



Visie op mengseltoxiciteit in drinkwater

BTO 2008.009
September 2008



Watercycle Research Institute

Visie op mengseltoxiciteit in drinkwater

BTO 2008.009
September 2008

© 2008 KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag 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, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Colofon

Titel

Visie op mengseltoxiciteit in drinkwater

Projectnummer

B111566

Projectmanager

dr. A.P. van Wezel

Opdrachtgever

BTO

Kwaliteitsborger(s)

prof. dr. P. de Voogt, dr. A.P. van Wezel, PBC Chemische Waterkwaliteit

Auteur(s)

dr. R. van der Oost

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Voorwoord

Dit rapport is een product van een tijdelijke samenwerking tussen Waternet (in persoon van dr. Ron van der Oost) en Kiwa Water Research (in persoon van dr. Minne B. Heringa). Bij deze samenwerking is een deel van het BTO onderzoek, namelijk een studie naar hoe de toxicologische risicobeoordeling van het complexe mengsel van stoffen in drinkwater vorm gegeven moet worden, uitgevoerd door Ron van der Oost, in samenspraak met Minne Heringa.

Samenvatting

Met het BTO project Waterkwaliteitsdoelen Q21 willen de drinkwaterbedrijven er voor zorgen dat het drinkwater in Nederland nu en in de toekomst van goede kwaliteit is. Een belangrijk aspect in dit project was een betrouwbare beoordeling van de chemische kwaliteit van het drinkwater. De huidige chemisch analytische methoden kunnen niet het enorme aantal, vaak onbekende, stoffen detecteren dat mogelijk in de bronnen voor de drinkwaterproductie aanwezig is. Daarnaast ontbreken voor veel stoffen publieke toxicologische gegevens om de gezondheidsrisico's mee in te kunnen schatten. Tenslotte is onbekend hoe de mogelijke gecombineerde werking van verschillende stoffen tezamen de totale toxiciteit van het water beïnvloedt. Daarom moet voor een analyse van de risico's van deze complexe mengsels naar alternatieven worden gezocht.

Er zal een strategische aanpak moeten worden ontwikkeld met nieuwe toxicologisch-analytische technieken, zoals deze worden onderzocht in het BTO project Toxicological Assessment. In deze benadering zal het accent meer liggen op de toepassing van effectgerichte testen, en zal meer dan nu rekening worden gehouden met het werkingsmechanisme van een stof. Bij effectgerichte testen (bioassays of bioanalyses) worden organismen of delen van organismen (weefsels of cellen) op gestandaardiseerde wijze blootgesteld aan testmonsters en wordt het biologische of biochemische effect hiervan gemeten. Een bijkomend voordeel van effectgerichte testen is dat de combinatiewerking van de gevonden verontreinigingen in water bij de beoordeling van de resultaten wordt meegenomen.

In dit rapport wordt beschreven hoe mengseltoxiciteit een rol kan spelen bij de bereiding van drinkwater en hoe dit kan worden bestudeerd met behulp van bioassays. Er wordt tevens een visie bepaald over het gebruik van effectgerichte testen bij de beoordeling van de waterkwaliteit, van bron tot kraan.

De mengseltoxiciteit is afhankelijk van de toxische werking van en de mogelijke interacties tussen de stoffen. Allereerst wordt onderscheid gemaakt tussen eenvoudige en complexe mengsels. Alleen als de kwalitatieve en kwantitatieve samenstelling bekend en/of constant is kunnen de gezondheidsrisico's van het mengsel in de praktijk worden getest. Daarnaast is de aard van de combinatiewerking van belang. Stoffen kunnen op vergelijkbare wijze gecombineerde werking vertonen (*similar joint action*) of ze vertonen gecombineerde werking zonder dat er sprake is van overeenkomstig werking (*dissimilar joint action*). Het gecombineerde effect van het mengsel kan beschreven worden door dosis-additie of respons-additie van afzonderlijke stof-effecten en in een aantal gevallen is er sprake van een interactie. Bij een interactie is het gecombineerde effect van het mengsel kleiner of groter dan op grond van additie wordt verondersteld. Omdat de concentraties van stoffen in het drinkwater over het algemeen laag zullen zijn lijkt vooral combinatiewerking van stoffen met een gelijk werkingsmechanisme zonder interactie van belang. Bij deze vorm van mengseltoxiciteit zal sprake zijn van dosis-additie: de concentraties en toxische potenties van alle stoffen bepalen het gecombineerde effect. Bij complexe mengsels is het echter onmogelijk om de toxiciteit nauwkeurig te voorspellen op basis van stofgehalten. In dit document is daarom onderzocht in hoeverre alternatieven kunnen worden gevonden voor de stofgerichte benadering bij de risicoanalyse van complexe mengsels. Onze visie is dat de risico's van mengseltoxiciteit het best kunnen worden geschat met een set relevante effectgerichte testen (algemene toxiciteit en specifieke effecten). De algemene toetsen (Tabel 1) kunnen met name worden toegepast als bioalarmering voor de bronnen van het drinkwater.

Tabel 1: Algemene toxiciteit (*in vivo* en *in vitro*): toepassing bij bioalarmering inlaat water

Effect	Geschikte bioassays
Acute toxiciteit (<i>in vivo</i>)	Microtox Algertest (PAM)
Cytotoxiciteit (<i>in vitro</i>)	apoptose celproliferatie, MTT test
Chronische toxiciteit (<i>in vivo</i>)	vissen watervlooien

De nadruk van dit rapport ligt op een onderzoek naar de mogelijke relevantie van de specifieke toxische effecten voor de drinkwaterkwaliteit. In Tabel 2 zijn de mogelijk relevante effecten aangegeven, samen met de *in vitro* bioassays waarmee deze effecten het best kunnen worden onderzocht.

Tabel 2: Specifieke toxiciteit (*in vitro*): toepassing van bron tot kraan

Genotoxische effecten	Ames II Comet assay, Micronucleus test
Carcinogene effecten	Intercellular communication (GJIC) DNA microarrays
Hormoonverstoring	5 CALUX assays (5 verschillende hormonen) Gist-assay RIKILT, (anti) aromatase assay, TTR test
Immunotoxische effecten	NF-κB CALUX (in ontwikkeling)
Neurotoxische effecten	ACHE assay
Antibiotica test	RIZA bacteriën test
Teratogene effecten, reproductie	EST assay stamcellen
	fase 1 DR-CALUX
Detoxificatie	fase 2 niet relevant
	fase 3 niet relevant

Voor toepassing van bioassays bij de risicoanalyse van mengsels zullen effectgerichte normen of streefwaarden moeten worden opgesteld. Voor de *in vivo* bioassays voor de bronnen wordt aanbevolen de door RIZA voorgestelde normen voor oppervlaktewater over te nemen (schatting van chronische risico's aan de hand van het effect in een acute test bij 20 maal concentreren van het water). Bij de interpretatie van *in vitro* effecten moet rekening worden gehouden met de *in vivo* eigenschappen absorptie, distributie, metabolisme en eliminatie (ADME) van de stoffen die het effect kunnen veroorzaken. Voor de *in vitro* assays wordt voorgesteld om met het concept van equivalenten referentiestof te werken. Er wordt in dit document een opzet gegeven om dergelijke richtwaarden op te stellen aan de hand van de ADI (*Acceptable Daily Intake*) waarden, met aanname van een "worst case" voor ADME. Daarnaast wordt er een voorstel beschreven voor de mogelijke strategie van effectgerichte testen bij de integrale monitoring die voldoet aan de doelstellingen van Q21. Mogelijke toepassingen van de effectgerichte testen bij de drinkwaterbereiding zijn:

- vroege waarschuwing voor onbekende toxische stoffen in het inlaatwater (wordt reeds toegepast bij bioalarmering);

- vroege waarschuwing voor mogelijke gezondheidseffecten op de mens, van bron tot kraan;
- prioritering van monsters die in aanmerking komen voor een uitgebreid en hoogwaardig chemisch analytisch onderzoek;
- controle bij innovatie en optimalisering van het drinkwater zuiveringsproces;
- bepalen toxische eigenschappen van aangetroffen stoffen, waarvoor geen toxicologische informatie beschikbaar is;
- in de toekomst kunnen bioassays mogelijk dienen als pre-screening voor routinematige chemische analyses (als dit kostenbesparend is).

Verder onderzoek zal zich moeten richten op:

- Analyse van de relevantie van mogelijke in vitro effecten
- Onderzoek naar effecten van bron tot kraan
- Onderzoek effectmonitoring in de watercyclus
- Optimaliseren van de monstervoorbehandeling
- Concentreren van verontreinigingen met passieve bemonsteraars
- Toxicogenomics, biosensoren en lab-on a-chip technieken

Inhoud

Voorwoord	1
Samenvatting	3
Inhoud	7
1 Inleiding	9
2 Mengseltoxiciteit	11
2.1 Mengsels	11
2.2 Mengseltoxiciteit	11
2.3 Risicoanalyse van mengsels	14
3 Mengseltoxiciteit en effectgerichte testen	17
4 <i>In vivo</i> testen voor algemene toxiciteit	19
5 <i>In vitro</i> testen voor specifieke toxiciteit	23
5.1 Carcinogene effecten	24
5.2 Hormoonverstoring	26
5.3 Neurotoxische effecten	28
5.4 Immunotoxiciteit	29
5.5 Teratogene effecten en reproductie	29
5.6 Bioactiviteit van geneesmiddelen	30
5.7 Detoxificatie	31
6 Visie op effectgerichte streefwaarden	33
6.1 Eisen aan resultaten van bioassays	33
6.2 Voorstel ontwerp streefwaarden	34
6.3 Problemen en drempels bij effectgerichte streefwaarden	37
7 Discussie en conclusies	39
7.1 Conclusies	39
7.2 Q21: strategie voor een integrale monitoring van drinkwater	40
7.3 Aanbevelingen voor nader onderzoek	42
7.4 Toekomstige ontwikkelingen	43
8 Geraadpleegde deskundigen	45
9 Literatuur	47

1 Inleiding

Met het BTO project Waterkwaliteitsdoelen Q21 willen de Nederlandse drinkwaterbedrijven de kritische aspecten voor de kwaliteit van het drinkwater identificeren en een aanpak formuleren om de hoge kwaliteit van het drinkwater zeker te stellen voor de toekomst. Deze aanpak moet ervoor zorgen dat de kwaliteit van drinkwater aan de hoogste eisen en verwachtingen van de consument voldoet en is gebaseerd op:

- een gedetailleerde kennis over micro-organismen en stoffen in de grondstof die de kwaliteit van het drinkwater kunnen beïnvloeden;
- de kans dat ongewenste componenten bepaalde concentratieniveaus overschrijden in de bronnen voor de drinkwatervoorziening;
- de effecten van de waterbehandeling op de concentratieniveaus in de grondstof;
- de vorming van ongewenste stoffen bij de waterbehandeling;
- de vorming en/of afgifte van ongewenste componenten bij transport, distributie van het leidingwater
- de invloed van de binneninstallatie;
- methoden en strategieën voor de bewaking van de waterkwaliteit.

Natuurlijk moet voor een volledige kwaliteitsbeoordeling en de risicoanalyse van drinkwater niet alleen de chemische maar ook de biologische componenten worden beschouwd. De risicoanalyse van pathogene micro-organismen valt echter buiten het bestek van dit document.

Een van de doelen van Q21 is om een antwoord te vinden op de vragen welke chemische componenten het meest kritisch zijn voor de veiligheid van het drinkwater en of er testmethoden en analysetechnieken beschikbaar zijn voor een snelle en afdoende bepaling van de watersamenstelling. Aangezien het aantal stoffen dat mogelijk in de bronnen voor de drinkwaterproductie aanwezig is enorm groot is (naar schatting meer dan 100.000; Depledge en Fossi, 1994), is het onmogelijk om de eventuele effecten van al deze stoffen te bepalen met uitsluitend chemische analyses. Uit toxicologische evaluaties is bovendien gebleken dat voor zeer veel verbindingen geen of weinig toxiciteitgegevens bekend zijn (Van Genderen en Stoks, 2004; Heringa en Stoks, 2007). Ten slotte kunnen alle afzonderlijke stoffen in het water een gezamenlijk mengseleffect uitoefenen, waarover op dit moment niets bekend is.

Om de waterkwaliteit goed te kunnen bewaken zal daarom een strategische aanpak moeten worden ontwikkeld met nieuwe toxicologisch-analytische technieken, zoals ondermeer is aangegeven in het rapport "Onderzoek gezondheidsrisico's stoffen: een gerichtere benadering" van de Gezondheidsraad (2001) en zoals wordt onderzocht in het BTO project "Toxicological Assessment". In deze strategische benadering ligt het accent enerzijds op de toepassing van effectgerichte testen (bioassays), anderzijds wordt meer dan nu rekening gehouden met het werkingsmechanisme van een stof. Hierin moet ook worden opgenomen hoe het complexe mengsel van stoffen in water toxicologisch beoordeeld moet worden.

Een eerste studie naar het voorkomen van mengseltoxiciteit en methodieken om deze te meten en beoordelen, is verricht binnen het BTO project "Toxicological Assessment". In dit rapport wordt beschreven welke aspecten van mengseltoxiciteit een rol kunnen spelen bij de bereiding van drinkwater en hoe deze effecten kunnen worden bestudeerd met behulp van bioassays. Er wordt tevens een visie bepaald over het gebruik van effectgerichte testen bij de beoordeling van de waterkwaliteit, van bron tot kraan. De conclusies van dit visiedocument kunnen worden opgenomen in de kwaliteitsdoelstellingen van Q21.

Een uitgebreid overzicht van alle aspecten die een rol spelen bij mengseltoxiciteit is beschreven in de rapporten "Mengseltoxiciteit: een algemeen overzicht en evaluatie van de

veiligheidsfactor van 100 toegepast in het stoffenbeleid" door het RIVM (Pieters en Könemann, 1997) en "Blootstelling aan combinaties van stoffen: een systematiek voor het beoordelen van gezondheidsrisico's" door de Gezondheidsraad (2002) en onderzoek van TNO (Jonker et al., 2004, Groten et al., 2001). De meest relevante informatie uit deze rapporten en publicaties is in dit document samengevat. Er wordt beschreven welke aspecten van mengseltoxiciteit een rol kunnen spelen bij de bereiding van drinkwater en hoe deze effecten kunnen worden bestudeerd met behulp van bioassays. Er zal tevens een visie worden bepaald over het gebruik van effectgerichte testen bij de beoordeling van de waterkwaliteit, van bron tot kraan. Bij effectgerichte testen (bioassays of bioanalyses) worden organismen of delen van organismen (weefsels of cellen) op gestandaardiseerde wijze blootgesteld aan testmonsters. Hierbij wordt het gecombineerde effect van meerdere stoffen gescreend met een biologisch eindpunt zonder dat de stofconcentraties bekend zijn. Bioassays kunnen bijdragen tot een betere bewaking van de kwaliteit van de bronnen voor leidingwater, zoals in de nu gebruikte bioalarmering systemen. Een bijkomend voordeel van effectgerichte testen is dat een eventuele combinatiewerking van de gevonden verontreinigingen in water, waarover tot nu toe te weinig bekend is, in de beoordeling van de resultaten wordt meegenomen. Naast een overzicht van relevante toxicologische eindpunten voor de drinkwaterkwaliteit zal ook een voorstel worden gedaan om hiervoor effectgerichte streefwaarden te ontwerpen. De inhoud van dit rapport is gebaseerd op een korte literatuurstudie en een uitgebreide raadpleging van deskundigen op het gebied van toxicologie en/of waterkwaliteitsbeheer in Nederland (zie hoofdstuk 8):

- Gert-Jan de Maagd (V&W);
- Marijke Ferdinandy & Serge Rotteveel (Waterdienst);
- Bram Brouwer (IVM/BDS);
- Martin van den Berg (IRAS);
- Ans Versteegh & Bianca van der Ven (RIVM);
- Nico Vermeulen (VU);
- Ron Hoogenboom & Toine Bovee (RIKILT);
- John Groten (WUR/Organon);
- Edwin Roex, Dick Vethaak & Cor Schipper (Deltares).

2 Mengseltoxiciteit

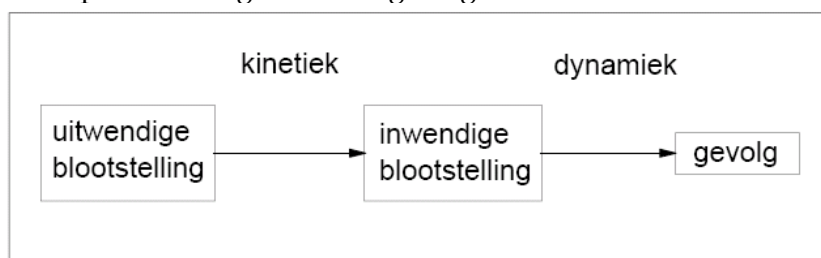
Een uitgebreid overzicht van alle aspecten die een rol spelen bij mengseltoxiciteit is beschreven in de rapporten "Mengseltoxiciteit: een algemeen overzicht en evaluatie van de veiligheidsfactor van 100 toegepast in het stoffenbeleid" door het RIVM (Pieters en Könemann, 1997) en "Blootstelling aan combinaties van stoffen: een systematiek voor het beoordelen van gezondheidsrisico's" door de Gezondheidsraad (2002). Veel experimenteel toxicologisch onderzoek op dit terrein is verricht door TNO (Feron et al., 1995, Groten et al., 2001) in opdracht van VROM en SZW. De meest relevante informatie uit deze rapporten en publicaties is in dit hoofdstuk samengevat.

2.1 Mengsels

Mensen zijn dagelijks blootgesteld aan allerlei omgevingsfactoren die de gezondheid kunnen schaden, zoals stoffen en diverse vormen van straling en geluid. Het samengaan van meerdere vormen van blootstelling kan extra schadelijk voor de gezondheid zijn (Gezondheidsraad, 1988). Hoewel de normering van stoffen geschiedt op basis van informatie van de effecten van afzonderlijke stoffen, is er altijd sprake van blootstelling aan mengsels. Een mengsel is een combinatie van twee of meer stoffen waarvoor het gezamenlijk voorkomen kenmerkend is. Als het om 10 of minder stoffen gaat is er sprake van een simpel mengsel. Voedsel, lucht en (drink)water zijn te beschouwen als zeer complexe mengsels waarvan de samenstellende componenten variëren in aantal, identiteit en concentratie. In tegenstelling tot bekende simpele mengsels, is de precieze samenstelling van complexe mengsels onbekend. Complexe mengsels kunnen uit tientallen tot duizenden stoffen bestaan en kunnen afkomstig zijn uit eenzelfde bron of uit verschillende bronnen. De componenten van mengsels afkomstig uit eenzelfde bron zijn vaak chemisch en toxicologisch aan elkaar verwant.

2.2 Mengseltoxiciteit

De samenstelling van een mengsel, de blootstellingroute (via spijsverteringskanaal, longen of huid), de manier van doseren, de tijdsaspecten (tijd tussen doseringen, dosistempo, duur van de dosering) en de matrix (vast of vloeibaar, lipofiel of hydrofiel) zijn alle bepalend voor de uiteindelijke toxiciteit van een mengsel. Behalve externe factoren (blootstelling aan stoffen) spelen ook interne factoren (zoals hormonale factoren en deficiënties aan vitaminen en mineralen) een belangrijke rol in de toxiciteit van mengsels. Er is dus op alle niveaus sprake van mengsels en mengseleffecten. Het geheel van transport- en omzettingsprocessen bepaalt waar de stof en zijn omzettingsproducten (metaboliëten) in het lichaam terechtkomen en hoe lang ze daar verblijven. Dit noemt men de kinetische fase van de blootstelling en gevolgketen (Figuur 1). De wisselwerking met biochemische en fysiologische processen in de dynamische fase bepaalt vervolgens welke gevolgen dit heeft.



Figuur 1: Schematische weergave van de blootstelling/gevolg keten voor de werking van stoffen op een organisme (Pieters en Könemann, 1997).

Stoffen kunnen voor of na de blootstelling onderling chemische interacties vertonen, die de chemische en fysische eigenschappen van een mengsel veranderen. Daarnaast kan een stof ook door biologische interacties de toxiciteit van een andere stof beïnvloeden. Dat kan omdat de ene stof de toxicokinetiek (absorptie, distributie, metabolisme of excretie) van de andere stof verandert, bijvoorbeeld door het verhogen of verlagen van de activiteit van omzettingsprocessen, competitie voor enzymen of door verandering in de uitscheidingsnelheid. Hierbij wordt dus ingegrepen op de biologische beschikbaarheid van een stof, terwijl de giftigheid (toxische potentie) van deze stof niet verandert. Het uiteindelijke toxische effect wordt daarbij wel veranderd. Een stof kan daarnaast ook ingrijpen op de toxicodynamiek van andere stoffen, en hiermee de toxische potentie van een andere stof veranderen. In geval van carcinogenen is de tumorvorming bijvoorbeeld sterk afhankelijk van de gelijktijdige aanwezigheid van tumorpromotoren (stoffen die de groei van de tumorcellen bevorderen) en co-carcinogenen. Als de toxiciteit van een stof sterk afhankelijk is van de vorming van een bepaalde giftige metabooliet, dan kan de activering of remming (inductie of inhibitie) van bepaalde enzymen leiden tot een veranderde toxiciteit van stoffen. Ook de vorming van omkeerbare of onomkeerbare (reversibele of irreversibele) complexen van een stof met verschillende celcomponenten (zoals enzymen, membraanewitten en nucleïnezuuren) kan de toxiciteit beïnvloeden van stoffen die aan dezelfde celcomponenten moeten binden om een effect te veroorzaken. Daarnaast is het mogelijk dat stoffen via radicaalvorming de oxidatie van andere stoffen beïnvloeden of dat veranderingen in bijvoorbeeld de redox potentiaal of de pH bijdragen aan veranderde toxiciteit. De combinatietoxiciteit kan eveneens een gevolg zijn van een verlaagde concentratie (depletie) van co-factoren van belangrijke enzymen.

Het is bij mengseltoxiciteit van groot belang of er interactie is tussen de verschillende stoffen. Duidelijke kaders voor de combinatiewerkingen tussen stoffen werden gegeven door Plackett en Hewlett (1952), die de volgende begrippen hanteerden:

- *Selectieve werking van een stof.* Een stof veroorzaakt een respons in een bepaald fysiologisch systeem van een organisme (de '*site of action*').
- *Interactie.* Er is sprake van interactie als het effect van het mengsel significant afwijkt van het effect dat op basis van de effecten van de afzonderlijke stoffen kan worden voorspeld.
- *Gelijke werking.* Twee stoffen hebben een gelijke werking als beiden eenzelfde fysiologisch systeem op een vergelijkbare manier beïnvloeden.

De mengseltoxiciteit van stoffen werd door Plackett en Hewlett onderscheiden in vier typen combinatiewerkingen, op basis van het werkingsmechanisme (Tabel 1). Het systeem berust op het al dan niet bestaan van overeenkomsten in toxisch effect en het al dan niet optreden van interactie. Hoewel dit schema ogenschijnlijk helder is, is het een weergave van uitersten. Vaak zullen mechanismen gedeeltelijk vergelijkbaar zijn en ook interactie kan in verschillende gradaties optreden. Het schema is bovendien beperkt in de verdere uitwerking omdat alleen de situaties waarin de stoffen geen interactie vertonen verder zijn uitgewerkt.

Tabel 1: Typeringen voor combinatiewerkingen (Plackett & Hewlett, 1952)

	Interactie	Geen interactie
Gelijke werking	Complex vergelijkbaar (<i>complex similar</i>)	Simpel vergelijkbaar (<i>similar joint action</i>) Dosis additie
Verschillende werking	Afhankelijk (<i>dependent</i>)	Onafhankelijk (<i>dissimilar joint action</i>) Respons additie

Deze indeling wordt gehanteerd in de rapporten van het RIVM (1997) en de Gezondheidsraad (2002), maar in meer recente literatuur worden meestal de alleen de begrippen dosis-additie, respons-additie en interactie gehanteerd (Jonker et al., 2004). Bij de simpel vergelijkbare combinatie spreekt men over dosis-additie of concentratie-additie. De aanname die aan dosis-additie ten grondslag ligt is dat stoffen op een vergelijkbare wijze op eenzelfde biologisch systeem werken. Bij dosis-additie is theoretisch het totale effect gelijk aan concentratie maal de toxische potentie van een stof, gesommeerd over alle stoffen in het mengsel. Bij vergelijkbare maar niet-identieke werkingsmechanismen kan mogelijk partiële dosis-additie optreden. Dosis-additie kan theoretisch gezien voorkomen bij alle dosisniveaus. Als er dosis-additie optreedt kunnen stoffen bij doseringen die afzonderlijk niet tot effecten leiden, in een mengsel wel toxisch zijn (Rajapakse et al., 2002, Groten et al., 2001)!

Bij de onafhankelijke combinatie spreekt men over respons-additie (of effect-additie). Respons-additie, een sommatie van de effecten van de afzonderlijke stoffen, is gebaseerd op de aanname dat de stoffen op geheel verschillende fysiologische systemen werken dan wel functioneel onafhankelijk op hetzelfde systeem. De afzonderlijke stoffen werken over het algemeen respons-additief bij concentraties waarbij ze op zichzelf al een effect bewerkstelligen.

Het grote verschil tussen deze twee concepten is dat bij de dosis-additie concentraties onder de NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) bij kunnen dragen aan de toxiciteit van het mengsel, terwijl deze mogelijkheid bij respons-additie minder waarschijnlijk is.

Als de effecten van mengsels van stoffen niet met de dosis-additieve of respons-additieve concepten te beschrijven zijn is er sprake van interactie. Bij interactie zullen twee stoffen elkaars concentratie in het lichaam vergroten of verkleinen, dan wel elkaars effect versterken of verzwakken, of beide doen (Plackett en Hewlett, 1952). Bij een significante versterking van het effect wordt gesproken over synergisme, terwijl een significante verzwakking van het effect antagonisme wordt genoemd. Het is opvallend dat interacties tussen stoffen in het algemeen worden waargenomen in het hoge-dosisgebied, waarbij de afzonderlijke stoffen al tot effecten leiden. Een verklaring hiervoor is dat interacties van stoffen vaak optreden doordat toxicokinetische en toxicodynamische processen verzadigd zijn. Het is daarom aannemelijk dat bij lage doseringen geen interacties zullen plaatsvinden. Hoewel er hiervoor voldoende indirect bewijs is, is het echter wetenschappelijk onmogelijk om de afwezigheid van interacties bij lage doseringen aan te tonen, simpelweg omdat er in dit gebied geen meetbare effecten zijn (Pieters en Könemann, 1997).

Samenvattend kunnen op basis van de wetenschappelijke literatuur (o.a. Jonker et al., 2004; Groten et al., 2001; Feron et al., 1995), die is samengavat in diverse rapporten (o.a. Pieters en Könemann, 1997; US EPA, 1986 en 1999) de volgende aannamen worden gemaakt over mengseltoxiciteit:

- Interacties (synergisme en antagonisme) zijn moeilijk aantoonbaar bij doseringen rond de NOAEC;
- Respons-additie is onder het niveau van de laagste respons van de stoffen moeilijk aantoonbaar;
- Dosis-additie en partiële dosis-additie zijn van meer belang, zelfs bij doseringen ver onder de norm.

Uit een analyse van 85 studies met vissen door de EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission) bleek dat in 87% van de gevallen mengseltoxiciteit kon worden verklaard op grond van dosis-additie (veelal acute toxiciteit door narcotische werking van organische stoffen). Omdat stoffen in het drinkwater over het algemeen in zeer lage concentraties voorkomen is het niet waarschijnlijk dat er hierbij interacties tussen stoffen te verwachten zijn.

Daarom zal voor de mengseltoxiciteit in drinkwater vooral de dosis-additie (en in mindere mate respons-additie) van belang zijn, tenzij sprake is van calamiteiten.

2.3 Risicoanalyse van mengsels

Om de schadelijke gevolgen van stoffen, straling, etc. te voorkomen of te beperken, neemt de overheid verscheidene maatregelen, waaronder het stellen van normen. Daaraan vooraf gaat een preventieve risicobeoordeling waarin alle relevante risicofactoren afzonderlijk worden gezien. Eigenlijk zouden alle ziekteoorzaken op een rij moeten worden gezet en zou van elk de bijdrage aan de totale ziektelast moeten worden bepaald. Door gebrekkig inzicht in de oorzaken van veel ziekten is dit echter niet mogelijk. Enerzijds dragen veroorzakers van ziekten vaak bij aan het ontstaan van verscheidene ziekten, anderzijds kan een bepaalde ziekte meestal verschillende oorzaken hebben (Rothman, 1976). Ondanks al het uitgevoerde onderzoek naar de toxiciteit van mengsels, is het niet mogelijk om op wetenschappelijke gronden algemene stelregels voor combinatietoxiciteit af te leiden en een (constante) veiligheidsfactor mee te nemen in de risicoanalyse. Ten eerste omdat een grondige kennis van de werkingsmechanismen nodig is, die voor de meeste stoffen ontbreekt. Ten tweede omdat kwantificering van combinatiewerkingen in mengselexperimenten in het algemeen onmogelijk is. Ten derde omdat door de grote variatie in samenstellingen van mengsels een algemene, universeel toepasbare, beleidsregel niet te formuleren is. In de praktijk van het beleid beperkt men zich daarom noodgedwongen tot het schatten van het effect van één stof (of andere determinant) waarvan men aanneemt dat zij een dominerende rol speelt en waarbij men de effecten van de andere factoren ziet als (onschuldige) achtergrond.

In de laatste decennia is het inzicht in de mechanismen die een rol spelen bij combinatiewerking van stoffen aanzienlijk toegenomen (Groten et al., 2001; Jonker et al., 2004). Toch ontbreekt het nog steeds aan voldoende mogelijkheden om combinatiewerkingen in getallen uit te drukken. Het is duidelijk dat het grote aantal stoffen en werkingsmechanismen en de grote verscheidenheid aan mogelijke interacties een ernstige beperking zijn voor het opstellen van algemene stelregels voor de combinatiewerking van stoffen. Daarnaast maakt het feit dat een stof vaak meerdere toxische eindpunten heeft het moeilijk om een algemene uitspraak over de combinatiewerking te doen. Dit geldt zelfs voor het combineren van dezelfde set stoffen die in het ene orgaan kan leiden tot een toename van de toxiciteit en in een ander orgaan tot een afname van de toxiciteit. Ondanks deze complexe situatie zijn er toch enkele strategieën ontwikkeld ten behoeve van zowel de actuele risicoschatting als de preventieve risicoschatting (normstelling).

Bij de actuele risicoschatting gaat het om een specifieke blootstellingsituatie waarbij eerst de blootstelling aan stoffen gekarakteriseerd moet worden. Dit betekent zowel de identificatie van de stoffen in het mengsel als het inschatten van de blootstellingsniveaus en het vaststellen van de voor de mens relevante blootstellingroute. Deze nader gekarakteriseerde blootstelling wordt vervolgens gerelateerd aan de bij de mens te verwachten gezondheidseffecten. Met behulp van deskundige beoordeling (*expert judgement*) kan een voorzichtige (kwalitatieve) uitspraak worden gedaan over de te verwachten gezondheidsrisico's na blootstelling aan het mengsel. De US EPA heeft een aantal mogelijke werkwijzen voor de risico evaluatie van chemische mengsels samengevat in *guidance documents* (o.a. US EPA, 1986 en 1999). Deze risicoschatting kan worden uitgevoerd op basis van individuele stofbenadering (*bottom up approach*) of door het mengsel als geheel te behandelen met een effectgerichte benadering (*top down approach*). Welke benadering het beste past is afhankelijk van de blootstellingsituatie en het type en de samenstelling van het mengsel. Samengevat zijn er een aantal mogelijkheden:

- dosis-additiviteit van individuele stoffen in het mengsel (bv *hazard index* benadering);

- aanname van een constante mengselcompositie (een complex mengsel beschouwen als 1 stof);
- schatting aan de hand van vergelijkbare mengsels;
- de weegfactor benadering, waarin additie en interactie worden gecombineerd (*weight of evidence approach*).

Met de laatste methode kunnen de mogelijke risico's worden gekwantificeerd door middel van een met dosis-additie bepaalde gevaar indicator (*hazard index*), gecorrigeerd met een onzekerheidsfactor en een weegfactor (Mumtaz en Durkin, 1992). Bij deze risicoschattingen wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van beschikbare toxicologische informatie over het betreffende mengsel, vergelijkbare mengsels, de afzonderlijke stoffen en binaire mengsels hiervan (Pieters en Könemann, 1997). De *weight of evidence* benadering kan worden gezien als een documentatie van het *expert judgement* proces bij de risicoschatting van mengsels, waarbij de mate van onzekerheid van de schatting wordt aangegeven voor elke stof interactie.

Tegenover de actuele risicoschatting staat de preventieve risicoschatting, de normstelling. In dit geval gaat het niet om specifieke blootstellingsituaties, maar om de regulatie van blootstelling aan stoffen in het algemeen. Binnen de normstellingprocedure is het gebruikelijk om extrapolatiemethoden toe te passen om een 'veilig' blootstellingsniveau vast te kunnen stellen. Bij de benaderingen die in de normstelling van stoffen wordt gehanteerd ontbreken logischerwijs dan ook de verfijningen die, op basis van inzicht in de samenstelling en de aard van het mengsel en kennis van werkingsmechanismen, in de actuele risicoschatting wel kunnen worden aangebracht. Er zijn twee benaderingen voor normstelling van mengsels:

1. Normstelling voor het totale mengsel op basis van dosis-additiviteit.

Bij deze methode wordt vaak gewerkt met zogenaamde *toxic units* (TU, toxiciteit eenheden), waarbij de waargenomen concentratie wordt gedeeld door de concentratie waarbij een bepaald effect optreedt, bijvoorbeeld de *lowest observed effect concentration* (LOEC). Hetzelfde concept wordt onder de naam *hazard index* (HI) gehanteerd als hulpmiddel voor het snel in kaart brengen van de toxische potentie van een mengsel van stoffen (US EPA, 1986). De HI wordt berekend door de actuele blootstelling (*actual exposure*; AE) te delen door een acceptabel niveau voor blootstelling (*acceptable daily intake* [ADI], *Tolerable daily intake* [TDI], *maximum allowable concentration* [MAC], maximaal toelaatbaar risico [MTR], etc.). De HI van een mengsel kan worden berekend door de HI's van alle geïdentificeerde componenten (HI_{ind}) te sommeren (bijvoorbeeld $HI_{meng} = \sum HI_{ind} = \sum AE / ADI$). De norm voor het mengsel zal hier dus $HI_{meng} = 1$ zijn. Bij een $HI_{meng} > 1$ wordt, uitgaande van dosis-additiviteit, de betreffende limietwaarde door het mengsel overschreden. Met deze methoden is het mogelijk om mengsels met bekende samenstelling te prioriteren voor te nemen beleidsacties.

Als dosis-additiviteit wordt toegepast op een groep van stoffen met een vergelijkbaar toxisch werkingsmechanisme kan het zogenaamde TEF-principe (Toxische Equivalentie Factoren) worden toegepast, dat met name gebruikt wordt voor mengsels van dioxinen, dibenzofuranen en planaire PCB's (Safe, 1990). De TEF is de relatieve potentie van een stof om een bepaald toxisch effect te bewerkstelligen ten opzichte van een referentiestof waarvan de toxiciteit goed gekarakteriseerd is. Bij kwantificering van de toxiciteit worden de concentraties van de individuele stoffen in een mengsel vermenigvuldigd met hun TEF's en deze producten worden opgeteld om de toxiciteit van het totale mengsel uit te drukken in TEQ's (Toxische Equivalenten) van de referentiestof. Bij de dioxine-achtige toxiciteit wordt de TEQ bepaald als equivalenten van de meest giftige component 2378-TCDD (2,3,7,8-tetrachloor dibenzodioxine). Ook voor andere stoffen, zoals PAK's en chloorfenolen, zijn dergelijke groepsnormen afgeleid (Vermeire et al., 1991).

2. Normstelling voor afzonderlijke stoffen met gebruik van een veiligheidsfactor.

Een andere manier om met mengseltoxiciteit om te gaan is de toepassing van een veiligheidsfactor (of onzekerheidsfactor) op de normen van de enkelvoudige stoffen, in verband met combinatiewerkingen met andere stoffen. Door het ministerie van VROM wordt een factor 100 toegepast om te corrigeren voor mengseltoxiciteit (Pieters en Könemann, 1997). Een veiligheidsfactor is een zeer pragmatische methode om de consequenties van dosis-additiviteit te vertalen in de normstelling voor individuele stoffen. Er kan worden gesteld dat hoe meer algemeen toepasbaar een vuistregel dient te zijn, des te minder deze door wetenschappelijke argumenten te onderbouwen is. Met behulp van een *worst case* benadering op basis van MTR waarden heeft het RIVM berekend dat een veiligheidsfactor van 100 voor alle geteste stofgroepen ruim voldoende is. De hoogst waargenomen overschrijding van 19.6 maal de MTR werd gevonden voor organofosfaten, terwijl de overschrijding voor alle overige stofgroepen onder de 10 lag. Deze *worst case* benadering bevatte zoveel grove aannames dat het te verwachten is dat de werkelijke overschrijdingen van de MTR een stuk lager zullen zijn dan is berekend (Pieters en Könemann, 1997). De extra factor 100 voor mengseltoxiciteit dekt de mogelijke overschrijdingen van de norm door mengsels dus ruim. Ook de National Academy of Sciences (NAS) in de Verenigde Staten heeft het gebruik van een onzekerheidsfactor (UF, *uncertainty factor*) voor combinatietoxiciteit, variërend tussen 1 en 100, aanbevolen (NAS, 1989). De toepassing van een veiligheidsfactor of onzekerheidsfactor zal leiden tot grotere waarden van de 'gecorrigeerde' individuele hazard index ($HI_{ind-cor} = UF * HI_{ind}$) en dus tot lagere individuele normen (bijvoorbeeld ADIs). Er moet bij deze benadering voor worden gewaakt dat de normen door de simpele methodiek niet onnodig laag worden, tegen mogelijk hoge maatschappelijke kosten.

3 Mengseltoxiciteit en effectgerichte testen

Drinkwater kan worden beschouwd als een complex mengsel (Groten et al., 2001) en in hoofdstuk 2 is aangegeven dat het met een stofgerichte benadering vrijwel onmogelijk is om de gezondheidsrisico's van dergelijke mengsels te kunnen schatten. De belangrijkste argumenten hiervoor zijn:

- de exacte samenstelling van een complex mengsel is vrijwel niet te analyseren;
- voor de meeste stoffen is onvoldoende informatie aanwezig over de toxiciteit;
- voor de meeste stoffen is er onvoldoende kennis over werkingsmechanismen;
- het is onmogelijk om alle combinatiewerkingen van een complex mengsel in kaart te brengen;

Het is, kortom, niet mogelijk om een algemeen geldende, wetenschappelijk onderbouwde, stofgerichte risicoanalyse voor de toxiciteit van complexe mengsels te ontwikkelen. Omdat in de verschillende milieucompartimenten (water, lucht en bodem) ruim 100.000 verschillende stoffen voor kunnen komen (Depledge en Fossi, 1994) worden deze beschouwd als complexe mengsels. Bij de drinkwaterproductie hebben we ook te maken met complexe mengsels van stoffen, aangezien grondwater en oppervlaktewater als bronnen worden gebruikt. Omdat een betrouwbare stofgerichte analyse van de mengseltoxiciteit in deze gevallen dus vrijwel onmogelijk is zal naar een alternatieve methode moeten worden gezocht.

Een meer pragmatische benadering om de mogelijke risico's van complexe mengsels te analyseren is het meten van toxiciteit van het gehele mengsel door gebruik te maken van effectgerichte testen (bioassays). Een bioassay is een techniek waarmee biologische effecten van giftige verontreinigende stoffen zichtbaar gemaakt kunnen worden. In de US EPA richtlijnen wordt aangeraden om toxiciteitgegevens uit chronische dierstudies of gegevens over humane effecten toe te passen bij de risicoschatting van bekende mengsels met vergelijkbare samenstelling (US EPA, 1986). Om bij deze aanpak te bepalen in hoeverre mengsels vergelijkbaar zijn kan hun relatieve toxische potentie worden bepaald met korte *in vivo* en *in vitro* testen (Lewtas, 1985; Schoeny en Margosches, 1989). Deze effectgerichte benadering kan echter ook worden toegepast om de toxiciteit van onbekende complexe mengsels vast te stellen. Bioassays zijn bijvoorbeeld met succes toegepast bij de detectie van gecombineerde werking van mengsels van mycotoxines voor het aantonen van schimmel contaminatie op mout producten (Tajima et al., 2002). De bioassay waarin de gecombineerde werking werd uitgelezen bleek niet alleen sneller, maar ook gevoeliger te zijn dan chemische analyse van de individuele stoffen. Bij een biologische analyse van effecten als gevolg van blootstelling aan het gehele (complexe) mengsel worden immers ook combinatiewerkingen en dosis-additie meegenomen. Het nut van effectgerichte monitoring bij de analyse van milieurisico's is al eerder aangetoond (Van der Oost et al., 2003). RIZA en RIKZ hebben een batterij snelle bioassays vergeleken met de chemische analyse van de 33 prioritaire stoffen van de KRW. Het blijkt dat alleen ongeveer 50% van de waargenomen effecten kunnen worden verklaard met deze 33 KRW-P stoffen en dat de andere helft wordt veroorzaakt door niet geanalyseerde (onbekende) stoffen (Maas en Van den Heuvel, 2005). Hiermee wordt het nut van het gebruik van bioassays duidelijk aangetoond.

In een bioassay (of bioanalyse) worden levende organismen of delen van organismen (weefsels of cellen) op gestandaardiseerde wijze blootgesteld aan testmonsters. Effecten die geregistreerd worden, de zogenaamde eindpunten, worden vergeleken met eindpunten uit controletesten.

Bij effectgerichte testen wordt onderscheid gemaakt tussen *in vivo* bioassays en *in vitro* bioassays. Het onderscheid tussen *in vivo* en *in vitro* testen, breedspectrum of werkingspecifiek, is echter niet altijd eenduidig. Zo kan een test met eencelligen (bacteriën en algen) onder beide categorieën worden geschaard. In dit visiedocument zal het onderscheid worden gemaakt op grond van de gemeten effecten: *in vivo* assays voor de algemene toxiciteit (breedspectrum effecten) of *in vitro* assays voor de specifieke toxiciteit (gebaseerd op een werkingsmechanisme). Een meer uitgebreid overzicht over de mogelijkheden en beperkingen van bioassays is te vinden in het RIZA/RIKZ rapport "Normstelling voor bioassays" (Maas et al., 2003).

In de volgende hoofdstukken zal worden beargumenteerd welke bioassays het meest relevant zijn om de risico's van mengseltoxiciteit in water te analyseren. Naast literatuurstudie zijn er interviews gehouden met Nederlandse deskundigen van diverse instanties (ministerie van V&W, Deltaris, Waterdienst, IVM, IRAS, RIVM, VU, RIKILT, WUR, BDS en Organon). Omdat er door de bioalarmering systemen in de drinkwatersector al veel kennis is over *in vivo* bioassays (die ook in Waterkwaliteitsdoelen Q21 zijn beschreven), lag het accent van de gesprekken op de samenstelling van een batterij relevante *in vitro* bioassays, waarmee het overgrote deel van de mogelijk aanwezige gifstoffen wordt afgedekt. Alle deskundigen waarmee gesproken is waren het eens met het principe dat mengseltoxiciteit in complexe mengsels goed kan worden bestudeerd met effectgerichte onderzoeksmethoden.

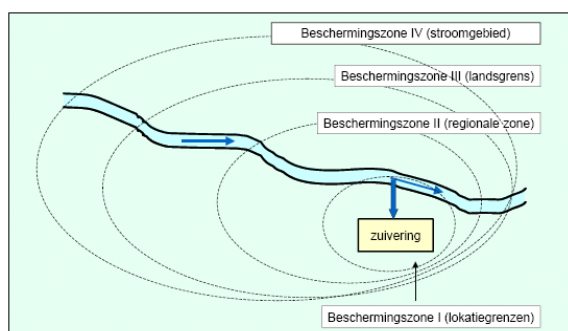
4 *In vivo* testen voor algemene toxiciteit

In vivo bioassays zijn proeven waarin levende, complete organismen (inclusief bacteriën) worden blootgesteld aan een testmonster, zoals water, bodem, effluënten of extracten daarvan (Maas, 2003). Deze testen kunnen worden uitgevoerd op het laboratorium of in de veldsituatie (*in situ*). Als de proeven kortdurend zijn (een uur tot enkele dagen) kunnen hiermee acute effecten worden vastgesteld. Acute testen zijn bedoeld voor een eerste screening, kortdurend en met grove effecten (sterfte of activiteit). Acute testen staan voor een realistische *worst case* situatie (calamiteit): een kortdurende blootstelling aan relatief hoge concentraties van verontreinigende stoffen. Met langer durende proeven (dagen tot maanden) kunnen ook chronische effecten worden bepaald. De bedoeling van chronische testen is om de werkelijke situatie beter te benaderen: een langdurige blootstelling (een substantieel deel van de levensduur van het testorganisme) aan lagere concentraties. Eindpunten van de chronische assays zijn bijvoorbeeld gedrag, groei en reproductie van de testorganismen. Chronische testen zijn over het algemeen gevoeliger, maar ook een stuk duurder dan acute testen. Als er geen toxiciteit detecteerbaar is in het water maar het, bijvoorbeeld voor een trendanalyse, nodig is een toxiciteitsniveau aan te tonen, dan is het mogelijk om de acute toxiciteit in concentraten van het water te meten. Concentratie is ook een geschikte methode om met een acute bioassay de risico's van chronische toxiciteit te schatten. Hierbij moet wel in het oog worden gehouden dat niet alle stoffen in vergelijkbare mate te concentreren zijn, zodat de samenstelling van het testmengsel zal veranderen.

De *in vivo* bioassay is over het algemeen een breedspectrum bioassay, met als voordeel dat hiermee de meest ingrijpende nadelige effecten van het complexe mengsel (zoals sterfte en afname van groei of reproductie) worden aangetoond. Bovendien wordt ook de invloed van toxicokinetiek (opname, distributie, metabolisme en uitscheiding) op het effect meegenomen. Een nadeel van vooral de acute testen is echter dat de gevoeligheid in het algemeen niet hoog is. De gevoeligheid van de meeste acute bioassays is lager dan de zogenaamde TTC waarde (*Threshold of Toxicological Concern*) van afzonderlijke stoffen. De TTC waarde is echter niet alleen op toxicologische gronden gebaseerd (veel stoffen zijn pas toxisch bij veel hogere concentraties), maar ook op esthetische gronden. Daarnaast worden met de bioassays geen individuele stoffen, maar complexe mengsels getoetst. Op grond van de gevoeligheid wordt aanbevolen om de acute toetsen in eerste aanleg toe te passen om de kwaliteit van het water te monitoren waarin de hoogste concentraties stoffen worden verwacht. Bij de drinkwaterbereiding zullen de *in vivo* toetsen dus interessant zijn bij de monitoring van de inlaatstations van oppervlaktewater of grondwater. Voor een algemene kwaliteitsbeoordeling wordt vaak een batterij van testen ingezet met meer soorten uit verschillende taxonomische groepen (met producenten, consumenten en predatoren).

De *in vivo* testen worden nu al ingezet als bioalarmering voor het oppervlaktewater of grondwater dat wordt ingenomen voor de drinkwaterproductie (De Hoogh et al., 2006). In de Kaderrichtlijn Water (KRW) is vastgelegd dat er hogere eisen worden gesteld aan het water in drinkwaterwingebieden. In dit kader wordt gesproken over beschermingszones voor de winning van het grondwater en/of oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor de drinkwaterbereiding. Een beschermingszone voor het oppervlaktewater is een afgebakend gebied waarbinnen maatregelen worden genomen om de winning van water voor de bereiding van drinkwater te kunnen waarborgen. Voor oppervlaktewateren wordt in de KRW onderscheid gemaakt tussen vier niveaus van beschermingszones (Figuur 2):

- I: lokaal niveau direct rondom het fysieke innamepunt en de zuivering;
- II: regionaal niveau, begrensd op basis van een protocol dat uitgaat van een reactietijd;
- III: nationaal niveau met afspraken over wateren met functie drinkwater;
- IV: stroomgebiedniveau met internationale afspraken voor bijvoorbeeld de Rijn en de Maas.



Figuur 2: onderscheid tussen verschillende niveaus van beschermingszones voor de drinkwaterbereiding.

Bij de meeste Nederlandse drinkwaterbedrijven die het oppervlaktewater als bron gebruiken wordt op dit moment al een effectgerichte on-line monitoring met *in vivo* bioassays als bioalarmering toegepast in beschermingszone I, het water dat wordt ingelaten voor de drinkwaterbereiding. Indien met een van de testen uit de bioalarmering een effect wordt waargenomen kan dit een reden zijn om de inname van water tijdelijk te staken. Het is wenselijk om de effectgerichte monitoring in de toekomst uit te breiden tot meerdere beschermingszones in het oppervlaktewater. De voordelen hiervan zijn dat de negatieve effecten op de ecologische toestand van de watersystemen beter in kaart worden gebracht en dat de mogelijke bronnen die verantwoordelijk zijn voor een effect in de drinkwater bioalarmering in een vroeg stadium kunnen worden opgespoord.

De testorganismen (met eindpunten) die het meest worden gebruikt bij bioalarmeringsystemen zijn:

- luminescerende bacteriën (lichtuitstraling);
- algen (groeisnelheid)
- watervlooien (overleving en mobiliteit)
- mosselen (openen/sluiten van schelp)
- vissen (gedrag en beweging)

Een aanvullende test voor de bioalarmering zou een *in vitro* tox analyse kunnen zijn waarbij de ontregelde celgroei en/of toxiciteit wordt gemeten, die heel gevoelig kan worden bepaald met celkweek assays, bijvoorbeeld door het vaststellen van apoptose (geprogrammeerde celdood) en/of celproliferatie (John Groten, WUR/Organon). Bij een groot aantal andere *in vitro* bioassays wordt ook op cytotoxiciteit gecontroleerd als een van de randvoorwaarden bij de kwaliteitscontrole. Omdat de *in vitro* bioassays in het algemeen sneller en goedkoper zijn dan de *in vivo* assays is het interessant om te onderzoeken of één van de *in vivo* assays in de bioalarmering door een *in vitro* assay kan worden vervangen. Dit zal echter alleen relevant zijn als er een continu online systeem (of biosensor) kan worden ontwikkeld, want de huidige *in vitro* assays gaan batch-gewijs. Met de *in vivo* assays kunnen ook combinatiewerkingen van stoffen (synergisme) worden aangetoond. Alle deskundigen die voor deze studie werden geraadpleegd waren van mening dat de *in vivo* bioassays het meest relevant zijn bij de beoordeling van de kwaliteit van het water van de bronnen. Recent is er in de Maas een calamiteit geweest die met de daphnia test (watervlooien) van de bioalarmering werd

aangetoond. Bij nader onderzoek kon de toxiciteit worden verklaard door verhoogde concentraties pesticiden. Omdat deze stoffen aanvankelijk niet werden aangetoond met de chemisch analytische screening is dit geval een goed voorbeeld van de noodzaak van het toepassen van effectgerichte monitoring van onbekende mengsels.

5 *In vitro* testen voor specifieke toxiciteit

In vitro bioassays zijn laboratoriumproeven waarin gebruik gemaakt wordt van geprepareerde cellen of subcellulaire fracties die geïsoleerd zijn uit organismen of van gemodificeerde bacteriën (Maas, 2003). De assays zijn meestal werkingspecifiek, kortdurend (enkele minuten tot dagen), snel uitvoerbaar en kleinschalig. *In vitro* assays zijn testen die reageren op interacties tussen stoffen en een of meer specifieke biologische aangrijpingspunten of receptoren, behorend bij een specifiek mechanisme van toxiciteit. Het nadeel van deze assays is dus dat ze niet alle effecten van de in het mengsel aanwezige stoffen detecteren. Het grote voordeel is echter dat ze snel en zeer gevoelig (soms in de orde van picogrammen) de gesommeerde toxiciteit van een groep van stoffen met een gelijk werkingsmechanisme bepalen. Daarnaast kunnen hiermee effecten gemeten worden, die door assays voor algemene toxiciteit niet gedetecteerd worden (bijvoorbeeld hormoonverstoring en genotoxiciteit). Dit is vooral belangrijk bij de toepassing in de verschillende stappen van de drinkwaterbereiding (van bron tot kraan), omdat we daar in het algemeen met zeer lage stofgehalten te maken hebben. Met de specifieke *in vitro* bioassays wordt in principe vooral de dosis-additie van alle in het mengsel aanwezige werkzame verbindingen op een bepaald effect geanalyseerd.

De keuze voor bepaalde *in vitro* bioassays wordt ingegeven door de vraag welke toxische effecten afgedekt dienen te worden. Omdat het voor de drinkwaterbereiding van belang is dat alle stoffen die giftig zijn voor de mens worden aangetoond, moet een zo breed mogelijk spectrum aan relevante werkingsmechanismen worden onderzocht. De relevantie wordt in eerste aanleg bepaald door na te gaan of de stoffen die een bepaalde werking hebben in het drinkwater voor kunnen komen. Het is daarbij van belang of de stoffen voorkomen in de bronnen of dat ze kunnen ontstaan tijdens het zuiveringsproces (desinfectie). Daarnaast zullen de concentraties in de bron en de stofeigenschappen (wateroplosbaarheid, polariteit) bepalend zijn voor de kans dat een stof de zuivering kan passeren en of de mogelijke gehalten in het reinwater schadelijk kunnen zijn voor de mens. Op grond van een eerste inventarisatie op basis van humane risico's zijn, in overleg met de geraadpleegde deskundigen, de volgende toxische werkingen in dit onderzoek meegenomen:

- carcinogene effecten: genotoxisch en niet-genotoxisch (o.a. dioxine-achtige toxiciteit);
- hormoonverstoring;
- neurotoxische effecten;
- immunotoxische effecten;
- teratogene effecten en reproductie;
- bioactiviteit van geneesmiddelen.

Als aanvulling op de effectgerichte testen kunnen ook de invloeden op ontgiftingsmechanismen worden onderzocht, die indicatief kunnen zijn voor de blootstelling aan specifieke stofgroepen:

- fase 1: metabolisme;
- fase 2: conjugaties;
- fase 3: excretie (*multi xenobiotic resistance*).

Het lijkt verstandig om de selectie van bioassays aan te laten sluiten bij de REACH criteria voor chemicaliën en de eisen die worden gesteld aan nieuwe geneesmiddelen (Bram Brouwer, IVM/BDS). Het accent ligt hierbij op carcinogeniteit (genotoxisch en niet genotoxisch), hormoonverstoring en reproductie toxiciteit (met name teratogene effecten). In een vroege fase

van ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen wordt bij Organon een serie van *in vitro* testen gebruikt om de potentie (*hazard*) van verschillende stoffen te *screenen*. Deze testen zijn snel in gebruik en geven geen 100% vangnet, maar zijn een uitstekend middel om analoge stoffen onderling te vergelijken en te ranken. Een aantal van deze toetsen zijn bruikbaar om de mengseltoxiciteit in drinkwater te testen (John Groten, WUR/Organon). In verband met de mogelijke risico's op de vorming van resistente bacteriën is het belangrijk om onderzoek te doen naar de aanwezigheid van antibiotica bioactiviteit in het water.

Om te onderzoeken of een effect relevant is voor de drinkwaterbedrijven zullen er vier belangrijke vragen moeten worden beantwoord:

1. Zijn er mengsels van stoffen in de bronnen aanwezig, of is er reden om aan te nemen dat deze stoffen in de bronnen aanwezig kunnen zijn, die een dergelijk effect kunnen veroorzaken?
2. Is er een reële kans dat deze stoffen de zuivering kunnen passeren en dus in het drinkwater terecht kunnen komen?
3. In welke mate worden dergelijke stoffen vanuit het drinkwater opgenomen, verdeeld, omgezet en uitgescheiden door de mens?
4. Kan de verwachte blootstelling bij de mens via het drinkwater hoog genoeg zijn om het betreffende effect te veroorzaken?

Voor het beantwoorden van al deze vragen zal in de meeste gevallen nader onderzoek nodig zijn. Bij het schatten van de relevantie van effecten moet ook rekening worden gehouden met het deel van de toxische stoffen dat daadwerkelijk terechtkomt bij de doelorganen in het lichaam (vraag 3). De opnameroute, via het maagdarmkanaal, de huid of de longen (bijvoorbeeld bij douchen) is hierbij van belang. Omdat in drinkwater over het algemeen goed wateroplosbare stoffen voorkomen zal de orale stofopname in het algemeen efficiënt zijn. PAK's zijn bij opname via de longen meestal veel gevaarlijker dan na orale opname. Voor elk van de mogelijk relevante effecten zal een suggestie worden gegeven voor een *in vitro* test waarmee dit effect het best kan worden aangetoond. Bij de keuze voor de meest geschikte bioassay worden naast de kwaliteitsparameters (robuustheid, reproduceerbaarheid, gevoeligheid, selectiviteit, mate van validatie en acceptatie) ook de praktische aspecten, zoals kosten, gebruikersgemak en snelheid betrokken.

5.1 Carcinogene effecten

Genotoxische of mutagene stoffen kunnen het DNA in de celkern (drager van de erfelijke eigenschappen) beschadigen bij mensen en dieren. De afwijkingen in het DNA kunnen door de cel worden gerepareerd (*DNA repair*), maar in sommige gevallen ontstaan er effecten op de gezondheid. Het bekendste effect dat kan ontstaan na de beschadiging van het DNA is kanker. Na de DNA beschadiging zijn er niet-genotoxische stoffen, de zogenaamde tumor-promotoren, nodig om de beschadigde cel uit te laten groeien tot een tumor. Omdat het mogelijk is dat één molecuul van een stof een DNA beschadiging kan veroorzaken (*single-hit* theorie) bestaat er voor genotoxische carcinogene stoffen geen beleidsmatige drempelwaarde voor effecten. Hoewel deze aanname door de toegenomen kennis over DNA reparatie ter discussie staat, wordt er nog steeds rekening mee gehouden dat langdurige blootstelling aan een zeer lage dosis kankerverwekkende stoffen kan leiden tot tumvorming.

Omdat kanker in veel gevallen een dodelijke ziekte is die door lage doses stoffen kan worden veroorzaakt, is het onderzoek naar de mogelijke aanwezigheid van kankerverwekkende (carcinogene) stoffen in drinkwater van groot belang voor de volksgezondheid. Carcinogenen zijn zowel in het oppervlaktewater als in het drinkwater aangetroffen (Roex, RIZA; Vethaak, RIKZ; Versteeg, RIVM). Er zijn recent door de Universiteit van Wageningen (WUR)

vergelijkende proeven uitgevoerd om de genotoxiciteit van het oppervlaktewater bij het inlaatstation in Nieuwegein te bepalen met vissen. Het blijkt dat de genotoxiciteit in 1978 vele malen hoger was dan die in 2005, maar dat er nog steeds genotoxiciteit wordt aangetoond (Alink et al., 2007). Hoewel het belang van de risico's van genotoxische stoffen duidelijk is kan worden getwijfeld over de relevantie van dit effect voor drinkwater. Het blijkt bijvoorbeeld dat bier ook een positief effect geeft in een genotoxiciteitstest (Martin van den Berg, IRAS). Omdat genotoxische stoffen ook veel voorkomen in ons voedsel zal de additionele genotoxiciteit in drinkwater de bevolking niet per definitie extra risico op gezondheidsschade opleveren. Daartegenover staat dat consumenten van drinkwater niet zullen accepteren dat het toxische activiteit bevat, omdat het beeld heerst dat drinkwater "puur" is. Het is voor de drinkwaterbedrijven belangrijk dat dit imago geen schade oploopt.

Er zijn vier typen bioassays die kunnen worden gebruikt om de risico's op carcinogene effecten aan te tonen. De principes van deze assays weerspiegelen mogelijke werkingsmechanismen die een rol spelen bij het ontstaan (of voorkomen) van kanker, zoals mutaties van het DNA en chromosomale afwijkingen, de activering van DNA reparatie (*repair*) enzymen of niet-genotoxische effecten zoals tumor promotie (Heringa, 2005). Om de risico's van alle kankerverwekkende stoffen aan te tonen zal dus een combinatie van een genotoxische en een niet-genotoxische bioassay moeten worden toegepast. Om de risico's van genotoxiciteit te bepalen heeft KIWA Water Research (Kiwa WR) ervoor gekozen de Ames II test en de Comet assay of micronucleus test toe te gaan passen. Hiermee worden zowel DNA mutaties als chromosoom afwijkingen gedetecteerd (Heringa, 2005). Er wordt nog onderzocht of de Comet assay of de micronucleus test zal worden gekozen als tweede test. De *polymerase inhibition* test (PI), waarmee de beide genotoxische effecten met een enkele analyse worden gedetecteerd lijkt ook geschikt, maar deze test is nog onvoldoende gevalideerd (Heringa, 2005). Volgens bijna alle deskundigen is de Ames (II) test op dit moment een geschikte test om genotoxiciteit te bepalen. Er komt daarnaast steeds meer vertrouwen in de Comet assay (Dick Vethaak, RIKZ), die ook kan worden uitgevoerd met een celkweek (bijv. RTG-2 vislijn cellen; Piet den Besten, 2006). Deze test bleek ook goed te werken in het eerder vermelde onderzoek met vissen uit de bioalarmering van het inlaatstation in Nieuwegein (Alink et al., 2007). Als deze bioassay op 96-wells platen kan worden uitgevoerd met een image analyse systeem wordt het een interessante toepassing bij drinkwateranalyses (Heringa, 2005). Binnen het onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen worden bij farmaceutische R&D in de vroege testfase de Vitotox en Ames II assay (met en zonder S9 toevoeging) gebruikt om genotoxiciteit te onderzoeken (John Groten, WUR/Organon). Vitotox is een bioassay die gebaseerd is op de activering van het DNA *repair* mechanisme na zowel DNA mutaties als chromosoom afwijkingen. De Vitotox assay schijnt echter minder goed te werken bij milieumonsters dan bij pure stoffen (persoonlijke communicatie Greet Schoeters, Vito, België). In de latere fase van de geneesmiddelenontwikkeling worden bij de farmaceutische industrie aanvullende *in vitro* en *in vivo* genotox testen uitgevoerd (Ames, Cat/Comet, Micronucleus). Biodetection systems (BDS) ontwikkelt nu assays die gericht zijn op een algemene stap in het *repair* systeem. Cellen zijn in staat om een groot aantal mutaties te herstellen, maar als de reparatie onvoldoende is kunnen mutaties leiden tot tumorvorming. Met een analyse van het *repair* systeem kunnen de risico's van DNA schade dus beter worden beoordeeld (Bram Brouwer, IVM/BDS). De bioassay is echter nog in een vroeg stadium van ontwikkeling waarbij met genomics technieken wordt gezocht naar geschikte biomarkers. BDS en RIKILT nemen deel aan het Nederland Toxicogenomics project (NTG), waarin met behulp van DNA *microarrays* nieuwe biomarkers worden gezocht voor genotoxische, reprotoxische en immunotoxische stoffen. Joost van Delft (GRAT, Universiteit Maastricht) houdt zich in dit project bezig met het onderzoek naar responsen van kankerverwekkende stoffen.

Om de volledige risico's van kankerverwekkende stoffen in water te kunnen analyseren moeten ook niet-genotoxische carcinogenen geanalyseerd worden, met bijv. invloed op apoptose (geprogrammeerde celdood) en/of groei. Daarbij moet wel worden bedacht dat de concentraties waarbij dergelijke stoffen een effect veroorzaken hoog zijn, zodat dit effect mogelijk niet relevant is voor stoffen in het drinkwater. Het risico op kanker na opname van genotoxische stoffen blijft echter bestaan omdat de niet-genotoxische carcinogenen ook via andere routes (voedsel, lucht) door de mens kunnen worden opgenomen. Omdat de stofoverdracht tussen cellen belangrijk kan zijn bij tumor-promotie is de *Gap Junction Intercellular Communication assay* (GJIC), die met name in medische laboratoria wordt uitgevoerd, een goede en snelle assay om een indicatie te krijgen van deze effecten (Bram Brouwer, IVM/BDS). Bij deze test wordt met een micro-injectie een fluorescerende stof in 1 cel van een celweek mono-layer gebracht, waarna wordt onderzocht hoe snel de stof zich verspreid naar de andere cellen. Er kunnen verschillende patronen voorkomen: snelle remming (binnen 1 uur), met herstel naar uitgangssituatie (afbreekbare stoffen), snelle remming zonder herstel, en langzame remming. Deze test, algemeen geaccepteerd als indicator voor stoffen die tumor-promotie kunnen veroorzaken, is niet specifiek om carcinogeniteit aan te tonen maar is indicatief voor de algehele fysiologie van de cel. Er is voor deze test een investering nodig voor de aanschaf van een micro-injectie apparaat, een goede microscoop en een *imaging* analyse systeem. Ook de GJIC test blijft een screeningstest en met deze test zullen zeker niet alle carcinogene stoffen worden afgedekt. Een stapsgewijze aanpak waarin verschillende genotox testen in combinatie worden gebruikt is aan te bevelen (John Groten, WUR/Organon). Wanneer je de voorspelbaarheid, incl. vals positieven en vals negatieven, wilt kennen dan zal interne validatie nodig zijn. Omdat niet-genotoxische carcinogene stoffen op een groot aantal manieren kanker kunnen stimuleren, zal één *in vitro* test nooit al deze stoffen kunnen detecteren. Kiwa WR volgt op dit gebied de ontwikkelingen van de toxicogenomics, omdat hiermee in theorie wel allerlei verschillende werkingsmechanismen tegelijk kunnen worden gedetecteerd (Heringa, 2005). Bij het eerder genoemde NTG project worden ook biomarkers voor niet-genotoxische carcinogenen ontwikkeld.

Genotoxische effecten zijn additief, maar de toxicokinetische effecten die de genotoxiciteit beïnvloeden (bijvoorbeeld bioactivering) zijn niet altijd additief en stoffen kunnen interactie vertonen (John Groten, WUR/Organon). In de praktijk wordt voor *in vitro* genotoxiciteitstesten veelal dosis-additie gevonden. Dat komt omdat er bij opname in cel en orgaan sprake is van combinatie werking in de toxicokinetische fase. Deze gezamenlijke werking kan resulteren in dosis-additie (competitief agonisme) en/of interactie (enzym inhibities en inducties). Dit kan het uitlezen van de combinatiewerking in de toxicodynamische fase (de genotoxiciteit) beïnvloeden. Bioactivering of deactivering van stoffen onderling kunnen de genotoxische potentie van het mengsel mede bepalen. Genotoxische stoffen kunnen worden beschouwd als stoffen met eenzelfde werkingsmechanisme, waarbij dus uitgegaan kan worden van dosis-additie (Minne Heringa, Kiwa WR). Hier zou nog wel een verder onderscheid kunnen worden gemaakt tussen typen genotoxische werking, zoals het veroorzaken van chromosomale breuken of van puntmutaties, maar in principe leiden alle genotoxische stoffen tot hetzelfde effect: een verhoogde kans op een blijvende (nadelige) verandering in het DNA. In dit opzicht kunnen de doses van verschillende genotoxische stoffen dus ook (gewogen) opgeteld worden. Mengseleffecten bij genotoxische stoffen is duidelijk nog een terrein onder discussie, waar in de toekomst verdere aandacht voor nodig is.

5.2 Hormoonverstoring

Hormonen zijn stoffen die door endocriene klieren via de bloedbaan aan doelcellen of -organen worden afgegeven. Alle hormonen hebben een regelfunctie in het lichaam en maken deel uit

van soms complexe systemen. Een groot aantal stoffen kan door binding aan de hormonale receptoren de normale functies van de hormonen zodanig versterken of verzwakken dat de hormoonhuishouding wordt ontregeld. Hierdoor kunnen vitale processen, zoals de groei en de voortplanting, worden verstoord. De relevantie van hormoonverstoring door stoffen in het drinkwater hangt sterk af van de opname van de stoffen. Veel voorkomende estrogene hormonen (estradiol, estron etc.) worden namelijk slecht in het lichaam opgenomen na orale toediening (Martin van den Berg, IRAS). Het synthetische anticonceptie hormoon ethinylestradiol (dat ontworpen is voor een goede opname in het lichaam) is wat dit betreft echter wel zeer relevant. Daarnaast zijn het niet alleen de hormonen die deze activiteit in water veroorzaken, maar ook andere verontreinigingen, die mogelijk wel goed oraal opgenomen worden. Met de ER-CALUX assay is estrogene activiteit aangetoond in het water na verschillende stappen in het zuiveringsproces. Deze activiteit kwam in de buurt van, of overtrof zelfs de door het RIVM vastgestelde "trigger" waarden. Het lijkt er op dat sommige hormoonverstorende stoffen de zuivering gedeeltelijk kunnen passeren (Abrahamse et al., 2007; De Voogt et al., 2006).

Bij Kiwa WR is er in eerste aanleg voor gekozen om hormoonverstoring te analyseren met de CALUX assays. Er zijn inmiddels CALUX assays voor het meten van estrogenen, androgenen, progesogenen, glucocorticoiden en thyroid hormonen. Hormoonverstoring kan goed met de CALUX assays worden onderzocht, mede omdat er goede referenties van deze assays zijn. De ER-CALUX komt over het algemeen goed uit vergelijkende testen met ander assays, zoals de YES-assay met gistcellen, de CARP-HEP met hepatocyten van de karper (Murk et al., 2002, Legler et al., 2006). De estrogene activiteit van mengsels kan ook met andere celkweek bioassays, zoals MELN, T47D en E-screen, worden bepaald met een iets lagere gevoeligheid en een hogere variantie (GWRC, 2008). Het nadeel van deze receptor genexpressie assays is dat ze zich "promiscu" kunnen gedragen omdat ook stimulatie van andere receptoren een positief effect in de test kunnen geven. Het effect van zowel endo-oestrogenen (natuurlijke hormonen), fyto-estrogenen en xeno-oestrogeen wordt met de ER-CALUX gemeten. Er kunnen hier dus ook stoffen tussen zitten die voor de mens niet schadelijk zijn. Het is bekend dat diverse natuurlijke stoffen uit planten (fyto-chemicaliën) de bioassays kunnen beïnvloeden omdat ze een sterke binding met hormonale receptoren hebben. Het is nu echter mogelijk om de verschillende typen estrogeen-actieve stoffen te scheiden met behulp van een op het Instituut van Milieuvraagstukken (IVM) ontwikkelde gel permeatie chromatografie (GPC) methode, waardoor deze effecten afzonderlijk kunnen worden bestudeerd. De nieuwe ER-CALUX assay wordt overigens gemaakt met een "lege" cel (zonder storende receptoren van andere stoffen) die minder gevoelig is voor aspecifieke effecten. Analooq aan de ER-CALUX, zijn ook de AR-CALUX, PR-CALUX, TR-CALUX en GR-CALUX, voor meting van androgene, prostaglandine, thyroïde en glucocorticoïde hormoonactiviteit ontwikkeld (Bram Brouwer, BDS; Sonneveld, 2006).

Toine Bovee heeft op het RIKILT een gist-assay voor estrogene activiteit ontwikkeld met een fluorescentie detectie en hierover een proefschrift geschreven (Bovee, 2006). Het nadeel van deze assay ten opzichte van de ER-CALUX is dat hij minder gevoelig is. Het voordeel is dat de gistcellen makkelijker hanteerbaar en kweekbaar zijn, dat de test met intacte cellen wordt gemeten (dus op verschillende tijdstippen kan nogmaals worden gemeten) en dat de test sneller en makkelijker is. Deze cellen zijn (in tegenstelling tot de CALUX cellen) vrij verkrijgbaar, dus als de gevoeligheid van de test goed genoeg is om de drinkwaternorm voor estradiol equivalenten aan te tonen zou hij makkelijker op de drinkwaterlaboratoria kunnen worden ingevoerd. Een nadeel van gistcellen, dat bij de YES-assay is aangetoond, is dat deze veel minder gevoelig zijn voor estrogene stoffen en vooral anti-estrogene stoffen. Dit wordt veroorzaakt doordat een gistcel een niet-dierlijk celwandmembraan heeft, waardoor mogelijk

niet alle stoffen even gemakkelijk kunnen passeren (Legler et al., 2002). Op dit moment is ook de gist-assay waarmee androgene effecten worden aangetoond beschikbaar (Toine Bovee, RIKILT). Hoewel kwantificering met deze assays mogelijk is, zitten hier zoveel haken en ogen aan dat hij alleen voor kwalitatief onderzoek en vergelijking met een streefwaarde (verdacht of goed) wordt gebruikt. Er is nu ook een goede aromatase bioassay beschikbaar waarmee hormoonverstorende pesticiden, zoals atrazine-achtige stoffen, kunnen worden aangetoond (Ron Hoogenboom, RIKILT) en een biosensor voor het aantonen van binding van stoffen aan plasma-eiwitten betrokken bij het transport van thyroïd hormonen (Meulenberg en Marchesini, 2006). Sommige stoffen (bijv. hydroxymetabolieten van PCBs en PBDEs) kunnen langs deze weg de homeostase van schildklierhormonen verstoren.

De moleculaire toxicologie groep van Nico Vermeulen (VU) heeft aangetoond dat metabolisme ook sterke effecten op de estrogene werking kan hebben. Daarom zou het effect van bioactivering eigenlijk bij elke bioassay moeten worden meegenomen, niet alleen bij genotoxiciteit. RIKILT heeft inmiddels ervaring met metabole activering in de hormonale gistassays (Ron Hoogenboom, RIKILT). Bij een nader onderzoek naar waargenomen (sterke) hormonale effecten kan de *in vivo* bioassay met transgene zebravis worden gebruikt, omdat hierbij ook de opnamekinetiek wordt meegenomen (Legler, 2006).

5.3 Neurotoxische effecten

Neurotoxische stoffen kunnen de overdracht van prikkels door het zenuwstelsel verstoren. Het zenuwstelsel is het orgaansysteem dat bij mensen en dieren een coördinerende rol speelt bij alle handelingen, zoals het aansturen van de spieren, het verwerken van zintuiglijke prikkels en de emotionele en cognitieve processen. Neurotoxische effecten zijn zeer complex, omdat er veel verschillende punten (receptoren) zijn waarop het zenuwstelsel kan worden verstoord. Dit betekent dat er een groot aantal verschillende assays nodig is om alle mogelijke risico's in kaart te brengen. De neurotoxische effecten kunnen worden veroorzaakt door wateroplosbare of amfotere (met zure en basische eigenschappen) stoffen, bijvoorbeeld methylbromide. Met het oog op calamiteiten (bijvoorbeeld terroristische aanslagen) lijkt het de meeste deskundigen relevant om de neurotoxiciteit van het water te testen. Wateroplosbare neurotoxische stoffen worden goed oraal opgenomen en kunnen een sterke werking hebben bij lage concentraties. De mogelijke gevolgen van calamiteiten als gevolg van terreuraanslagen worden behandeld in de EPA's (Eenheid Planing & Advies, EPA-D voor drinkwater) en het landelijk laboratorium netwerk terreur aanslagen (LLNTA).

De acetylcholinesterase inhibitie test (ACHE) zou op alle drinkwater laboratoria uitgevoerd moet (kunnen) worden om het water te onderzoeken op neurotoxiciteit (Martin van den Berg, IRAS). De ACHE assay werd in het verleden veel toegepast om de aanwezigheid van organofosfor pesticiden in het milieu aan te tonen, dus de meeste laboratoria zullen deze assay nog wel in huis hebben. Als in verband met mogelijke calamiteiten snel in het distributienet moet worden gemeten zal hiervoor een biosensor moeten worden ontwikkeld. Er moet wel onderzocht worden of de detectiegrenzen van de ACHE assay voldoende laag zijn om lage gehalten aan neurotoxinen te kunnen detecteren. Naast de organofosfor pesticiden kunnen ook natuurlijke toxinen met de ACHE assay worden gedetecteerd. Anatoxine (gevormd door de blauwalgen *Anabaena* en *Aphanizomenon*) is een acetylcholine esterase remmer en botuline (gevormd door de bacteriën die botulisme veroorzaken) remt de productie van vrijwel alle neurotransmitters, waaronder acetylcholine.

Er is in China een gistcellijn met humaan acetyl cholinesterase ontwikkeld, die mogelijk gebruikt kan worden als *in vitro* assay (Ron Hoogenboom, RIKILT). Remco Westerink doet op

het IRAS onderzoek naar verschillende nieuwe *in vitro* assays voor neurotoxiciteit. Op de WUR is door Tinka Murk onderzoek gedaan naar neurotoxiciteit assays die op prikkelgeleiding zijn gebaseerd, maar dit onderzoek ligt op dit moment stil. Bij Organon worden in de screeningsfase van het onderzoek *in vitro* neurotoxiciteit testen en prikkelgeleiding bestudeerd (o.a. HErG test en purkinje fiber test). Ervaring leert dat deze testen een belangrijke indicatie zijn voor latere bevindingen *in vivo*.

5.4 Immunotoxiciteit

Het immuunsysteem is een verdedigingssysteem met als doel indringers of veranderde eigen cellen in het lichaam van mensen en dieren te bestrijden. Naast het weren van virussen, bacteriën en parasieten wordt het immuunsysteem ook wel ingezet om giften en ook zieke lichaamscellen als kankercellen op te ruimen. Het immuunsysteem kan worden onderverdeeld in een adaptief en een aspecifiek deel. Het adaptieve deel past zich aan het pathogeen aan. Dit kost tijd, maar zal uiteindelijk tot een sterke afweer leiden die het lichaam vaak langdurig beschermt tegen deze pathogeen. Het aspecifieke deel daarentegen is direct werkzaam, maar minder specifiek voor de pathogeen en kan de afweer soms maar weinig in gang zetten. Omdat immunotoxische stoffen het immuunsysteem op verschillende plaatsen en met verschillende mechanismen kunnen verstoren is de immunotoxiciteit te complex om met één test te analyseren. Er zullen dus meerdere bioassays nodig zijn om een compleet beeld te krijgen van de mogelijke risico's, als deze effecten al met *in vitro* assays te meten zijn. De meeste deskundigen vinden deze parameters echter wel relevant voor nader onderzoek. Immunotoxische effecten kunnen worden veroorzaakt door goed wateroplosbare stoffen (bijvoorbeeld alkyltin verbindingen). Ook voor deze parameter moet worden onderzocht of de concentraties immunotoxische stoffen in drinkwater zo hoog kunnen worden dat er effecten te verwachten zijn (dosis selectie). Er zijn op dit moment nog geen goede *in vitro* assays beschikbaar om dit effect te monitoren.

Op het IRAS wordt door Raymond Pieters een test met proliferatie van B-lymfocyten ontwikkeld. RIKILT doet via het NTG project onderzoek naar de ontwikkeling van nieuwe immuno-assays. Ook bij Organon wordt onderzoek gedaan om aan de hand van resultaten van *in vitro* assays naar de *in vivo* situatie te extrapoleren. Bij BDS is de NF- κ B-CALUX cellijn ontwikkeld als anti-inflammatoire test.

5.5 Teratogene effecten en reproductie

Teratogeniteit is de eigenschap van een stof of ziekte om bij de foetus afwijkingen te veroorzaken als de moeder tijdens de zwangerschap aan de stof wordt blootgesteld of de ziekte doormaakt. Van een groot aantal chemische stoffen en van sommige geneesmiddelen is bekend dat zij aangeboren afwijkingen kunnen veroorzaken. Het slaapmiddel thalidomide (softenon) en DES, dat vroeger werd gegeven om miskramen te voorkomen, zijn hiervan bekende voorbeelden. Op grond van de mogelijk dramatische effecten van teratogene stoffen denken de meeste deskundigen dat het relevant is om de risico's hiervan te monitoren met een bioassay. Er moet nog wel informatie worden verzameld over de mogelijke concentraties van teratogene stoffen in de drinkwaterbronnen, de polariteit van de stoffen en de mogelijkheid dat deze stoffen de drinkwaterzuivering passeren.

Effecten op de reproductie worden met name met *in vivo* systemen onderzocht in langdurige testen. Het lijkt niet zinvol om de teratogeniteit routinematig te analyseren met een dergelijke dure *in vivo* assay, maar er wordt op dit moment veel onderzoek gedaan naar geschiktheid van een *in vitro* test met stamcellen (John Groten, WUR/Organon). Bij Organon wordt deze *in vitro*

EST test (*embryonic stem cells*), naast *in vivo* testen, uitgevoerd om teratogeniteit in de *screening* fase aan te tonen met. Het nadeel van de test is dat het metabolisme binnen de cel zeer beperkt is, waardoor mogelijke risico's van metabolieten worden onderschat. Bij Organon wordt nu gedacht aan een combinatie van metabolisme en EST test. Wellicht is het mogelijk om een S9 oplossing toe te voegen zoals bij de genotoxiciteit assays. Zoals eerder vermeld moet bioactivering niet alleen bij genotoxiciteit maar bij alle effecten worden onderzocht (Nico Vermeulen, VU). De EST test zou, na validatie, veelbelovend kunnen zijn om toe te passen als screening instrument bij drinkwater onderzoek.

Als er sterke aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van teratogene stoffen kan een nader onderzoek worden uitgevoerd met een *in vivo* test. Juliette Legler van het IVM heeft een gevoelige test ontwikkeld waarbij teratogene activiteit kan worden aangetoond in embryo's van de zebravis. De zebravis wordt vaak gebruikt als modelsysteem voor humane toxiciteit, door de grote overeenkomsten in werkingsmechanismen. De zebravis embryotest is nu al bruikbaar als early warning voor teratogene effecten. Onderzoek bij BDS heeft aangetoond dat de hormonale CALUX assays samen met de zebravis embryotest (teratogeniteit) vrijwel alle effecten op de reproductie kunnen detecteren (Bram Brouwer, IVM/BDS). Andere *in vivo* assays, die overigens ook in het stuk over hormonale effecten passen, analyseren effecten op de baarmoeder (uterotroof assay) of prostaat (Hertzberger assay). Bij het RIVM worden teratogene effecten getest met ratten, maar die test is te duur en tijdrovend om in een routinematige screening toe te passen (Bianca van der Ven, RIVM).

5.6 Bioactiviteit van geneesmiddelen

In verband met de gevaren van het ontstaan van resistentie bij pathogene bacteriën moet onderzoek worden gedaan naar de aanwezigheid van antimicrobiële activiteit in het water. Resistentie tegen antibiotica betekent dat een bacterie bestand wordt tegen een bepaald antibioticum. Vele bacteriën van de betreffende populatie zullen sterven door het antibioticum, maar enkele overblijvende resistente bacteriën planten zich voort en zorgen voor de verspreiding van deze erfelijke eigenschap. Na enige tijd zullen bijna alle bacteriën bestand zijn tegen het antibioticum. Deze resistentie werkt tegenover een bepaald antibioticum en eventueel chemisch eraan verwante antibiotica. Soms echter kan er meervoudige resistentie optreden, als de selectie met meerdere antibiotica gebeurd is. Bij RIZA is in samenwerking met RIKILT een bioassay ontwikkeld om de effecten van antibiotica aan te tonen (Stroomberg et al., 2006). In combinatie met een fractionering kunnen bovendien uitspraken worden gedaan over de identiteit van de antibiotica in het mengsel. Deze test lijkt relevant om als *in vitro* bioassay toe te passen bij het monitoren van drinkwater.

Naast antibiotica verwacht Ron Hoogenboom (RIKILT) dat zogenaamde NSAID's (*Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs*) en antidepressiva in de toekomst een mogelijke plaag worden. Stoffen uit de eerste groep, onder andere de pijnstillers aspirine, paracetamol en ibuprofen, worden in zeer grote hoeveelheden gebruikt en hebben een aantal vervelende bijwerkingen: misselijkheid, braken, diarree, constipatie, huiduitslag, duizeligheid, hoofdpijn, etc. Bij langdurige of hogere blootstelling kunnen meer serieuze effecten, zoals kortademigheid en storingen in lever en nieren optreden. Afhankelijk van de mechanismen van deze bijwerkingen moeten hiervoor specifieke bioassays ontwikkeld worden. Mogelijk dat de NF- κ B cellijn van BDS deze activiteit oppikt. Uit recent onderzoek blijkt evenwel dat nadelige effecten van geneesmiddelen op de gezondheid op dit moment niet waarschijnlijk zijn omdat de gevonden gehalten ver onder de werkzame doses liggen (Versteegh et al., 2007; Mons et al., 2003). Toch zijn deze stoffen ongewenst in het drinkwater vanuit het 'voorzorgsprincipe'. Daarnaast kan de aanwezigheid van geneesmiddelen de waardering van drinkwater door de

consument en zijn perceptie van de kwaliteit sterk beïnvloeden, met als gevolg dat er minder vertrouwen in de drinkwaterkwaliteit zal zijn.

5.7 Detoxificatie

De relevantie van de effecten op de drie fasen van de detoxificatie wordt door de meeste deskundigen niet hoog gevonden.

Fase 1

In de eerste fase van de detoxificatie worden stoffen omgezet in beter water oplosbare metabolieten die makkelijker kunnen worden uitgescheiden. Er kunnen bij deze metabole omzettingen echter ook stoffen ontstaan die door een hoge reactiviteit gevaarlijker zijn dan de uitgangsstoffen (bioactivering). Zo kunnen stoffen in het water indirect gezondheidsschade veroorzaken: door via effecten op de metabole enzymen de toxiciteit van andere stoffen te verhogen. Inductie (verhoging van de activiteit) van de fase 1 enzymen voor detoxificatie zijn de meest onderzochte en best gevalideerde biomarkers. Deze effecten worden over het algemeen veroorzaakt door slecht wateroplosbare (hydrofobe) stoffen. Als deze stoffen wel aanwezig zijn in het water dat wordt opgenomen voor drinkwaterproductie zullen ze hoogst waarschijnlijk worden verwijderd tijdens de actiefkool filtratie. Toch is er twijfel of de fase 1 enzymen alleen door hydrofobe stoffen geïnduceerd kunnen worden (Nico Vermeulen, VU). Indien er polaire stoffen zijn die bijvoorbeeld de activiteit van de belangrijkste detoxificatie enzymen, de cytochroom P450 familie, kunnen verhogen zou dat grote consequenties kunnen hebben voor zowel de carcinogene effecten (verhoogde bioactivering tot reactieve carcinogene metabolieten) als hormoonverstoring (verstoring van de lichaamseigen hormoonhuishouding, waarbij de cytochroom P450 enzymen ook betrokken zijn). Het blijkt bijvoorbeeld dat azaarenen (genitreerde hetrocyclische aromatische koolwaterstoffen), die beter wateroplosbaar zijn dan de vergelijkbare PAK's, in staat zijn om de fase 1 enzymen te induceren. Wellicht is het nuttig om hier meer onderzoek naar te doen door een aantal concentraten van het drinkwater te testen met de DR-CALUX, een bioassay die de inductie meet van o.a. cytochroom P450 (het belangrijkste fase 1 enzym) na binding van stoffen aan de arylhydrocarbon receptor (AhR).

Fase 2

In de tweede fase van de detoxificatie worden de omzettingsproducten van fase 1 sterk gebonden aan lichaamseigen stoffen (liganden), waardoor de toxiciteit afneemt en de uitscheiding wordt verhoogd. Dit proces wordt conjugatie genoemd. Het mechanisme van de inductie van fase 2 enzymen is vergelijkbaar met dat van de inductie van fase 1 enzymen, maar de respons van de fase 2 enzymen is meestal zwakker. Hoewel de fase 2 enzymen een belangrijke functie hebben (onder andere bij het voorkomen van kanker) lijkt het daarom niet zinvol om deze parameter te toetsen.

Fase 3

Over de fase 3 ontgifting is nog niet veel bekend. Bij deze fase van de detoxificatie worden stoffen actief verwijderd door membraaneiwitten, die als een soort interne pomp werken. Deze werking wordt ook wel *Multi Drug Resistance* (MDR) of *Multi Xenobiotic Resistance* (MXR) genoemd. De activiteit van deze eiwitten kan worden verhoogd na blootstelling aan een breed scala van milieuvreemde stoffen, maar door een andere groep stoffen (zogenaamde *chemosensitizers*) worden de enzymen juist geremd. Het is niet waarschijnlijk dat MXR relevante bioassays op zal leveren (John Groten, WUR/Organon). Ten eerste zijn de resultaten van deze assays moeilijk te interpreteren, omdat er zowel inductie als inhibitie van deze zogenaamde ABC-eiwitten (*ATP Binding Cassette*) op kan treden. Daarnaast is deze assay waarschijnlijk niet gevoelig genoeg om als *early warning* te dienen. Voor selecte stof reacties is *multi drug resistance*

en *transporter* onderzoek als fase 3 metabolisme zeer relevant, maar het nut bij toxicologische screening lijkt nog ver weg.

6 Visie op effectgerichte streefwaarden

Het is interessant om de aanwezigheid en mogelijke risico's van schadelijke stoffen in complexe mengsels te analyseren met effectgerichte toetsen, maar deze analyse wordt pas echt waardevol als de uitkomst van de bioassays getoetst kan worden aan een maatlat. In dit hoofdstuk zal een strategie worden voorgesteld waarmee de resultaten van de bioanalyses kunnen worden gebruikt bij de beoordeling van de waterkwaliteit, van bron tot kraan. Eerst zullen de aspecten worden besproken die een rol spelen bij de interpretatie van de testresultaten van bioanalyses. Daarna zal een ontwerp worden gemaakt voor effectgerichte streefwaarden voor de kwaliteit van drinkwater. Ten slotte zullen de mogelijke problemen en drempels bij de implementatie van deze streefwaarden in kaart worden gebracht.

6.1 Eisen aan resultaten van bioassays

Bij de keuze voor de meest geschikte bioassays voor de kwaliteitsbeoordeling van drinkwater (van bron tot kraan) zal in eerste aanleg de kwaliteit van de test moeten worden beoordeeld. De nadruk van de kwaliteitsbeoordeling zal moeten liggen op het voorkomen van vals positieve en vooral vals negatieve resultaten. Voor de implementatie van een test moeten de volgende parameters van de bioassay worden beoordeeld:

- robuustheid;
- reproduceerbaarheid;
- gevoeligheid;
- selectiviteit;
- mate van validatie;
- internationale acceptatie.

In de Kaderrichtlijn Water (KRW) zijn voor chemische analyses van oppervlaktewater geen eisen voor het gebruik van een bepaalde methode (NEN, ISO) neergelegd, maar er worden wel twee generieke prestatie-eisen gesteld voor wat betreft de gevoeligheid en de reproduceerbaarheid:

1. De detectielimiet moet lager zijn dan 1/3 van de MTR-waarde (Maximaal Toelaatbaar Risico)
2. Er is een maximale spreiding van de analyse bij concentraties rond de norm voorgeschreven. Dit soort eisen kunnen makkelijker wettelijk worden vastgelegd omdat de interpretatie flexibeler is (als er een betere methode beschikbaar komt hoeft de wet niet aangepast te worden).

De eis die door beleidsmakers wordt gesteld aan een toxicologische *screening*, waarmee het aantal chemische analyses mogelijk kan worden verminderd, is dat er op het niveau van de chemische kwaliteitsnorm een goed meetbaar effect moet zijn in de bioassay. Hierbij mogen hoegenaamd geen vals negatieve resultaten voorkomen.

Als de uitslag van de effectmeting moet worden vertaald naar humane risico's zullen naast de kwaliteit van de bioassay de onderstaande aspecten bekend moeten zijn:

- Opwerkingsprocedure. Voor de meeste bioassays zal het noodzakelijk zijn de watermonsters op te werken tot geconcentreerde extracten. Met een korte blootstelling aan de extracten (met verhoogde concentraties gifstoffen) kan, bij benadering, een chronische blootstelling aan de reële, lagere concentraties worden gesimuleerd. Het is voor de betrouwbare interpretatie van de resultaten van de *in vitro* bioanalyses echter van vitaal belang zoveel mogelijk stoffen met het werkingsmechanisme dat voor de bioassay relevant

is in het extract komen waaraan de cellen of testorganismen worden blootgesteld. Omdat het voor de interpretatie van de bioassay data essentieel is om goed te begrijpen wat er precies gebeurt bij het extraheren, zuiveren en concentreren van monsters zullen deze stappen goed gevalideerd moeten worden (Cor Schipper, RIKZ). Het zal onvermijdelijk zijn dat hierbij de samenstelling van het oorspronkelijke mengsel verandert. Hans Klamer (RIKZ) is bezig om voor OSPAR een rapport te schrijven met een overzicht van de extractiemethoden voor bioassays. Door KIWA-WR wordt hiernaar reeds onderzoek uitgevoerd in het BTO project "Sample preparation for bioassays". Mogelijk komt hier een opzet voor een algemeen bruikbare extractie uit, die met verschillende nabehandelingen bruikbaar is voor zowel de specifieke bioassays als de chemische analyses. Door Het Waterlaboratorium wordt reeds onderzoek uitgevoerd naar een on-line concentratie om de gevoeligheid van de acute *in vivo* bioassays in de bioalarmering te verhogen.

- Beschikbaarheid van stoffen in de bioassay. Voor een betrouwbare effectgerichte analyse is het uiteraard van belang dat de relevante stoffen beschikbaar zijn voor de testorganismen of cellen van de bioassay. Er moeten goede procedures worden gevolgd om te voorkomen dat de stoffen die een effect kunnen veroorzaken niet aan de test worden onttrokken door bijvoorbeeld binding aan glas of plastics van gebruiksartikelen in het laboratorium (pipetten, multiwell platen). Als de beschikbaarheid van stoffen wordt verminderd door een slechte passage van celwanden of door binding aan celeigen moleculen, dan moet dit worden gezien als een van de eigenschappen van de test. Dergelijke eigenschappen zijn ongewenst als ze in humane cellen niet of in veel mindere mate optreden, omdat er dan een kans is op vals negatieve resultaten.
- Opnamekinetiek. De vaststelling van normen of streefwaarden moet gebaseerd zijn op de gifstoffen die daadwerkelijk worden opgenomen door de mens (Martin van den Berg, IRAS). Na een waargenomen toxisch effect moet het blootstellingrisico voor de mens worden bepaald aan de hand van absorptie, distributie, metabolisme en eliminatie (ADME). De door het lichaam opgenomen fractie van een giftig monster kan mogelijk worden bepaald met het door TNO ontwikkelde *in vitro* model TIM (TNO gastro-Intestinal Model) dat is ontworpen om de biologische beschikbaarheid van stoffen te testen (Bianca van der Ven, RIVM). In dit computer-gestuurde meer-compartimenten model worden de maag en het darmkanaal nagebootst en worden humane pH-waarden en galconcentraties gebruikt. Analyses met een dergelijk systeem zijn echter duur en bewerkelijk. Naast het TIM, dat vooral is ingericht om digestie en vertering na te bootsen, is er een simpeler model dat maatgevend is voor de darmopname, inclusief passage van en metabolisme door het darmepitheel (Ron Hoogenboom, RIKILT). Bij dit model wordt een enkele laag (*mono-layer*) van de CaCo-2 darmcellen gemaakt waarover het testextract geleid kan worden, bijvoorbeeld via een cupje op een 24-wells plaat, voordat de bioassay wordt uitgevoerd. In werkelijkheid zal de opname door de mens veel complexer zijn. Ten eerste kan de mens ook via overige slijmvliezen, huid en longen (bijvoorbeeld waterdamp bij douchen) worden blootgesteld aan stoffen in drinkwater. Daarnaast zal de verdeling over de verschillende organen, weefsels en lichaamsvloeistoffen een belangrijke rol spelen bij de ernst van de mogelijke effecten op de mens. Deze factoren zijn echter niet in te bouwen in effectgerichte streefwaarden, omdat hiervoor de identiteit van de stoffen die het effect veroorzaken bekend moet zijn. De passage door CaCo-2 cellen lijkt voorsnog een werkbare test om een indicatie te krijgen over de mogelijke opname door de mens van de belangrijkste stoffen die een waargenomen effect veroorzaken.

6.2 Voorstel ontwerp streefwaarden

Met het oog op risicoschatting moet goed gemotiveerd worden of gemeten waarden in de buurt komen van reële gevaren. Als voldoende bekend is over de betrouwbaarheid van de

bioassay, over het rendement van de opwerkingsprocedure van watermonsters en over welk deel van de gemeten toxiciteit wordt opgenomen door het menselijk lichaam (zie 6.1), dan kunnen enige uitspraken worden gedaan over de humane risico's. De voorgestelde streefwaarden kunnen op deze risicoanalyse worden gebaseerd. De kwaliteit van de bioassay en de opwerkingsprocedure moet wel vastliggen indien er een normstelling op wordt gebaseerd.

Effectgerichte streefwaarden voor in vivo bioassays voor algemene toxiciteit

In de vervolgstراتيجية van de Totaal Effluent Beoordeling (TEB) is een handvat voor de algemene toxiciteit opgenomen waarin wordt gesteld dat een waarneembare acute toxiciteit (Microtox, algentest en Daphnia test) in een monster dat 20 keer geconcentreerd is met een XAD-hars een indicatie is voor chronische effecten op het ecosysteem (Roex et al., 2007). Deze waarde is gebaseerd op een empirische relatie tussen de acute en de chronische toxiciteit (acuut chronisch ratio) die ongeveer een factor 10 bedraagt. Rekening houdend met een extractierendement van ongeveer 50% worden acute effecten bij 20 keer concentreren daarom als indicatief gezien voor het optreden van chronische toxiciteit in het oorspronkelijke monster. Hoewel er geen algemene regels zijn voor de relatie tussen ecotoxiciteit en humane toxiciteit stellen we voor om dezelfde richtwaarde te gebruiken als streefwaarde van de algemene toxiciteit van het inlaatwater voor de drinkwaterbereiding. De toxiciteit van het water zal in de verschillende stappen van het zuiveringsproces voor drinkwater afnemen door de verwijdering van giftige stoffen. Aan de andere kant is het mogelijk dat tijdens het zuiveringsproces (vooral bij de desinfectie) giftige omzettingproducten kunnen ontstaan. Omdat de mens echter in tegenstelling tot de waterorganismen geen 24 uur per dag aan het drinkwater wordt blootgesteld lijkt deze benadering voldoende veilig. Om deze streefwaarde te toetsen zal een on-line concentrering moeten worden ontwikkeld voor de acute testen van de bioalarmering (Microtox en algentest). Bij Het Waterlaboratorium (HWL) wordt nu reeds onderzoek uitgevoerd naar een dergelijk systeem. Voor de chronische assays met vissen en watervlooien geldt een effect in het niet geconcentreerde water als waarschuwingssignaal voor bioalarmering.

Effectgerichte streefwaarden voor in vitro bioassays voor specifieke toxiciteit

Tot nu toe zijn er nog geen beleidsmatige drempelwaarden voor effecten, maar alleen voor afzonderlijke stoffen. Normstelling voor mengsels is gebaseerd op een veiligheidsfactor of op dosis-additie volgens het TEF concept (zie hoofdstuk 2). Een alternatieve manier om de mogelijke risico's van stoffen te toetsen is het ontwerpen van effectgerichte streefwaarden. Wim Mennes (RIVM) heeft met hulp van John van Genderen (Kiwa WR) een alarmeringswaarde voor stoffen met estrogene activiteit ontworpen (Mennes, 2004). Bij deze norm is uitgegaan van dosis-additie, aangezien deze stoffen werken volgens hetzelfde mechanisme, namelijk binding aan estrogene receptoren. Estradiol en andere estrogene hormonen kunnen door het menselijk lichaam worden aangemaakt en zijn dus lichaamseigen stoffen. Het risiconiveau voor de mens is vastgesteld aan de hand van de ADI van 50 ng/kg/d voor 17 β -estradiol, afgeleid door de WHO. De ADI is de hoeveelheid van een stof (per kilo lichaamsgewicht) die dagelijks door de mens kan worden opgenomen zonder dat er nadelige gezondheidseffecten optreden. De ADI waarde is bepaald met behulp van de laagst gerapporteerde NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), gedeeld door een veiligheidsfactor (bijvoorbeeld 100 of 1000), in verband met de mogelijke verschillen tussen de mens en de proefdieren waarbij de NOAEL is bepaald (factor 10) en de individuele verschillen in gevoeligheid tussen mensen (nogmaals een factor 10) en eventueel de mogelijke deficiënties in de bepaling van de NOAEL (factor 3-10). Het is echter van groot belang wat de biobeschikbare fractie van de estrogeen actieve stoffen is. Van de veilige 50 ng ingenomen 17 β -estradiol/kg/d, is door slechte opnamen uit de darm en grote mate van binding aan bloedeiwitten in feite maar 50 pg/kg/d beschikbaar in het bloed. Omdat

andere (xeno)estrogenen mogelijk beter het bloed kunnen bereiken en daar minder aan eiwitten gebonden zouden kunnen zijn dan het 17β -estradiol, is aangenomen dat 50% van de orale blootstelling in het bloed terecht komt, en dat daarin 50% ongebonden is. Met deze aanname is gesteld dat 200 pg EEQ/kg/d geen risico zou opleveren (EEQ = estradiol equivalenten). Met als aanname een drinkwaterconsumptie van 2 liter water per dag voor volwassenen met een lichaamsgewicht van 70 kg werd een streefwaarde van 7 ng EEQ per liter drinkwater vastgesteld.

We stellen voor om een vergelijkbare strategie te volgen als Mennes & Van Genderen voor het vaststellen van streefwaarden voor andere *in vitro* effecten van lichaamsvreemde stoffen die een bepaald *in vivo* effect bij de mens kunnen veroorzaken. Aangezien elke afzonderlijke *in vitro* assay een afzonderlijk werkingsmechanisme omvat, kan voor elke bioassay een aparte streefwaarde worden vastgesteld op basis van dosis-additie. In eerste instantie zal voor elk van de verschillende effecten/bioassays een geschikte referentiestof moeten worden vastgesteld. De streefwaarde zal worden gebaseerd op de toxische equivalenten van de referentiestof per liter drinkwater (REQ/L). Voor de referentiestof gelden een aantal criteria, zoals een goede opname door de mens, bekende ADI waarde, bekende opname, kinetiek en metabolisme, sterk effect in de *in vitro* bioassay, internationale acceptatie als referentiestof die representatief is voor het te onderzoeken effect, commercieel verkrijgbaar en toepasbaar op een standaard laboratorium zonder speciale aanpassingen. Het uitgangspunt voor het vaststellen van de streefwaarden voor drinkwater is de ADI (*Acceptable Daily Intake*) van de referentiestof. Omdat er in principe onvoldoende gegevens zullen zijn over de humane opname, verdeling, omzetting en uitscheiding (ADME) van de stoffen die het waargenomen effect veroorzaken in de bioassay, zal hiervoor een *worst case* benadering worden gevolgd. Bij het vaststellen van de ADI is al rekening gehouden met ADME. Om de risico's niet te onderschatten zal bij voorkeur een referentiestof moeten worden gekozen die zeer goed wordt opgenomen, slecht wordt omgezet naar minder schadelijke metabolieten en langzaam wordt uitgescheiden. Het is echter niet realistisch om extreme bioaccumulatie te verwachten voor de relatief polaire stoffen in het drinkwater. De referentiestoffen zullen met zorg geselecteerd moeten worden, hetgeen een nadere studie vergt. Het is bovendien van belang om te controleren of kinderen meer risico lopen dan volwassenen door een hogere blootstelling. Hierover is door het RIVM een leidraad geschreven (Wolterink et al., 2007). Om dit te beoordelen moet bekend zijn of er bijvoorbeeld een leeftijdsafhankelijke opname van het watervolume per gewichtseenheid is. Bovendien moet bij streefwaarden voor lichaamseigen stoffen (bijvoorbeeld hormonen) worden gekeken naar wat kinderen zelf aanmaken om te controleren welke blootstelling invloed heeft. Dit is vaak minder dan verwacht op grond van onderzoek met volwassenen (Ron Hoogenboom, RIKILT).

De effectgerichte streefwaarden voor drinkwater worden, analoog aan de in Q21 beschreven methode, vastgesteld met de onderstaande aannamen:

- Stel de ADI waarde van de referentiestof op $A \mu\text{g}/\text{dag}/\text{kg}$ lichaamsgewicht.
- Er is geen aanvullende veiligheidsfactor nodig voor de streefwaarde omdat deze al in de ADI is verwerkt. De ADI van de referentiestof is bovendien al gecorrigeerd voor verschillen in de opname, omzetting, distributie en uitscheiding (ADME). Als wordt verwacht dat de eigenschappen van de belangrijkste stoffen in het water sterk verschillen van die van de referentiestof moet er een correctiefactor worden ingevoerd (A wordt AC). Dit moet per effect worden bekeken.
- Bij een lichaamsgewicht van B kg is de maximaal toelaatbare opname van de referentiestof $AC \cdot B \mu\text{g}$ per dag. Meestal wordt voor een standaard lichaamsgewicht van een persoon 70 kg genomen.

- Als aangenomen wordt dat er via het drinkwater maximaal 10% van de totale blootstelling plaatsvindt, zoals standaard gedaan wordt bij gebrek aan blootstellinginformatie, dan mag er via het drinkwater maximaal $AC*B/10 \mu\text{g}$ per dag worden opgenomen. Dit moet echter per effect apart beoordeeld worden.
- Als aangenomen wordt dat een volwassen mens 2 liter water per dag drinkt, dan mag de maximale concentratie in het drinkwater $AC*B/20 \mu\text{g/L}$ zijn. Per effect moet nog bekeken worden of de consumptie van jonge kinderen ten opzichte van hun lichaamsgewicht apart meegenomen moet worden.
- De streefwaarde voor alle stoffen in het drinkwater die in de bioassay hetzelfde effect veroorzaken als de referentiestof kan worden uitgedrukt als referentiestof equivalenten: $AC*B/20 \mu\text{g REQ/L}$.

De streefwaarden worden zodanig vastgesteld dat men bij testresultaten onder deze waarden kan stellen dat het drinkwater veilig is met betrekking tot deze toxische effecten. Bij overschrijding hoeft er niet direct een gezondheidsrisico te bestaan, maar is er aanleiding een nadere studie uit te voeren naar de oorzaak en de gevolgen van de overschrijding.

Omdat volledige afwezigheid van milieuvreemde stoffen in het drinkwater niet reëel is ('nul bestaat niet'), zijn stofgerichte streefwaarden gedefinieerd voor chemische verontreinigingen in drinkwater (van der Hoek et al., 2008). Deze streefwaarden bieden houvast bij het beoordelen van stoffen in drinkwater en kunnen dienen als horizon voor preventieve en curatieve maatregelen. Deze streefwaarden, die lager zijn dan de wettelijke voorgeschreven grenswaarden, zijn gebaseerd op toxicologische afwegingen met de zogenaamde TTC waarde (*Threshold of Toxicological Concern*). De TTC-waarde is afgeleid van normwaarden voor carcinogene verbindingen in voeding. Voorgesteld is om voor drinkwater streefwaarden te hanteren van $0,1 \mu\text{g/L}$ voor niet-genotoxische verbindingen en $0,01 \mu\text{g/L}$ voor genotoxische verbindingen. Voor de som van de concentraties van deze verontreinigingen worden streefwaarden voorgesteld van respectievelijk $1 \mu\text{g/L}$ en $0,05 \mu\text{g/L}$. Deze gesommeerde streefwaarden, waarin overigens ook een esthetische component (imago drinkwater) is verwerkt, zullen worden vergeleken met de alarmeringswaarden die worden gevonden voor de referentiestoffen, die uitsluitend op toxiciteit zijn gebaseerd.

6.3 Problemen en drempels bij effectgerichte streefwaarden

Het Nederlandse waterbeheer, vooral Rijkswaterstaat (RIZA en RIKZ), heeft vaak voorop gelopen bij onderzoek naar de toepassing van effectgerichte monitoring bij het beoordelen van de waterkwaliteit. In een aantal gevallen werd zelfs overwogen om een wettelijke basis voor effectgerichte monitoring technieken in te voeren.

In de door RIKZ ontwikkelde Chemie Toxiciteit Toets (CTT) voor de beoordeling van verontreinigde zoutwaterbodems, waren *in vivo* en *in vitro* bioassays opgenomen met een signalerende rol (een normoverschrijding had geen consequenties voor de verspreiding van de bagger, maar er werd een nader onderzoek uitgevoerd). Bij een evaluatie van de CTT in 2006 werd echter besloten om de bioassays geen verplicht onderdeel meer te maken van het beoordelingssysteem. Dit besluit werd genomen op grond van de prestatiekenmerken van de *in vivo* assays met bacteriën en slijkgarnalen, die onvoldoende waren voor een diskwalificerende of signalerende rol (DGW, 2006). Beide bioassays werden namelijk niet geschikt bevonden omdat er niet altijd een relatie kon worden gevonden tussen de waargenomen effecten en gehalten aan stoffen. De *in vitro* assay (DR-CALUX om persistente bioaccumulerende en toxische stoffen met een dioxine-achtige werking te monitoren) werd wel als voldoende robuust beoordeeld. De argumentatie over prestatiekenmerken van *in vivo*

bioassays is echter moeilijk te bewijzen omdat het onmogelijk is om alle schadelijke stoffen chemisch te analyseren. Daarnaast zou de toxiciteit van alle aangetoonde stoffen bekend moeten zijn om deze relatie aan te kunnen tonen. De kracht van bioassays ligt juist in het feit dat de effecten van onbekende stoffen ook worden meegenomen. Dick Vethaak en Cor Schipper (RIKZ) gaven echter aan dat deze beslissing meer om beleidsmatige redenen was genomen. Om bioassays te gebruiken als instrument voor diskwalificatie van sediment moet hard gemaakt kunnen worden waardoor de aangetoonde effecten worden veroorzaakt, anders is het juridisch gezien onmogelijk om op grond van de resultaten een besluit te nemen (vooral als dit grote financiële consequenties heeft). Nu worden de bioassays wel als *screening* aanbevolen bij de beoordeling van zoute bagger, maar ze zijn niet meer verplicht.

RIZA heeft veel energie gestopt in het ontwikkelen van de Totaal Effluent Beoordeling (TEB), een batterij toetsen om de toxiciteit, de persistentie en de mogelijke bioaccumulatie van stoffen in afvalwater te analyseren (Marijke Ferdinandy & Erwin Roex, RIZA). Na uitgebreide vergelijking van methoden, validatie van gekozen testen en ringonderzoeken is men er niet in geslaagd een maatlat te ontwerpen die algemeen wordt geaccepteerd. Deels heeft dit te maken met het feit dat mensen het verschijnsel toxiciteit niet goed begrijpen als dit niet kan worden verklaard met de resultaten van chemisch analytisch onderzoek (zie CTT verhaal hierboven). Daarnaast is het lastig om een voorstel langs alle commissies te krijgen, waarin ook mensen uit de industrie vertegenwoordigd zijn (die niet zitten te wachten op zwaardere eisen aan hun lozingen op het milieu). In twee BREF's (*Best available technology REference documents*) onder de IPPC (*Integrated Pollution Prevention & Control*) wordt de Totaal Effluent Beoordeling (TEB) als Stand der Techniek beschouwd, namelijk de BREF Organische Bulk Chemie en de BREF Organische Fijn Chemie. In de eerstgenoemde staat de TEB alleen als Stand der Techniek beschreven, in de tweede staan bovendien emissie richtwaarden, die gehaald zouden moeten worden als aan de Stand der Techniek wordt voldaan. Dit betekent dat waterkwaliteitsbeheerders de TEB voor deze sectoren in beschouwing moeten nemen bij het bepalen van de Stand der Techniek. De waterkwaliteitsbeheerder, kan in samenspraak met het bedrijf echter gemotiveerd afwijken van deze emissie richtwaarden (het zijn geen normen), bijvoorbeeld wanneer verdere sanering niet kosteneffectief blijkt te zijn, of wanneer Stand der Techniek reeds aanwezig is op de site (meestal prevaleert chemie dan nog steeds boven het effect).

Beleidsmatig ligt het makkelijker als de bioassays naast de chemische analyses worden uitgevoerd, maar niet in plaats van. In de perceptie van de beleidsmensen zijn chemische analyses betrouwbaar en bioassays niet (Gert-Jan de Maagd, V&W). Dit is de voornaamste reden dat bioassays geen plek hebben gekregen binnen de Kaderrichtlijn Water (KRW). Nederland was hier overigens wel een warm voorstander van, maar kreeg te weinig steun uit andere Europese landen. Bij vervanging van chemische analyses door effectmetingen kunnen juridische knelpunten ontstaan. Gert-Jan de Maagd (V&W) ziet in het in dit rapport beschreven voorstel echter geen juridische knelpunten omdat dit een kwaliteitscontrole is van een eigen product (drinkwater). Bovendien is het de bedoeling om de bioassays in eerste aanleg in te zetten als aanvullende controle van de drinkwaterkwaliteit. Als in de toekomst chemische analyses gedeeltelijk worden vervangen door een *screening* met bioassays zal het Rijk en de EU-commissie echter een goede wetenschappelijke en juridische onderbouwing vragen.

7 Discussie en conclusies

Het zal goed zijn voor het imago van de drinkwaterbedrijven en de perceptie bij de consument als de kwaliteitsbeoordeling plaats zal vinden op basis van informatie uit de humane toxicologie (Gert-Jan de Maagd, V&W). De belangrijkste conclusies uit dit rapport en de mogelijke toepassingen van effectgerichte toetsen bij de kwaliteitsbeoordeling drinkwater zullen in dit hoofdstuk worden besproken.

7.1 Conclusies

Aangezien in drinkwater normaal gesproken zeer lage gehalten aan toxische stoffen voorkomen speelt bij de mengseltoxiciteit vooral de dosis-additie, en in mindere mate respons-additie, een rol. Voor stoffen die inwerken op dezelfde targets zal de combinatie werking voorspeld kunnen worden met dosis-additie. Bij een complex mengsel van stoffen zoals in (bronnen van) drinkwater is het ondoenlijk om op een stofgerichte manier deze dosis-additie vast te stellen. Dit gesommeerde effect van stoffen met eenzelfde toxisch werkingsmechanisme kan echter ook effectgericht worden vastgesteld, met verschillende specifieke *in vitro* assays. Combinatiewerkingen bij eventuele calamiteiten in de bron kunnen worden aangetoond met de *in vivo* testen uit de bioalarmering (tabel 2), waarna een innamestop van het water kan worden overwogen.

Tabel 2: Algemene toxiciteit (*in vivo* en *in vitro*): toepassing bij bioalarmering inlaat water

Effect	Geschikte bioassays
Acute toxiciteit (<i>in vivo</i>)	Microtox Algentest (PAM)
Cytotoxiciteit (<i>in vitro</i>)	apoptose celproliferatie, MTT test
Chronische toxiciteit (<i>in vivo</i>)	vissen watervlooien

De meest relevante effecten voor de mens die mogelijk kunnen ontstaan na blootstelling aan het mengsel van stoffen in drinkwater (volgens de geraadpleegde deskundigen) en waarvan de risico's met *in vitro* bioassays kunnen worden geanalyseerd zijn weergegeven in Tabel 3. Welke van deze effecten echt relevant zijn, op basis van voorkomen van de benodigde concentraties, moet uit nader onderzoek blijken.

Tabel 3: Specifieke toxiciteit (*in vitro*): toepassing van bron tot kraan

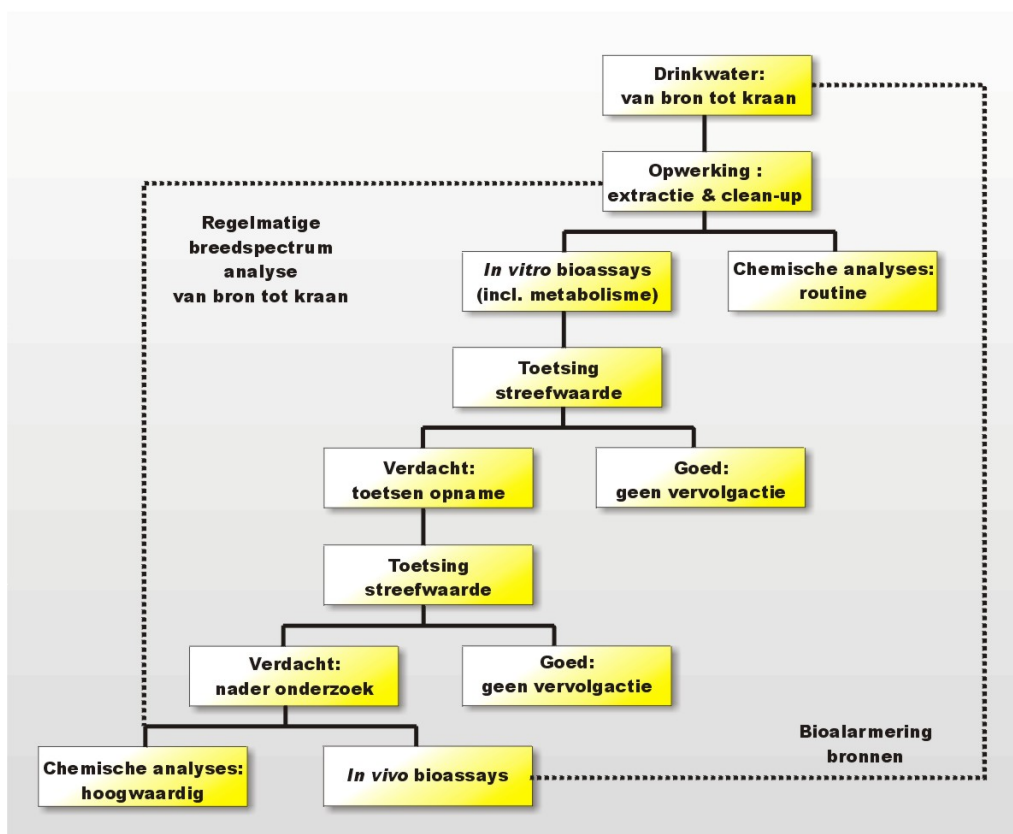
Genotoxische effecten	Ames II Comet assay, Micronucleus test
Carcinogene effecten	Intercellular communication (GJIC) DNA microarrays, diverse CALUX assays (tumor promotie)
Hormoonverstoring	5 CALUX assays (5 verschillende hormonen) Gist-assay RIKILT, (anti) aromatase assay, TTR test
Immunotoxische effecten	NF-κB-CALUX (in ontwikkeling)
Neurotoxische effecten	ACHE assay
Antibiotica test	RIZA bacteriën test
Teratogene effecten, reproductie	EST assay (stamcellen)
	fase 1 DR-CALUX
Detoxificatie	fase 2 niet relevant
	fase 3 niet relevant

7.2 Q21: strategie voor een integrale monitoring van drinkwater

Wat betreft de ideale meetstrategie voor de drinkwaterkwaliteit hebben de geraadpleegde deskundigen dezelfde mening. Een batterij effectgerichte analyses en een beperkt pakket chemische analyses kan worden toegepast als eerste *screening* methode voor waterkwaliteit. Indien de bioassays voldoende gevalideerd zijn behoeft in de toekomst alleen bij positieve resultaten in deze *screening* een uitgebreidere chemische monitoring te worden uitgevoerd. Er zal regelmatig een breedspectrum chemisch analytisch onderzoek moeten worden uitgevoerd waarmee kan worden gecontroleerd of de nieuw-aangetoonde stoffen (*emerging substances*) wel voldoende worden afgevangen met de toxicologische screening. Mogelijke toepassingen van effectgerichte toetsen bij de drinkwaterproductie zijn:

- vroege waarschuwing voor onbekende toxische stoffen in het inlaatwater (wordt reeds toegepast bij bioalarmering);
- vroege waarschuwing voor mogelijke gezondheidseffecten op de mens, van bron tot kraan;
- prioritering van monsters die in aanmerking komen voor een hoogwaardig chemisch analytisch onderzoek;
- controle bij innovatie en optimalisering van het drinkwater zuiveringsproces;
- bepalen toxische eigenschappen van aangetroffen stoffen, waarvan geen toxicologische informatie beschikbaar is;
- in de toekomst kunnen bioassays mogelijk dienen als pre-screening voor routinematige chemische analyses (kostenbesparing).

In het schema van figuur 3 is de strategie voor een integrale (chemisch-toxicologische) monitoring van drinkwater weergegeven die past in de doelstellingen van Q21.



Figuur 3: Ontwerp voor een Q21 strategie voor integrale monitoring van drinkwater.

De gestippelde lijnen geven bijzonder onderzoek aan dat nu al wordt toegepast:

- on-line *in vivo* bioassays in de bioalarmering van de bronnen
- regelmatige intensieve chemische monitoring van bron tot kraan

Hoewel met effectgerichte toetsen een goede kwantitatieve indicatie van het effect kan worden vertaald naar het aantal toxische equivalenten van de referentiestof heeft het voordelen om de bioassays in eerste aanleg alleen te gebruiken als kwalitatief *screening* instrument voor uitvoering van chemische analyses. Er zijn namelijk nog wetenschappelijke onzekerheden waardoor kwantificering met bioassays lastig is, mede door risico's op vals positieven of vals negatieven. Als de bioassays worden gebruikt als *screening* instrument ontstaat er een win-win situatie voor chemici en toxicologen: de toxicologen onderzoeken het effect van het totale mengsel (ook van onbekende stoffen) en geven de meest interessante monsters door aan de analytisch chemici, waardoor geen grote series met alleen resultaten onder de detectielimiet hoeven te worden geanalyseerd. Deze werkwijze wordt ook door het RIKILT toegepast om de gezondheidsrisico's van voedingsproducten vast te stellen (Ron Hoogenboom). Als met bioassays wordt getoetst op overschrijding van de streefwaarde kunnen de monsters worden ingedeeld in 2 categoriën: goed (geen actie) of verdacht (nader onderzoek). Bij een nader onderzoek kan in de eerste plaats worden getest of de stoffen die het waargenomen effect veroorzaken door de mens worden opgenomen (biobeschikbaarheid). De biobeschikbaarheid is afhankelijk van fysisch chemische factoren en metabolisme. De opname efficiëntie kan worden geschat met behulp van *in vitro* permeabiliteit testen, zoals de CaCo-2 test waarbij het mengsel een laag darmepitheel cellen moet passeren voordat de bioassay wordt uitgevoerd. Als het effect ook na deze voorbehandeling nog boven de streefwaarde ligt zal er een analytisch chemisch identificatie onderzoek moeten worden uitgevoerd (bijvoorbeeld met GCMS of LC-Orbi-trap). Deze strategie, die wordt toegepast bij de Toxiciteit Identificatie & Evaluatie (TIE) procedures, is ook geschikt voor de overige compartimenten van de watercyclus (oppervlaktewater, grondwater en afvalwater).

7.3 Aanbevelingen voor nader onderzoek

Bij het vaststellen van de meest relevante effecten die kunnen worden gemeten om de kwaliteit van het drinkwater te bewaken waren de deskundigen het niet altijd met elkaar eens. Het belang van de specifieke *in vitro* testen die in Tabel 2 zijn opgenomen zal daarom eerst in de praktijk moeten worden getoetst. Onderstaand worden een aantal voorstellen gegeven voor nader onderzoek om de toegevoegde waarde van effectgerichte monitoring bij de kwaliteitsbeoordeling van drinkwater te verhogen.

Analyse van de relevantie van mogelijke in vitro effecten en referentiestoffen

Om na te gaan welke effecten het meest relevant zijn moet voor alle effecten worden nagegaan of het mogelijk is dat actieve stoffen in effectieve concentraties in het oppervlaktewater aanwezig zijn en in het drinkwater terecht kunnen komen. Er kan eerst een worst-case berekening worden gemaakt van de hoogst mogelijke concentraties in drinkwater die kunnen worden vergeleken met de laagste concentraties die een effect kunnen veroorzaken (LOAEC). Deze selectie kan ook op basis van toxische potentie worden uitgevoerd. Bij de ontwikkeling van pesticiden wordt bijvoorbeeld al rekening gehouden met de humane toxiciteit, hoewel er altijd een gevaar van bioactivering is waardoor metabolieten ontstaan waarvan de toxiciteit onbekend is. Indien uit deze theoretische analyse blijkt dat er significante risico's zijn van (een groep) stoffen die een specifiek effect veroorzaken zullen monsters van verschillende bronnen worden onderzocht met bioassays om dit effect te meten (Tabel 2). Door vergelijking van beschikbare assays voor een bepaald effect kan een keuze worden gemaakt voor meest geschikte. Daarnaast is het belangrijk om in dit onderzoek te bepalen wat de meest geschikte referentiestoffen zijn voor de verschillende effecten. Ook is het nuttig om voor sommige stoffen vergelijkingen te maken met de gesommeerde chemische streefwaarden voor drinkwater (1 µg/L en 0,05 µg/L voor respectievelijk niet-genotoxische en genotoxische stoffen) en te kijken welk effect deze concentratie in de bioassays heeft. Dergelijke onderzoeken kunnen bijdragen aan een verfijning van de voorgestelde effectgerichte streefwaarden.

Onderzoek naar effecten van bron tot kraan

De minder gevoelige *in vivo* assays lijken het meest geschikt om de bronnen te monitoren, maar de *in vitro* assays kunnen door hun hoge gevoeligheid ook geschikt zijn om na de verschillende stappen in het zuiveringsproces van drinkwater te worden toegepast. Als de relevantie van een bioassay is aangetoond met een meetbaar effect in de bron (zie boven), dan zal een nader onderzoek uit moeten wijzen waar de geselecteerde bioassay kan worden toegepast (van bron tot kraan). Bij calamiteiten (bijv. terroristische aanslag met neurotoxinen) zullen ook monsters in het distributienet moeten worden onderzocht. Na de desinfectiestap zullen de effecten van mogelijke nieuw gevormde metabolieten moeten worden onderzocht. Bij UV en/of Ozon desinfectie of oxidatie zouden bijvoorbeeld carcinogene bijproducten kunnen ontstaan. Bij Moleculaire Toxicologie op de VU wordt onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van een bioassay om de effecten van electrofiele producten en radicalen te analyseren (Nico Vermeulen, VU). Een dergelijke assay zou ook zeer relevant kunnen zijn na de ozon of UV behandeling.

Onderzoek effectmonitoring in de watercyclus

Als is vastgesteld welke bioassays het meest relevant zijn voor de kwaliteitsbeoordeling van drinkwater is het belangrijk om de meerwaarde van de biomonitoring ook in de rest van de watercyclus te toetsen. Het is daarbij interessant om na te gaan of de voorgestelde effectgerichte testbatterij in staat is om de mogelijke effecten van alle 33 prioriteitstoffen van de Kaderrichtlijn Water (KRW) aan te tonen. Daarnaast is het interessant om na te gaan of met de testbatterij eerder waargenomen calamiteiten aangetoond zouden kunnen worden

(bijvoorbeeld in de Maas waar met het Daphnia alarm een verhoogde concentratie bestrijdingsmiddelen werd gevonden). Ook de mogelijke vervuilingbronnen van het oppervlaktewater (lozingen van industrie en rioolwaterzuiveringen) kunnen met effectgerichte testen worden onderzocht.

Concentreren van verontreinigingen met passieve bemonsteraars

Watermonsters kunnen op het laboratorium worden geconcentreerd maar het is ook mogelijk om de concentratie in het veld uit te voeren met passieve bemonsteraars. Het grote voordeel hiervan is dat de bemonstering geen momentopname is, maar dat er een tijdgeïntegreerd beeld ontstaat omdat de bemonsteraars gedurende meerdere weken in het water kunnen verblijven. Passieve bemonstering kan worden uitgevoerd met SPMD (*Semi Permeable Membrane Device*) voor hydrofobe stoffen, POCIS (*Polar Organic Chemical Integrative Sampler*) voor polaire organische stoffen en DGT (*Diffusive Gradient in Thin films*) voor metalen. Ook bij passieve bemonstering zal de samenstelling van het mengsel veranderen ten opzichte van het oorspronkelijke water. Passieve bemonstering wordt als een veelbelovende techniek gezien die geschikt is om de biologisch beschikbare stoffen in het milieu te concentreren (Dick Vethaak, RIKZ). Het is interessant om te onderzoeken in hoeverre deze technieken bruikbaar zijn om de verschillende stappen in de drinkwaterzuivering te bemonsteren.

7.4 Toekomstige ontwikkelingen

Afhankelijk van de resultaten van de onder 7.3 voorgestelde onderzoeksprojecten kunnen de toekomstige ontwikkelingen op het gebied van biosensoren en toxicogenomics worden gebruikt om de effectgerichte monitoring verder te optimaliseren. Als is vastgesteld wat de meest relevante effectgerichte parameters zijn voor de verschillende fasen van het drinkwaterbereidingproces, dan kan onderzoek worden uitgevoerd naar een verhoging van de efficiëntie van deze bioanalyses, bijvoorbeeld door verdergaande automatisering in de vorm van on-line biosensoren of *lab-on-a-chip* technieken. Deze sensoren kunnen zonodig ook worden ingebouwd in het distributienet als beveiliging tegen calamiteiten door terroristische acties. Een overzicht van deze technieken is bijvoorbeeld te vinden in Allan et al. (2006).

Moderne technieken zoals genomics, proteomics en metabolomics worden nu reeds toegepast bij de ontwikkeling van nieuwe gevoelige en selectieve biologische effect-indicatoren (biomarkers). Met deze technieken kunnen met een enkele analyse de responsen van duizenden genen, eiwitten of metabolieten in een organisme worden bestudeerd na blootstelling aan toxische stoffen. In eerste aanleg waren de genomics technieken alleen bruikbaar voor onderzoek in organismen die waren blootgesteld aan enkele stoffen of simpele mengsels. Uit recent onderzoek met vissen blijkt echter dat ook de effecten van complexe milieumonsters kunnen worden gekarakteriseerd en geïdentificeerd (Williams et al., 2007). Dit biedt mogelijkheden om bijvoorbeeld vissen of watervlooien (*Daphnia magna*) in de bioalarmering van de drinkwater inlaatstations met deze techniek te onderzoeken. Als indicatie voor mogelijke effecten kan worden vastgesteld van welke genen de expressie verandert na blootstelling aan het water van de bronnen. Met deze gevoelige techniek is het mogelijk om de effecten van alle in het water aanwezige stoffen te registreren op een set van ca. 20.000 genen.

Op termijn kan het mogelijk zijn om het '-omics' onderzoek uit te voeren met een celkweek, zodat geen proefdieren meer nodig zijn. Om een betere extrapolatie naar de mens mogelijk te maken zouden DNA arrays van humane cellijnen kunnen worden ontwikkeld. In een later stadium van het onderzoek kunnen meer specifieke DNA arrays worden samengesteld waarop alleen de relevante genen met de voor de waterkwaliteit belangrijkste informatie worden aangebracht. Vergelijkbaar onderzoek kan worden uitgevoerd met proteomics technieken,

waarbij afwijkingen in de eiwitpatronen van de blootgestelde organismen worden bestudeerd. Er zijn echter de nodige complicaties die een snelle toepassing van deze technieken in de weg staan. Zo is er bijvoorbeeld waargenomen dat de aard van de responsen op de genexpressie dosis afhankelijk kan zijn, en daarmee niet direct te linken aan bepaalde werkingsmechanismen. Daarnaast moet er nog de nodige software worden ontwikkeld om de enorme hoeveelheid data goed te kunnen interpreteren. De technieken zijn dus veelbelovend, maar er is nog erg veel ontwikkelingswerk nodig.

8 Geraadpleegde deskundigen

Met de onderstaande personen is een gesprek gevoerd over de beoordeling van mengseltoxiciteit in de drinkwaterwereld. Hun meningen zijn in het rapport verwoord. De volgorde is chronologisch, op basis van de data van de gesprekken.

Gert-Jan de Maagd, 25 april 2007
Ministerie van Verkeer & Waterstaat (V&W)

Marijke Ferdinandy, Edwin Roex & Serge Rotteveel, 30 mei 2007
Rijkswaterstaat-RIZA (RIZA), nu de Waterdienst & Deltares.

Bram Brouwer, 1 juni 2007
Instituut voor Milieuvraagstukken (IVM) en Biodetection Systems BV (BDS)

Martin van den Berg, 4 juni 2007
Universiteit van Utrecht, Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS)

Ans Versteegh & Bianca van der Ven, 4 juni 2007
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)

Nico Vermeulen, 15 juni 2007
Vrije Universiteit Amsterdam (VU), Moleculaire Toxicologie

Ron Hoogenboom, 29 juni 2007 (en Toine Bovee, 13 juni)
RIKILT Instituut voor Voedselveiligheid (RIKILT)

John Groten, 6 juli 2007
Universiteit van Wageningen (WUR) & Organon, Toxicology & Drug Disposition

Dick Vethaak & Cor Schipper, 12 juli 2007
Rijkswaterstaat-RIKZ (RIKZ), nu Deltares.

9 Literatuur

- Abrahamse A**, Siegers W en Puijker L, 2007. Verwijdering van hormoonverstorende stoffen bij de drinkwaterbereiding, vastgesteld met ER-CALUX. KIWA Water Research rapport BTO 2006.044 (vertrouwelijk).
- Alink GM**, Quik JTK, Penders EJM, Spenkelink A, Rotteveel SGP, Maas JL, Hoogenboezem W, 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. *Mut.n Res.* 631: 93-100.
- Allen IJ**, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B en Gonzalez C, 2006. A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69: 302-322.
- Bovee T**, 2006. Development, validation and routine application of the in vitro REA and DR-CALUX reporter gene bioassays for the screening of estrogenic compounds and dioxins in food and feed. *Academisch Proefschrift, Universiteit van Wageningen*, ISBN: 90-8504-393-X.
- De Hoogh CJ**, Wagenvoort AJ, Jonker F, Van Leerdam JA en Hogenboom AC, 2006. HPLC-DAD and Q-TOF MS techniques to identify cause of *Daphnia* biomonitor alarm in the river Meuse, *Environ. Sci. Technol.* 40: 2678-2685.
- Den Besten P**, 2006. "Biological Effects of Contaminants in Marine Pelagic Ecosystems", Ketil Hylland, Thomas Lang, Dick Vethaak, Eds. SETAC publication, ISBN: 978-1-880611-84-5, pp. 475.
- Depledge MH** and Fossi MC, 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Ecotoxicology* 3: 161-172.
- De Voogt P**, Belfroid AC, De Boer J & Rijs GBJ, 2006. Efficacy of wastewater treatment plants in the Netherlands for removal of estrogens and xenoestrogens, in: Estrogens and xenoestrogens in the aquatic environment, Vethaak, Schrap & De Voogt, Eds., SETAC publication, ISBN: 978-1-880611-85-2, pp. 19-52.
- DGW**, 2006. Evaluatie van de Chemie-Toxiciteit-Toets. Rapport Directoraat Generaal Water (DGW), Ministerie van Verkeer en Waterstaat.
- Feron VJ**, Groten JP, Jonker D, Cassee FR en Van Bladeren PJ, 1995. Toxicology of chemical mixtures: challenges for today and the future. *Toxicology* 105: 415-428.
- Gezondheidsraad**, 1988. Asbest. Toetsing van een ontwerp-basisdocument. Den Haag; publicatie nr 1988/31.
- Gezondheidsraad**, 2001. Onderzoek gezondheidsrisico's stoffen: een gerichtere benadering. Rapport Gezondheidsraad Den Haag; publicatie nr. 2001/24.
- Groten JP**, Feron VJ en Suhnel J, 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharm. Sci.* 22: 316-322.
- GWRC**, 2008. Global Water Research Coalition. Tools to detect estrogenic activity in environmental waters, by Frederic DL Leusch, CRC Water Quality and Treatment. GWRC report, London, UK.
- Heringa M**, 2005. Approach for assessment of carcinogenic activity in water – part 1. Kiwa WR BTO rapport 2005.022.
- Jonker D**, Freidig AP, Groten JP, De Hollander AEM, Stierum RH, Woutersen RA en Feron VJ, 2004. Safety evaluation of chemical mixtures and combinations of chemical and non-chemical stressors. *Rev. Environ. Health* 19: 83-139.
- Jung DKJ**, Klaus T, en Fent K, 2001. Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons azaarenes, and binary mixtures in fish Hepatoma cell line PLHC-1. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 149-159.

- KIWA-WR**, 2004. Waterkwaliteitsdoelen Q21, 2^e concept. KIWA Water Research rapport BTO 2004.042.
- Legler J**, Dennekamp M, Vethaak AD, Brouwer A, Koeman JH, Van der Burg B & Murk AJ (2002). Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *Sci. Total Environ.* 293: 69-83.
- Legler J**, Bulder AS, De Voogd P, Leonards PEG en Murk AJ, 2006. Bioanalysis of estrogenic end dioxin-like activity in field samples, in: Estrogens and Xenoestrogens in the aquatic environment, Vethaak, Schrap & De Voogt, Eds. SETAC publication, ISBN: 978-1-880611-85-2, pp. 121-150.
- Legler j**, Van der Zee M, Van der Ven LTM, Jonkers N, Vettheek AD, Van der Burg B en Murk AJ, 2006. Bioanalysis of the exposure and effects of estrogenic chemicals in the aquatic environment with an in vivo transgenic zebrafish reporter gene assay, in: Estrogens and Xenoestrogens in the aquatic environment, Vethaak, Schrap & De Voogt, Eds., SETAC publication, ISBN: 978-1-880611-85-2, pp. 283-314.
- Lewtas J**, 1985. Development of a comparative potency method for cancer risk assessment of complex mixtures using short-term in vivo and in vitro bioassays. *Toxicol. Ind. Health* 1: 193.
- Maas JL**, Van de Plasche EJ, Straetmans A, Vethaak AD en Belfroid AC, 2003. Normstelling voor bioassays. RIZA rapport 2003.005, pp. 66.
- Maas JL**, Van den Heuvel-Greve MJ, 2005. Opportunities for bio-analysis in WFD chemical monitoring using bioassays. RIZA working document 2005.053X, draft. pp. 52.
- Mennes W**, 2004. Assessment of human health risks for oestrogenic activity detected in water samples, using the ER-CALUX assay. Bijlage 1 bij RIVM/SIR rapport.
- Meulenberg EP** en Marchesini G, 2006. Biosensor screening of surface water samples for thyroid hormone-like activity. ELTI-rapport 2006-1.
- Mons MN**, Hogenboom AC, Noij THM, 2003. Pharmaceuticals and drinking water supply in the Netherlands. Kiwa BTO rapport 2003.040.
- Mumtaz MM** en Durkin PRA, 1992. Weight-of-evidence approach for assessing interactions in chemical mixtures. *Toxicol. Ind. Health.* 8: 377-406.
- Murk AJ**, Legler J, Van Lipzig MMH, Meerman JHN, Belfroid AC, Spenkelink A, Van der Burg B, Rijs GBJ en Vethaak D, 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 16-23.
- NAS** (National Academy of Sciences), 1989. Risk assessment of mixtures of systemic toxicants in drinking water. *Drinking Water and Health*, N.R. Safe Drinking Water Committee, Ed. (National Academy Press, DC), p. 121.
- Pieters MN**, Könemann WH, 1997. Mengseltoxiciteit: een algemeen overzicht en evaluatie van de veiligheidsfactor van 100 toegepast in het stoffenbeleid. Bilthoven: RIVM (rapport nr 620110 004).
- Plackett RL**, Hewlett PS, 1952. Quantal responses to mixtures of poisons. *J. Royal Stat. Soc., Series B* 14: 143-163.
- Rajapakse N**, Silva E en Kortenkamp A, 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action, *Environ. Health Perspect.*, 110: 917-921.
- Roex, E**, Rotteveel S, Ferdinandy M en Bakker V, 2007. Totaal-effluentbeoordeling toegepast in de praktijk, *H₂O* 10: 55-57.
- Rothman KJ**, 1976. Causes. *Am. J. Epidemiol.* 104: 587-592.
- Safe S.**, 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* 21: 51-88.
- Schoeny RS** en Margosches, 1989. Evaluating comparative potencies: developing approaches to risk assessment of chemical mixtures. *Toxicol. Ind. Health* 5: 825.

- Simmons J**, Richardson S, Speth T, Miltner R, Rice G, Schenck K, 2002. Development of a research strategy for integrated technology-based toxicological and chemical evaluation of complex mixtures of drinking water disinfection by-products. *Environ. Health Perspect.* 110 (suppl 6): 1013-1024.
- Sonneveld E**, Riteco JA, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG en van der Burg B, 2006. Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.* 89: 173-187.
- Stroomberg G**, Rotteveel S, Bouter A, Tiesnitsch J en Steab j, 2006. Antibiotica in oppervlakte- en afvalwater. Rijkswaterstaat werkdokument 2006.084X.
- Tajima O**, Schoen ED, Feron VJ en Groten JP, 2002. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of Fusarium mycotoxins for possible interactions. *Food Chem. Tox.* 40: 685-695.
- Teuschler L**, Klaunig J, Carney E, Chambers J, Conolly R, Gennings C, 2002. Support of the science-based decisions concerning evaluation of the toxicology of mixtures: a new beginning. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36: 34-39.
- US EPA** (United States Environmental Protection Agency), 1986. Guideline for the health risk assessment of chemical mixtures. *Fed. Regist.* 51, 34014.
- US EPA** (United States Environmental Protection Agency), 1999. Guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. EPA report NCEA-C-0148.
- US EPA** (United States Environmental Protection Agency), 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. EPA 630/R-00/002. Washington, DC, US EPA Risk Assessment Forum.
- Van der Hoek JP**, Stoks P, Mons M en van der Kooij D, 2008. Visie op streefwaarden voor milieuvreemde stoffen in drinkwater. *H₂O*, nummer 4: 33-35.
- Van der Oost R**, Beyer J en Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.
- Van Genderen J** en Stoks PG, 2004. Toxicologische evaluatie van organische microverontreinigingen 1998 – 2002. RIWA rapport, ISBN: 90-6683-112-x.
- Vermeire TG**, Van Apeldoorn, ME, De Fouw, JC, Jansen PJCM, 1991. Voorstel voor humaan-toxicologische onderbouwing van C-toetsingswaarden, Bilthoven, RIVM (rapport nr 725201 005).
- Williams TD**, Ortega F, Diab A, Falciani F, Gerge S en Chipman JK, 2007. Genomic responses to chemicals in the European flounder and identification of gene-sets predictive of origin of fish from the environment. PRIMO 14 conference, May 6-9, Florianopolis, Brazil.
- Wolterink G**, Van Engelen JGM en Van Raaij MTM, 2007. Guidance for assessment of chemical risks for children, RIVM rapport 320012001/2007.

