitro* bioassays en toxiciteit voor de mens. De ADI (Acceptable Daily Intake) is de hoeveelheid van een stof (uitgedrukt per kilo lichaamsgewicht per dag) die door de mens kan worden opgenomen zonder nadelige gezondheidseffecten. Deze ADI is meestal gebaseerd op toxiciteitstesten met proefdieren. Bij de interpretatie van *in vitro* bioassays dient rekening te worden gehouden met verschillen tussen eencelligen en hogere diersoorten, zoals mensen. Verschillen worden veroorzaakt door andere opname van de stoffen via het maag/darmsysteem (absorptie), verdeling via lichaamsvloeistoffen in het lichaam (distributie), afbraak of omzetting (metabolisme) en uitscheiding (excretie), samen afgekort als ADME. Deze ADME-processen verlopen anders in hogere organismen dan in een bioassay.

Wij stellen voor om effectgerichte streefwaarden voor *in vitro* assays te ontwikkelen aan de hand van een (bestaande) ADI-waarde van een referentiestof en informatie over ADME. De meest potente stof voor het effect in kwestie kan daarbij dienen als referentiestof voor metingen aan mengsels. De effectgerichte streefwaarde komt dan overeen met het effect van een afgesproken concentratie van de referentiestof. Volgens een vergelijkbaar concept is een alarmeringswaarde voor stoffen met oestrogene activiteit afgeleid⁽⁶⁾. Bij een waargenomen effect dat onder de effectgerichte streefwaarde ligt, is de waterkwaliteit goed en zijn de humane risico's verwaarloosbaar. Bij een overschrijding van de effectgerichte streefwaarde is de waterkwaliteit verdacht en is nader chemisch en/of toxicologisch onderzoek nodig om vast te stellen of de stoffen die het effect veroorzaken inderdaad schadelijk zijn voor de gezondheid van de mens.

Strategie voor integrale monitoring

De risico's van mengseltoxiciteit kunnen het best worden geanalyseerd met integrale



Schematische weergave van de voorgestelde strategie voor integrale monitoring drinkwater. De processen die nu al periodiek worden uitgevoerd zijn weergegeven met stippellijnen.

monitoring; een set relevante effectgerichte testen gecombineerd met chemische analyses (zie schema). Bij overschrijding van de effectgerichte streefwaarde is het relevant om een indruk te krijgen of de toxische stoffen door de mens kunnen worden opgenomen. Dat kan met een testmodel voor passage over het darmepitheel, waarbij het testextract over een enkele laag darmcellen wordt geleid. Als na deze simulatie van darm passage het testextract nog steeds een effect boven de streefwaarde geeft, is een verder hoogwaardig chemisch analytisch onderzoek relevant of een *in vivo* bevestigingsonderzoek. Afhankelijk van het aangetoonde effect kan met chemische analyses gericht worden gezocht naar de stoffen die dit effect veroorzaken. Het betreft dan chemische analyse gericht op screening en identificatie

van de toxische stoffen. Wanneer de stoffen bekend zijn, kan gericht een toxicologische risicobeoordeling worden gemaakt. Om de relevantie van de aangetoonde *in vitro* effecten voor de mens te verifiëren kan eventueel een (kostbaar) vergelijkend *in vivo* toxiciteitonderzoek worden uitgevoerd in proefdieren.

Mogelijke toepassingen van effectgerichte testen

Met de *in vitro* bioassays kan drinkwater periodiek worden gescreend op aanwezigheid van toxische stoffen. De assays zijn daarnaast bruikbaar om de kwaliteit van de verschillende stappen van de drinkwaterproductie te screenen, zoals de bronnen en de zuiveringsefficiëntie. De noodzakelijke meetfrequentie zal afhangen van de grilligheid van de waterkwaliteit van de bron.

Suggesties voor *in vitro* assays voor specifieke toxiciteit

genotoxische effecten		Ames (II) Comet, Micronucleus
carcinogene effecten		Intercellular communication (GJIC) DNA microarrays
hormoonverstoring		ER, AR, TR, GR en PR-CALUX (5 typen hormonen) REA, (anti) aromatase, TTR
immunotoxische effecten		NF- κ B CALUX (in ontwikkeling)
neurotoxische effecten		ACHE
antibiotica		Water-SCAN
teratogene effecten, reproductie		EST stamcel
veranderde detoxificatie	fase 1	DR-CALUX
	fase 2	niet relevant
	fase 3	niet relevant

Naast chemische analyses zijn effectgerichte testen nu al waardevol op verschillende plaatsen in de drinkwaterproductie:

- als waarschuwing voor toxische stoffen in het inlaatwater en eindproduct;
- bij het prioriteren van monsters voor een brede en hoogwaardig chemische screening en identificatie;
- bij innovatie en optimalisatie van zuiveringsprocessen;
- voor het bepalen van toxische eigenschappen van aangetoonde stoffen waarover weinig toxicologische informatie beschikbaar is.

Voor de verdere inzet van effectgerichte testen is meer onderzoek nodig, zoals:

- een analyse van de relevantie van de mogelijke specifieke effecten;
- een selectie van een set bioassays voor de relevante effecten;
- het vaststellen van geschikte referentiestoffen voor het ontwerpen van effectgerichte streefwaarden;
- onderzoek naar effectmonitoring in de gehele watercyclus;
- het optimaliseren van de monstervoorbehandeling voor zowel bioassays als chemische analyses;
- het tijdsgéïntegreerd concentreren van (polaire) verontreinigingen met passieve bemonsteraars.

Conclusies

Omdat in drinkwater zeer lage gehalten aan toxische stoffen voorkomen, speelt voor mengseltoxiciteit vooral de dosisadditie (optellen van equivalenten met een bepaalde gifwerking) een rol. Bij een complex mengsel van stoffen in (bronnen van) drinkwater is het ondoenlijk om deze dosisadditie op basis van chemische analyses van afzonderlijke stoffen vast te stellen. Het gesommeerde effect van stoffen met eenzelfde toxisch werkingsmechanisme wel worden vastgesteld, bijvoorbeeld met acute *in vivo* testen met aquatische organismen voor calamiteiten en *in vitro* testen voor specifieke effecten. Effectgerichte streefwaarden moeten worden ontwikkeld om deze testen goed te kunnen interpreteren. Toepassing van effectgerichte testen in combinatie met chemische analyse (screening en identificatie) kan de kwaliteitsborging van drinkwater verder verbeteren.

LITERATUUR

1) Alink G., J. Quik, E. Penders, A. Spengelink, S. Rotteveel, J. Maas en W. Hoogenboezem (2007). Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: a comparison between 1978 and 2005. *Mutat Res* 631(2), pag. 93-100.

- 2) Gezondheidsraad (2001). Onderzoek gezondheidsrisico's stoffen: een gerichtere benadering. Rapport 2001/24.
- 3) Gezondheidsraad (2002). Blootstelling aan combinaties van stoffen: een systematiek voor het beoordelen van gezondheidsrisico's. Rapport 2002/05.
- 4) KWR (2008). Visie op mengseltoxiciteit in drinkwater. BTO-rapport 2008.009.
- 5) Loos R., B. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini en G. Bidoglio (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ Pollut* 157(2), pag. 561-568.
- 6) Mennes W. (2004). Assessment of human health risks for oestrogenic activity detected in water samples, using the ER-CALUX assay. RIVM.
- 7) Pieters M. en W. Könemann (1997). Mengseltoxiciteit: een algemeen overzicht en evaluatie van de veiligheidsfactor van 100 toegepast in het stoffenbeleid. RIVM. Rapport 620110.004.
- 8) Van der Hoek J-P, P. Stoks, M. Mons en D. van der Kooij (2008). Visie op en streefwaarden voor milieuvreemde stoffen in drinkwater. *H₂O* nr. 4, pag. 33-35.
- 9) Van der Linden S., M. Heringa, H. Man, E. Sonneveld, L. Puijker, A. Brouwer en B. van der Burg (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 42, pag. 5814-5820.