



Veilige waterwingebieden: bedreigingen door chemische verontreinigingen

Resultaten eerste fase

BTO 2008.060
December 2008

KWR

Watercycle Research Institute



Veilige waterwingebieden: bedreigingen door chemische verontreinigingen

Resultaten eerste fase

BTO 2008.060
December 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

Veilige waterwingebieden: bedreigingen door chemische verontreinigingen
Resultaten eerste fase

Projectnummer

11.1520.030

Projectmanager

W.K. Senden

Opdrachtgever

Gezamenlijke waterbedrijven, College van Opdrachtgevers (CvO)

Kwaliteitsborger(s)

A.C. Hogenboom, M.L.M. Balemans

Auteur(s)

L.M. Puijker, C.G.E.M. van Beek, A. Brandt, M.B. Heringa en J.A. van Leerdam

Verzonden aan

Waterbedrijven die participeren in het BTO.

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is verder niet openbaar.

Voorwoord

Het in dit rapport beschreven project maakt deel uit van het bedrijfstakonderzoek (BTO) van de gezamenlijke waterbedrijven.

Het onderzoeksproject 'Veilige waterwingebieden', dat uit meerdere deelprojecten bestaat, heeft als doel de bedreiging van waterwingebieden in kaart te brengen door onder meer de microbiologische en chemische waterkwaliteit te onderzoeken. In deelproject 5 : 'Evaluatie mate van bescherming waterwingebieden tegen nieuwe chemische verontreinigingen' is onderzoek uitgevoerd naar de bedreiging door chemische verontreinigingen.

Dit rapport is een tussentijdse rapportage van resultaten van de eerste fase van het BTO-project: 'Veilige Waterwingebieden: Evaluatie mate van bescherming waterwingebieden tegen nieuwe chemische verontreinigingen'.

De eerste fase van dit onderzoek, waarvan de resultaten in deze rapportage zijn opgenomen, is uitgevoerd in 2005.

De vervolgfases van het onderzoek worden uitgevoerd in de periode tot 2008 onder de projectnaam: Screening waterquality from source to tap.
In een later stadium wordt over de resultaten van het vervolg apart gerapporteerd.

Samenvatting

In het kader van het bedrijfstakonderzoek (BTO) van de gezamenlijke waterbedrijven is in 2005 onderzoek gestart naar de bedreiging van het grondwater door organische microverontreinigingen. Het onderzoek richtte zich speciaal op polaire stoffen. Juist deze stoffen kunnen het grondwater bedreigen door hun relatief hoge mobiliteit in de bodem, waarmee ze mogelijk een bedreiging vormen voor het drinkwater. Bovendien zijn deze stoffen moeilijk te verwijderen met de voor grondwater gebruikelijke zuiveringsstappen zoals beluchting en filtratie. Bij dit onderzoek is een nieuwe screeningstechniek, gebaseerd op een isolatie van stoffen uit het water met een vaste fase (SPE), een vloeistofchromatografische scheiding en detectie van stoffen met een 2-tal detectoren (gebaseerd op UV absorptie en massaspectrometrie) toegepast waarmee vooral ook polaire stoffen kunnen worden aangetoond.

In dit rapport zijn de tussentijdse resultaten van de eerste fase van dit screeningsonderzoek beschreven.

Het onderzoek is uitgevoerd op 25 geselecteerde kwetsbare grondwaterwoningen. In mei 2005 heeft een eerste screening plaatsgevonden van de grondwaterkwaliteit van bedreigde individuele winputten. In september-oktober 2005 heeft ter bevestiging een tweede screening plaatsgevonden van het onttrokken grondwater van een aantal van dezelfde individuele putten, aangevuld met monsters van het gemengde ruwwater en het reine water. Daarnaast is een screening uitgevoerd van genotoxische effecten door meting van de mutageniteit en de oestrogene activiteit.

In de meeste voor het onderzoek geselecteerde bedreigde winningen zijn onbekende stoffen aangetroffen. Het aantal aangetroffen stoffen in grondwatermonsters bedroeg in een 6-tal winningen meer dan 10 stoffen, tot meer dan 30, terwijl de geschatte totale concentratie op enkele locaties meer dan 25 µg/l bedroeg. Ook in het gemengde ruwe water en drinkwater zijn een groot aantal stoffen aangetroffen, in beduidend lagere concentraties. Het betreft zeer waarschijnlijk verontreinigingen gezien het feit dat in vergelijkbare grondwatermonsters van onverdachte locaties geen stoffen worden aangetroffen. *De opgegeven concentraties betreffen slechts zeer ruwe schattingen! De werkelijke concentraties van de aangetroffen stoffen kunnen aanzienlijk afwijken van de geschatte concentraties doordat de gevoeligheid of respons van de twee toegepaste detectiemethoden voor de aangetroffen onbekende stoffen niet bekend is.*

Bij het onderzoek naar de mogelijke betekenis van de aangetroffen stoffen met screeningstechnieken voor respectievelijk genotoxische effecten en hormoonverstorende effecten (oestrogene activiteit) is *geen of een verwaarloosbaar effect in drinkwater vastgesteld.*

In de vervolgfase (2006-2007) zal het onderzoek zich volgens plan vooral richten op het vaststellen van de aard (identificatie) en de concentratie van de aangetroffen stoffen. Daarbij zal voor geïdentificeerde stoffen een toxicologische evaluatie van de betekenis van deze stoffen voor de kwaliteit van het drinkwater plaatsvinden. Voor dit vervolgonderzoek worden in overleg met betrokken waterbedrijven winningen geselecteerd. Bij dit vervolgonderzoek worden ook de laboratoria van de waterbedrijven betrokken. Het onderzoek zal uitgebreid worden naar de overige kwetsbare grondwaterwoningen en locaties waar oevergrondwater en oppervlaktewater als grondstof worden gebruikt.

De resultaten van het onderzoek worden gebruikt bij het opstellen van een monitoringstrategie voor de screening van (de ontwikkeling van) de kwaliteit van het drinkwater bereid uit diverse bronnen. De toegepaste SPE-HPLC-UV/DAD-QToF/MS methode vormt een zeer krachtig hulpmiddel voor het maken van waterkwaliteitsprofielen.

Inhoud

Voorwoord	1
Samenvatting	3
Inhoud	5
1 Inleiding	7
1.1 Aanleiding	7
1.2 Doelstelling onderzoek	7
1.3 Opzet van het onderzoek	7
1.4 Leeswijzer	9
2 Selectie van kwetsbare grondwaterwinningen	11
3 Uitvoering onderzoek	13
3.1 Monstername	13
3.2 Screening op onbekenden m.b.v. HPLC-UV/DAD-QToF/MS	13
3.2.1 Voorbehandeling, isolatie en scheiding van stoffen	13
3.2.2 Detectie met UV-DAD	13
3.2.3 Detectie met QToF-MS	16
3.3 Onderzoek genotoxiciteit	17
3.3.1 Voorbehandeling watermonsters t.b.v. de umu-test	17
3.3.2 Uitvoering umu test	17
3.4 Meting oestrogene activiteit	19
3.4.1 Isolatie van oestrogene stoffen	19
4 Resultaten van het onderzoek	21
4.1 Screening van onbekende organische microverontreinigingen, juni 2005	21
4.2 Screening van onbekende organische microverontreinigingen, najaar 2005	24
4.3 Onderzoek naar identiteit van aangetroffen stoffen	24
4.4 Onderzoek naar genotoxiciteit	26
4.5 Onderzoek naar oestrogene activiteit	28
5 Evaluatie van gegevens van screening onbekende stoffen	31
5.1 Vergelijking van meetgegevens voor grondwatermonsters afkomstig van dezelfde winning	31
5.2 Relaties tussen aangetroffen stoffen in winningen met een vergelijkbaar landgebruik	32
6 Conclusies en vervolgonderzoek	33
6.1 Conclusies	33

6.2	Vervolgonderzoek	33
7	literatuur	35
Bijlage I	Beschrijving toegepaste screeningsmethoden	37
Bijlage II	Meting van genotoxiciteit m.b.v. umutest	39
Bijlage III	Resultaten van individuele winningen	43
Bijlage IV	Relaties monsterlocaties en landgebruik	53

1 Inleiding

Als onderdeel van het gezamenlijke onderzoeksprogramma van de drinkwaterbedrijven is in 2004 het onderzoeksproject 'Veilige waterwingebieden' gestart. Het algemene doel van dit project, dat uit meerdere deelprojecten bestaat, is de bedreiging van waterwingebieden in kaart te brengen door onder meer de microbiologische en chemische waterkwaliteit te onderzoeken. In deelproject 5 : 'Evaluatie mate van bescherming waterwingebieden tegen nieuwe chemische verontreinigingen' is onderzoek uitgevoerd naar de bedreiging door chemische verontreinigingen.

1.1 Aanleiding

Uit onderzoek naar en sanering van bodemverontreinigingen in Nederland is sinds de laatste 25 jaren bekend dat tientallen organische stoffen de kwaliteit van het grondwater ernstig kunnen bedreigen. Het betreft onder meer:

- vluchtige chloorhoudende oplosmiddelen zoals tri, tetra, etc.
- BTEX aromaten: benzeen, toluen, ethylbenzeen, xylenen
- Polycyclische koolwaterstoffen

Onderzoek door drinkwaterbedrijven naar het voorkomen van organische microverontreinigingen met brede screeningstechnieken in onttrokken grondwater en drinkwater geeft eenzelfde beeld. In de afgelopen jaren uitgevoerd onderzoek door de VEWIN samen met waterbedrijven toont aan dat MTBE een nieuwe bedreiging vormt.

Eind jaren 80 zijn alle grondwaterwinningen in Nederland onderzocht, waarbij op meerdere locaties verontreiniging van het grondwater met onder meer 1,2-dichloorpropaan (DCP) en andere vluchtige organochloor-verbindingen werd geconstateerd, (Veenendaal *et al.*, 1987) . In de jaren 95-98 is dit onderzoek als onderdeel van het gezamenlijke onderzoeksprogramma van de drinkwaterbedrijven in kwetsbare winningen herhaald, toen werden met name diverse bestrijdingsmiddelen aangetroffen (Puijker en Van Beek, 1999).

Onbekend is in welke mate andere dan bovengenoemde stoffen zoals hormoonverstorende stoffen (EDCs), geneesmiddelen, oplosmiddelen, componenten van brandstoffen, biociden, reinigingsmiddelen, ontsmettingsmiddelen en andere op dit moment nog onbekende verbindingen ('emerging substances' genoemd) het grondwater bedreigen.

1.2 Doelstelling onderzoek

Onderzoek de bedreiging van het grondwater en het daaruit geproduceerde drinkwater voor nieuwe chemische stoffen door:

- Meting van concentraties van chemische stoffen in het onttrokken grondwater en het drinkwater, mede met behulp van nieuwe screeningstechnieken.
- Evaluatie van de betekenis van mogelijk aangetroffen concentraties van stoffen.

1.3 Opzet van het onderzoek

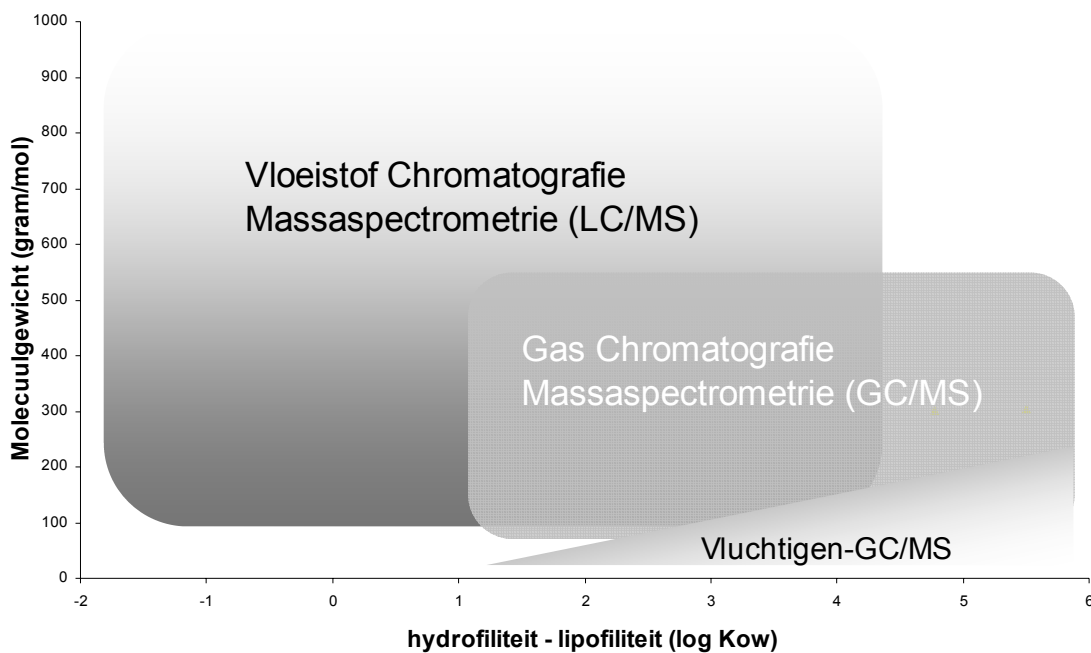
De eerste fase van het onderzoek is uitgevoerd op een selectie van kwetsbare grondwaterwinningen van een vijftal waterbedrijven. Het onderzoek is uitgevoerd in het onttrokken grondwater van individuele pomputten, het gemengde ruwwater en het drinkwater van een 20-tal winningen.

Tijdens de eerste meetronde in juni 2005 is eerst het grondwater van de meest bedreigde individuele pompputten onderzocht. Tijdens de tweede meetronde is ook het gemengde ruwe water en het drinkwater onderzocht.

Nieuwe screeningstechniek

Bij het onderzoek is onder meer een nieuwe screeningstechniek ingezet die al langer wordt toegepast bij het onderzoek naar de aanwezigheid van onbekende organische microverontreinigingen in oppervlaktewaterwater.

Deze HPLC/UV-DAD/QToFMS-techniek is gebaseerd op een on-line isolatietechniek door middel van een vastefase extractie, gevolgd door vloeistofchromatografie en een UV-absorptie en een massaspectrometrische detectietechniek. Met deze combinatie van vloeistofchromatografie en een 2-tal detectietechnieken kan een breed scala aan stoffen gemeten worden, met name ook polaire stoffen. Juist deze stoffen kunnen door hun hoge mobiliteit in de bodem een bedreiging vormen voor de kwaliteit van het grondwater. Toch kent ook deze screeningstechniek zijn beperkingen: stoffen moeten, om gedetecteerd te kunnen worden, UV absorberen of protoneerbaar zijn. Zo zullen bijvoorbeeld een aantal alifatische (chloorhoudende) verbindingen niet gedetecteerd worden. Hiervoor zal een aparte GC/MS screening uitgevoerd moeten worden, in combinatie met een isolatie van stoffen via een gasstripmethode of een vloeistofextractie. Deze laatstgenoemde methoden zijn niet geschikt voor polaire verbindingen. In figuur 1 is schematisch een overzicht gegeven van het toepassingsgebied van de verschillende screeningstechnieken voor organische microverontreinigingen.



Figuur 1 Screening van organische stoffen met behulp van diverse screeningstechnieken.

Omdat met deze screeningstechnieken in eerste instantie een kwaliteitsprofiel van het water wordt verkregen en identificatie van de aangetroffen stoffen in de eerste fase van het onderzoek maar in beperkte mate mogelijk was, is tijdens de tweede meetronde aanvullend onderzoek uitgevoerd in de gemengde ruwwatermonsters en het drinkwater naar de mogelijke effecten van aanwezige stoffen met een tweetal bioassays. Hiervoor zijn de umu-test voor bepaling van de genotoxiciteit en de ER-CALUX® test voor bepaling van de oestrogene activiteit uitgevoerd. Hiermee kan een beeld van de waterkwaliteit verkregen worden en de mogelijke gevolgen voor de drinkwaterkwaliteit.

Tweede fase

In de tweede fase van het project zal in de periode 2006 – 2007 verder onderzoek plaatsvinden naar de identiteit en concentraties van aangetroffen stoffen waarna met behulp van toxicologische data ook een verdere evaluatie van de gezondheidkundige betekenis van aangetroffen stoffen voor de consumptie van drinkwater kan plaatsvinden.

1.4 Leeswijzer

Deze rapportage richt zich op de resultaten van het onderzoek dat in 2005 is uitgevoerd, deze zijn beschreven in hoofdstuk 4. Voor het onderzoek zijn kwetsbare grondwaterwinningen geselecteerd. Deze selectie is beschreven in hoofdstuk 2. De gevolgde werkwijze in het onderzoek is toegelicht in hoofdstuk 3.

De resultaten zijn geëvalueerd op hun waarde. De vergelijking tussen verschillende grondwatermonsters van dezelfde winning en de relaties met het landgebruik zijn beschreven in hoofdstuk 5.

Conclusies en een doorkijk naar het vervolgonderzoek zijn opgenomen in hoofdstuk 6.

Achtergrondinformatie over werkwijze, landgebruik en resultaten van de diverse winningen zijn opgenomen in de bijlagen.

2 Selectie van kwetsbare grondwaterwinningen

Er is een selectie gemaakt van kwetsbare winningen die in het onderzoek betrokken zijn. Tijdens het onderzoek zijn daar om diverse redenen enkele winningen aan toegevoegd, bijvoorbeeld omdat er tegelijkertijd ook ander onderzoek werd uitgevoerd.

Om een goed beeld te verkrijgen is voor deze inventarisatie van de grondwaterkwaliteit een grote diversiteit van typen winningen nagestreefd. Daarbij zijn onder meer de volgende criteria gehanteerd: spreiding over kwetsbare grondwatergebieden in Nederland en verschil in bodemeigenschappen: bodemsamenstelling, redox-milieu en pH, en het landgebruik in het intrekgebied.

Het betreft meestal winningen waar al eerder verontreinigingen van antropogene herkomst zijn vastgesteld. De meest waarschijnlijke relatie met het landgebruik is voor de diverse individuele winputten van een winning in bijlage 4 vermeld. Voor verzameld ruw en drinkwater is deze relatie vaak minder éénduidig.

Tabel 1 Overzicht en kenmerken van de voor de eerste fase van het onderzoek geselecteerde kwetsbare winningen.

Water-bedrijf	Homogeen gebied							Landgebruik/intrekgebied
	Kalkrijk pyriet	Kalkloos pyriet	Keileem	Loess	Kleine stuwwal	Grote stuwwal	Polder	
	Anaeroob Basisch	Half aeroob Zuur	Half aeroob Basisch	Aeroob Basisch	Half aeroob Basisch/zuur	Aeroob Zuur	Anaeroob Basisch	
1			1-1					Landbouw/Natuur
			1-2					Stedelijk gebied/Landbouw
			1-3					Landbouw/Natuur/Infiltratie
			1-4					Natuur
2					2-1 ¹⁾			Natuur/Landbouw
		2-2						Landbouw
	2-3 ⁵⁾							Landbouw
					2-4 ¹⁾			Landbouw/Stedelijk gebied
	2-5							Stedelijk gebied/Infiltratie
							2-6	Landbouw/Stedelijk gebied
						2-7 ^{1), 2)}		Natuur/Stedelijk gebied
3							3-1	Landbouw/Infiltratie
						3-2 ³⁾		Natuur/Landbouw
						3-3 ⁴⁾		Natuur/Stedelijk gebied
						3-4 ³⁾		Natuur/Stedelijk gebied
						3-5		Stedelijk gebied/Bedrijven
						3-6 ³⁾		Natuur, Vliegbasis
4		4-1 ³⁾						Stedelijk gebied/Natuur
		4-2						Landbouw
							4-3	Landbouw/Infiltratie
5				5-1				Natuur/Landbouw
				5-2 ³⁾				Landbouw
				5-3				Stedelijk gebied
				5-4				Landbouw
				5-5				Stedelijk gebied

Opmerkingen bij tabel 1:

- 1) Spoorweg
- 2) Onttrokken grondwater bevat MTBE
- 3) Stort
- 4) Lozing rioolwater, grondwater bevat vluchtige halogeenverbindingen
- 5) In onttrokken grondwater zijn aangetoond bentazon, MCPP en MCPA

3 Uitvoering onderzoek

3.1 Monstername

De eerste bemonstering van het onttrokken grondwater van de geselecteerde winningen is in juni 2005 door de betreffende waterbedrijven uitgevoerd. De bemonstering voor de tweede meetronde in de periode september - november 2005 is op identieke wijze uitgevoerd door Kiwa Water Research. Voor deze tweede bemonstering zijn speciaal gereinigde glazen flessen met een inhoud van 1 liter gebruikt. Voorafgaand aan de monsterneming zijn tappunten doorgespoeld met 50 liter van het te bemonsteren water.

3.2 Screening op onbekenden m.b.v. HPLC-UV/DAD-QToF/MS

3.2.1 Voorbehandeling, isolatie en scheiding van stoffen

Het monster is gefiltreerd over een 0,45 µm filter (Satorius cellulose nitraat filter). Vervolgens zijn interne standaardstoffen fenuron en chlooroxuron toegevoegd in een concentratie van 1,7 µg/l, (zie ook bijlage I).

Het monster is on-line geëxtraheerd met behulp van een automatische monsterwisselaar. Het monstervolume was 60 ml. Voor bepaling van de blanco componenten is zeer zuiver water gefiltreerd en geanalyseerd. Voor de extractie bij lage pH en scheiding zijn de monsters en het eluens aangezuurd met 500 µl trifluorazijnzuur per liter (de pH is dan circa 2,3).

De extractie van het monster is on-line uitgevoerd op een 20x3 mm (i.d.) kolom, gepakt met Oasis HLB (Waters). Deze preconcentratiekolom is gemonteerd op de injectiekraan van de autosampler en vervangt de injectielus.

Voor de scheiding van de componenten is een kolom van 250 x 4,6 mm (i.d.) gebruikt gepakt met Omnispher C18. Voor deze analytische kolom is een 'Phenomenex Security Guard' guard-kolom geïnstalleerd.

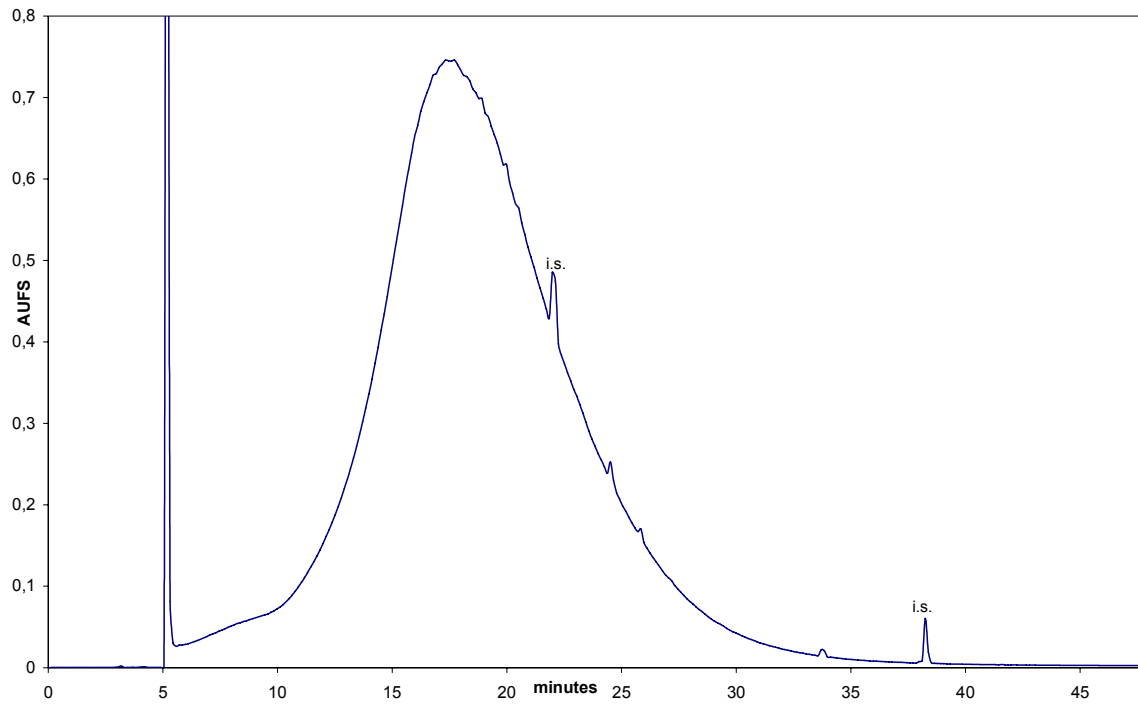
3.2.2 Detectie met UV-DAD

De gescheiden componenten worden door een UV-diode array detector (DAD) geleid. Van elke piek wordt op deze manier een UV-spectrum verkregen in het golflengtegebied van 200 tot 350 nm.

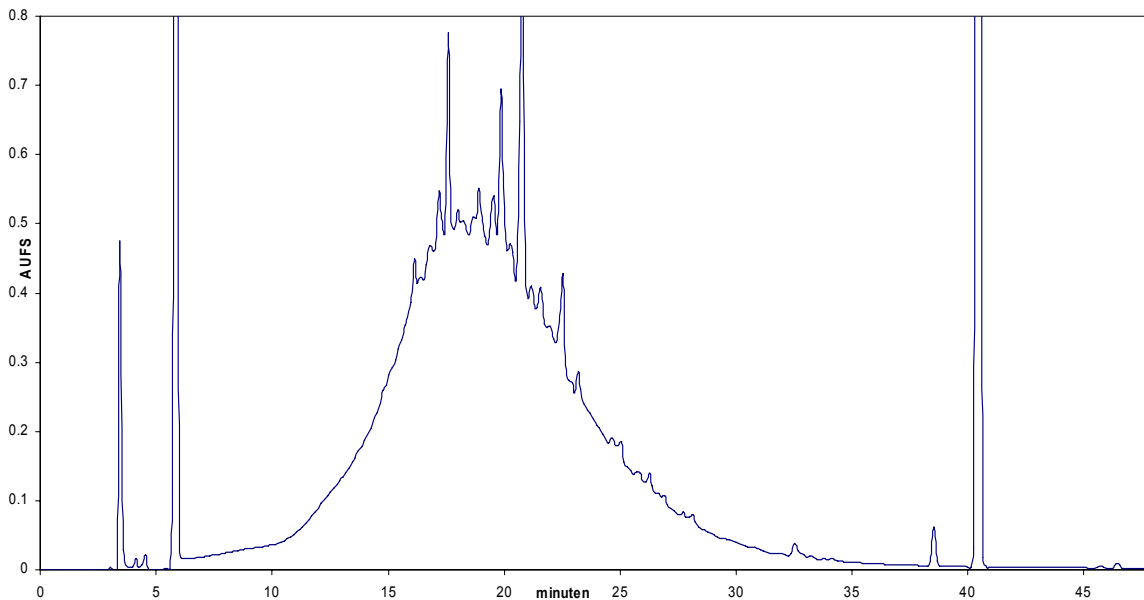
De chromatogrammen van de monsters zijn met de zogenaamde Maxplot weergegeven. Maxplot heeft als voordeel dat alle UV absorberende stoffen in een bepaald gebied zichtbaar zijn (hier 200 tot 350 nm). Dit in tegenstelling tot het meten bij een vaste golflengte waarbij alleen die stoffen zichtbaar zijn die op die golflengte UV absorberen en alle andere stoffen niet (Brandt, 2004).

Aan de hand van de toegevoegde interne standaardstoffen fenuron en chlooroxuron zijn alle retentietijden omgerekend naar zogenaamde KRetI-retentietijden (Bobeldijk, 2000 en 2002).

De gevonden piekhoogten zijn aan de hand van de toegevoegde interne standaardstof gekwantificeerd als µg/l chlooroxuron (Cx). Zo wordt een geschatte concentratie berekend relatief ten opzichte van chlooroxuron. De werkelijke concentraties kunnen significant afwijken doordat de gevoeligheid van de detector voor onbekende stoffen niet bekend is en kan afwijken van de respons voor chlooroxuron. De resultaten zijn gecorrigeerd voor stoffen die ook bij de blanco-analyse zijn aangetroffen. Enkele voorbeelden van kwaliteitsprofielen van grondwatermonsters zijn in onderstaande figuren 2 t/m 4 weergegeven.



Figuur 3 *Kwaliteitsprofiel opgenomen met UV detectie van een onverdacht 'schoon' grondwatermonster met een relatief hoog DOC-gehalte en twee toegevoegde interne standaardstoffen.*



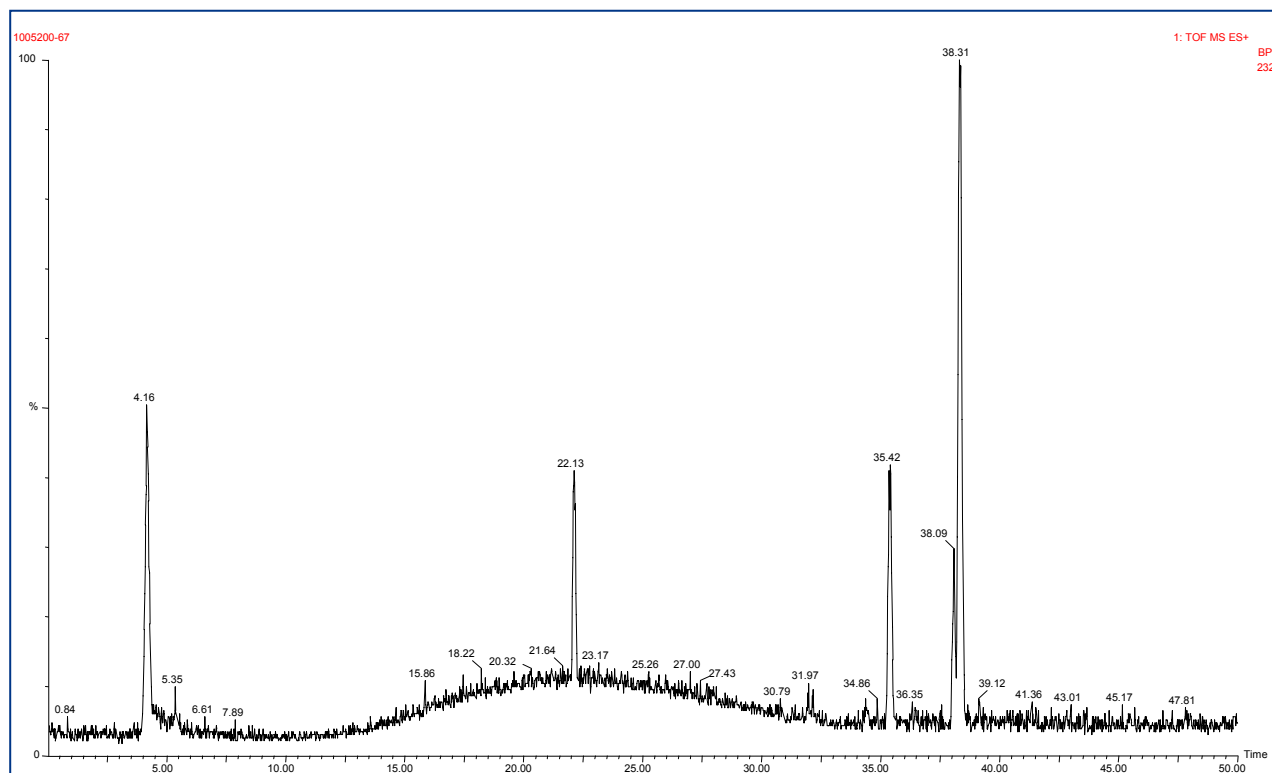
Figuur 4 *Kwaliteitsprofiel opgenomen met UV detectie van een verontreinigd grondwatermonster met een relatief hoog DOC-gehalte en twee toegevoegde interne standaardstoffen.*

3.2.3 Detectie met QToF-MS

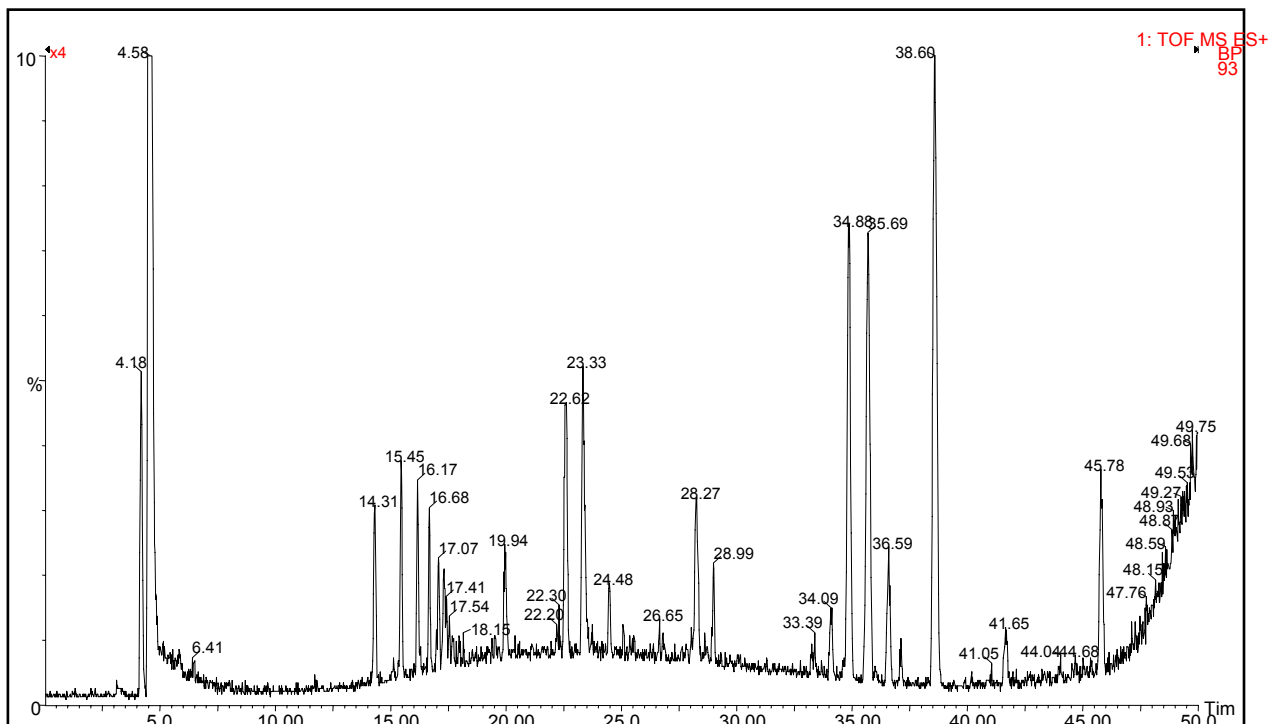
Na de DAD wordt het eluens gesplitst zodat circa 150 µl/min in een 'Time of Flight' massaspectrometer (QToF-MS) wordt geleid (model Micro, Waters Micromass). De MS is uitgerust met een Electrospray Ionisatie Interface (ESI) en een Lockspray™ unit. Met behulp van deze Lockspray™ unit wordt tijdens de analyse continu een oplossing van een stof met bekende massa's ingelaten. Door de gemeten massa's te corrigeren voor deze referentiemassa's wordt een zeer betrouwbare massa-aanduiding verkregen. Bij dit onderzoek zijn alle monsters bij lage pH geëxtraheerd en gescheiden, en vervolgens gemeten met positieve ionen in de full scan mode (scangebied: 80-800 amu, scantijd: 1 sec.). Een beperkt aantal monsters is ook bij neutrale pH met negatieve ionen in de full scan mode gemeten (scangebied: 80-800 amu, scantijd: 1 sec.).

Aan de hand van de toegevoegde interne standaardstoffen fenuron en chlooroxuron zijn de retentietijden omgerekend naar zogenaamde KRetI-retentietijden. De gevonden piekhoogten zijn aan de hand van de toegevoegde interne standaard gekwantificeerd als µg/l chlooroxuron (Cx). Zo wordt een geschatte concentratie berekend relatief ten opzichte van chlooroxuron. De werkelijke concentraties kunnen significant afwijken.

Twee voorbeelden van met MS opgenomen kwaliteitsprofielen zijn in onderstaande figuren 5 en 6 weergegeven:



Figuur 5 *Kwaliteitsprofiel opgenomen met MS detectie van een onverdacht schoon grondwatermonster met een relatief laag DOC-gehalte en twee toegevoegde interne standaardstoffen.*



Figuur 6 Kwaliteitsprofiel opgenomen met MS detectie van een verontreinigd grondwatermonster met een relatief laag DOC-gehalte en twee toegevoegde interne standaardstoffen.

3.3 Onderzoek genotoxiciteit

3.3.1 Voorbehandeling watermonsters t.b.v. de umu-test

Alle watermonsters zijn vooraf gefiltreerd over een 0,45 µm filter (Satorius cellulose nitraat filter). De organische stoffen zijn uit de watermonsters geïsoleerd door middel van adsorptie aan een vaste fase. Na elutie en concentratie van het eluens zijn de isolaten gekoeld bewaard tot gebruik in de umu-test. Een uitvoerige beschrijving is opgenomen in bijlage II.

Op deze manier werden ook 1-liter watermonsters van Evian, Spa Marie Henriette, Bar-le-Duc en Bru geëxtraheerd.

Alle watermonsters werden met de gevolgde methode een factor 1000 geconcentreerd voordat de meting van de mutageniteit plaatsvond.

3.3.2 Uitvoering umu test

De uitvoering van de umu-test was conform het Kiwa-huisvoorschrift LMB-052, welke is gebaseerd op het DIN voorschrift voor de umu-test (DIN 38415-3). Een uitvoerige beschrijving is opgenomen in bijlage II.

De umu-test gebruikt een genetisch gemodificeerde bacteriestam van *Salmonella typhimurium*. Deze bacterie bevat een gen voor de synthese van een enzym (β-galactosidase), die is gekoppeld aan het umuC-gen. Het umuC-gen is onderdeel van reparatiesysteem, dat reageert op DNA-schade. Als er DNA-schade optreedt in de bacteriën, wordt het umuC-gen geactiveerd, en produceert deze bacteriestam het enzym β-galactosidase. De productie van dit enzym, wordt na een geelkleuring

spectrofotometrisch gemeten bij 420 nm. De absorptie bij deze golflengte is een maat voor de genotoxiciteit die de bacteriën hebben ondervonden.

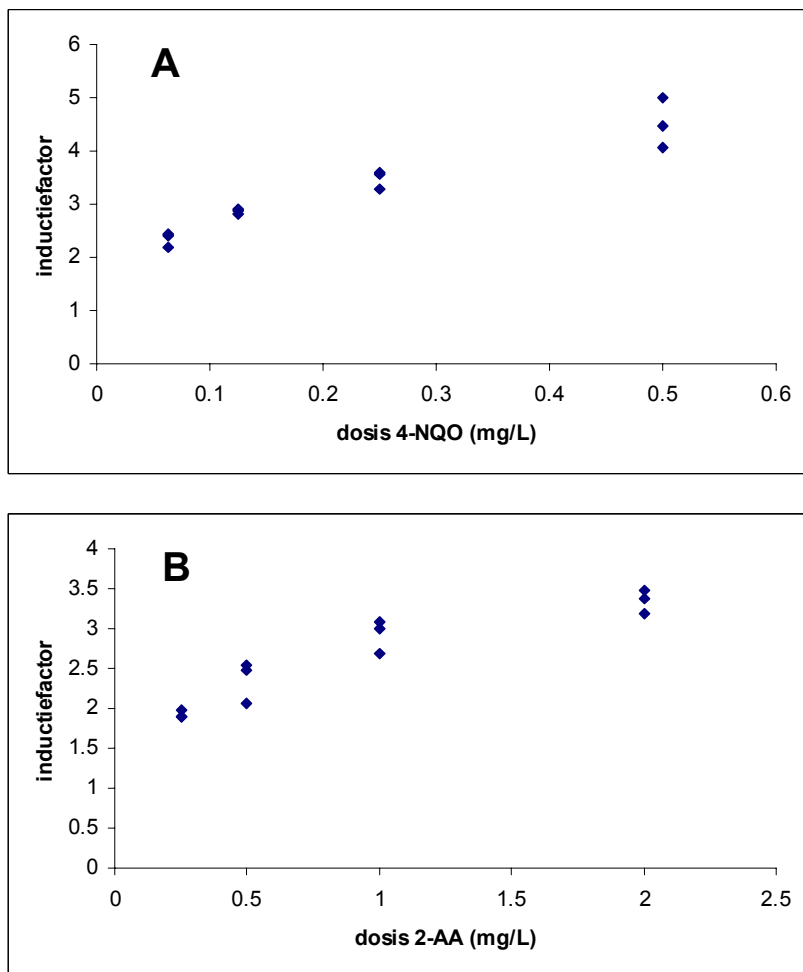
De bacteriën worden blootgesteld aan het te onderzoeken monster (waterextract, positieve controle of negatieve controle), met of zonder het enzym-mengsel S9. Deze enzymen kunnen, net als in de lever van het menselijk lichaam, sommige onschuldige stoffen omzetten in een genotoxische verbinding. Dit proces wordt metabole activatie genoemd en dient te worden meegenomen in de metingen, om ook deze indirect-genotoxische stoffen te detecteren.

Naast de te onderzoeken monsters (de waterextracten) zijn ook blanco's, negatieve controles en positieve controles meegenomen. De blanco's waren reactiemengsels zonder bacteriën en zonder teststof of waterextract en dienden als achtergrondmeting. De negatieve controles waren reactiemengsels met bacteriën, maar zonder teststof, en dienden als controle dat er geen genotoxiciteit te meten is als er geen genotoxische stof toegevoegd is. De positieve controles waren reactiemengsels met bacteriën en met een serie van verschillende concentraties van een bekende genotoxische stof, te weten 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO) bij de meting zonder toevoeging van S9. 2-Aminoanthraceen (2-AA) is gebruikt als teststof bij de meting met S9. Deze positieve controles dienden als controle dat de test werkte en genotoxiciteit gedetecteerd kon worden.

Vervolgens werd een inductiefactor (IF) voor genotoxiciteit berekend voor de waterextracten (en positieve controles), door de genotoxiciteit van een waterextract (of positieve controle) te delen door de "genotoxiciteit" van de negatieve controle (vergelijking 1).

$$IF = \frac{G_{monster}}{G_{neg. controle}} \quad (1)$$

Bij een inductiefactor van 1,5 en hoger wordt een monster beschouwd als genotoxisch. De inductiefactor voor de positieve controles werd op een zelfde manier berekend en moest groter dan 2 zijn om een duidelijk verhoogde genotoxiciteit aan te geven. Figuur 7 geeft twee voorbeelden van de dosis-respons curves van de positieve controles.



Figuur 7 Voorbeelden van dosis-respons curves van de positieve controles in de umu-test. A: 4-nitroquinoline-N-oxide; B: 2-aminoanthraceen. De gegeven doses zijn de concentraties van de stof in de oplossing die werd toegevoegd aan de bacteriën.

3.4 Meting oestrogene activiteit

3.4.1 Isolatie van oestrogene stoffen

De isolatie van oestrogene stoffen uit de watermonsters is bij Kiwa Water Research uitgevoerd door middel van een vloeistof/vloeistof-extractie. Als extractiemiddel is hiervoor ethylacetaat gebruikt. Dit extractiemiddel wordt gekenmerkt door de brede polariteitsrange aan organische stoffen die hiermee uit water kunnen worden geëxtraheerd. Gebruik van een breed werkend extractiemiddel is belangrijk omdat potentieel oestrogene actieve stoffen een zeer uiteenlopend karakter en daarmee ook grote verschillen in polariteit bezitten.

In verband met een uniforme voorbehandeling zijn voor de isolatie de watermonsters gefiltreerd over een 0,45 µm filter (Satorius cellulose nitraat filter).

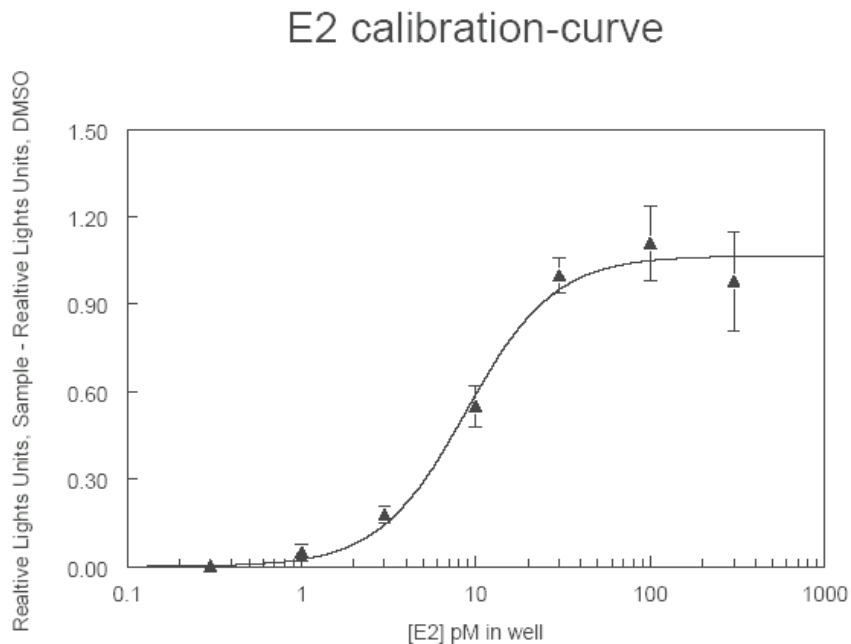
De extractie van 1 liter van het watermonster is achtereenvolgens uitgevoerd met 1 x 200 en 2 x 50 ml ethylacetaat. Het gecombineerde extract is via indampen geconcentreerd en kwantitatief overgebracht in 50 µl DMSO (dimethylsulfoxide) in op gewicht gekalibreerde puntbuisjes.

De bepaling van de oestrogene activiteit in de extracten van de watermonsters is uitgevoerd door BioDetections Systems B.V. (BDS) met behulp van de ER-CALUX® methode. Deze methode is binnen

het BTO in samenwerking tussen BDS en Kiwa WR gevalideerd voor metingen in o.a. drinkwater. Daarvoor zijn in drievoud metingen uitgevoerd in het toegepaste extractiemiddel en oplosmiddel, ook na concentrering, in 'blanco' water en in 'blanco' water met addities van 0,3 en 3 ng/l 17 β -oestradiol [Puijker, 2004].

De ER-CALUX® bioassay maakt gebruik van humane borst carcinoma (T47D) cellen die stabiel zijn getransfecteerd met een plasmide dat het gen van het vuurvliegje (*Photinus pyralis*) bevat als reporter gen voor de aanwezigheid van oestrogene stoffen. De ER-CALUX® bioassay detecteert op deze manier de mate van activatie van de oestrogene receptor signaal transductie route. Deze activatie wordt vergeleken met de activatie van de route door 17 β -oestradiol, welke gebruikt wordt als referentie. De uiteindelijke oestrogene activiteit wordt uitgedrukt als 17 β -oestradiol equivalenten (EEQs, in ng/l).

Bij elke meetserie is een ijklijn van de standaard 17 β -oestradiol meegenomen. De ruwe meetresultaten van de waterextracten zijn in deze ijklijn geïnterpoleerd om zo de hoeveelheid oestradiol equivalenten te bepalen. Alle extracten zijn getest in triplo. Voor het kwantificeren van de extracten dient de oestrogene activiteit te liggen tussen de LOQ (Limit of Quantification; kwantificatiegrens) en de EC₅₀ (concentratie horend bij 50 % van de maximale respons) van de ijklijn. De LOQ bedraagt 0,020 ng EEQ/l. De LOD (Limit of Detection; detectiegrens) ligt circa een factor 3 onder de LOQ en bedraagt 0,006 ng EEQ/l.



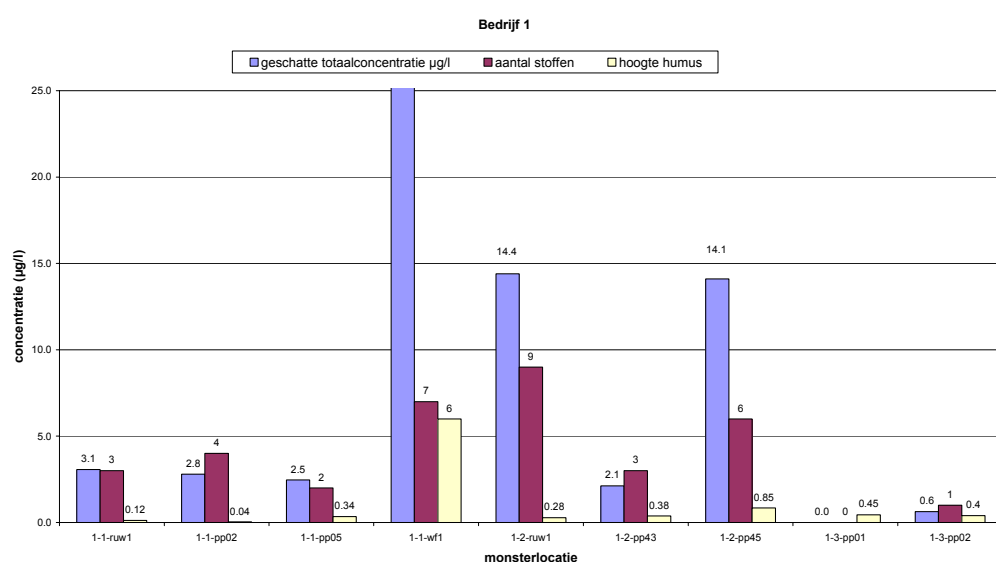
Voorbeeld van een 17 β -oestradiol calibratiecurve.

Figuur 8 Calibratiecurve van ER-CALUX® bioassay voor 17 β -oestradiol.

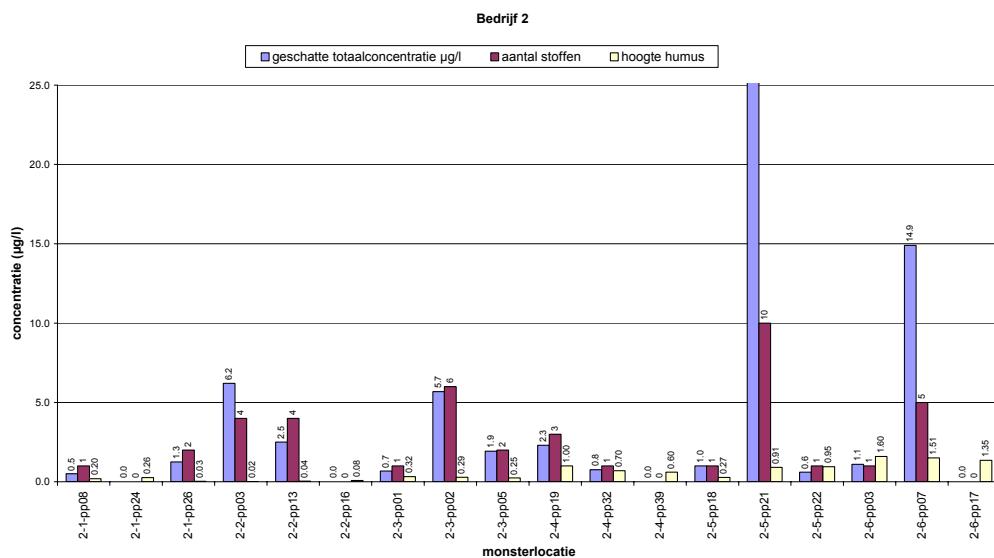
4 Resultaten van het onderzoek

4.1 Screening van onbekende organische microverontreinigingen, juni 2005

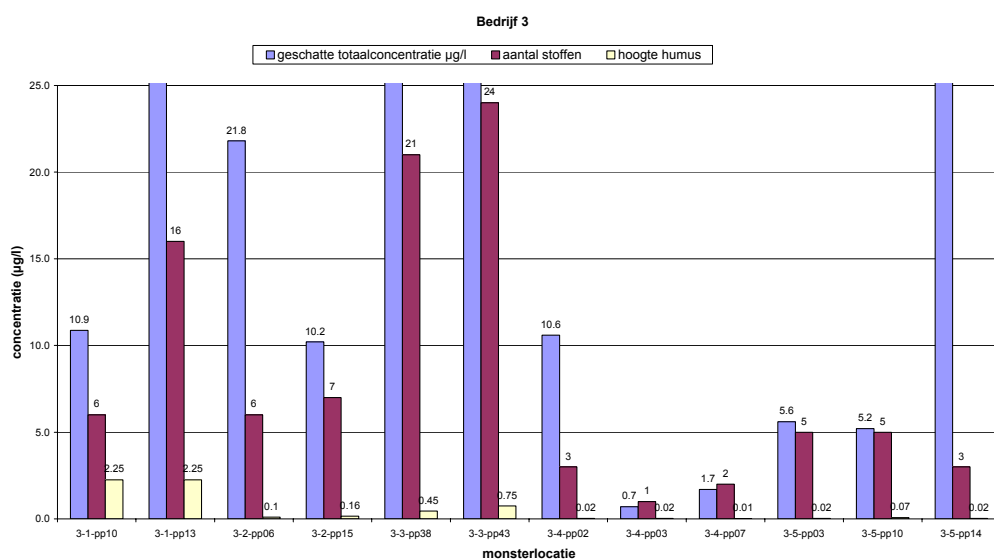
Overzichten van de resultaten van de eerste meetserie, uitgevoerd in diverse winningen van de waterbedrijven in mei/juni 2005, zijn weergegeven in de onderstaande figuren. In deze figuren zijn het aantal aangetroffen stoffen en de som van de geschatte concentraties weergegeven. Onbekende verbindingen zijn moeilijk te kwantificeren. Om toch een schatting te geven worden hier de concentraties bepaald relatief ten opzichte van chlooroxuron (interne standaard). De geschatte concentraties kunnen significant afwijken van de werkelijke concentratie. Bij de eerste meetserie (figuren 9 t/m 13) betreft het zowel met UV als met MS gedetecteerde verbindingen met geschatte concentraties boven 0,5 µg/l. De relatieve humusconcentraties zijn berekend aan de hand van de gemeten hoogte van het absorptiespectrum veroorzaakt door humuszuren in het begin van het chromatogram.



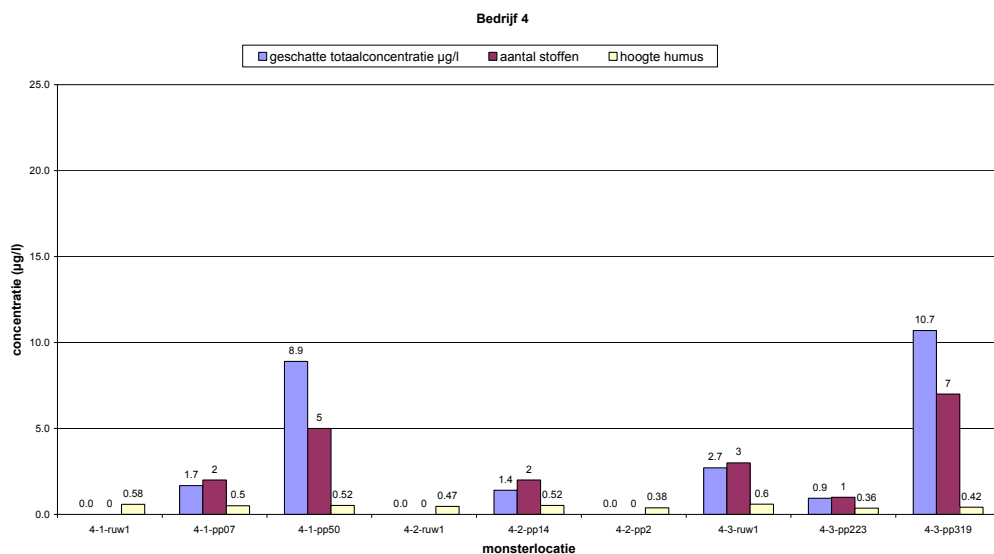
Figuur 9 Resultaten screening onbekende stoffen juni 2005, geschatte totale concentratie, aantal stoffen en relatieve DOC-gehalte.



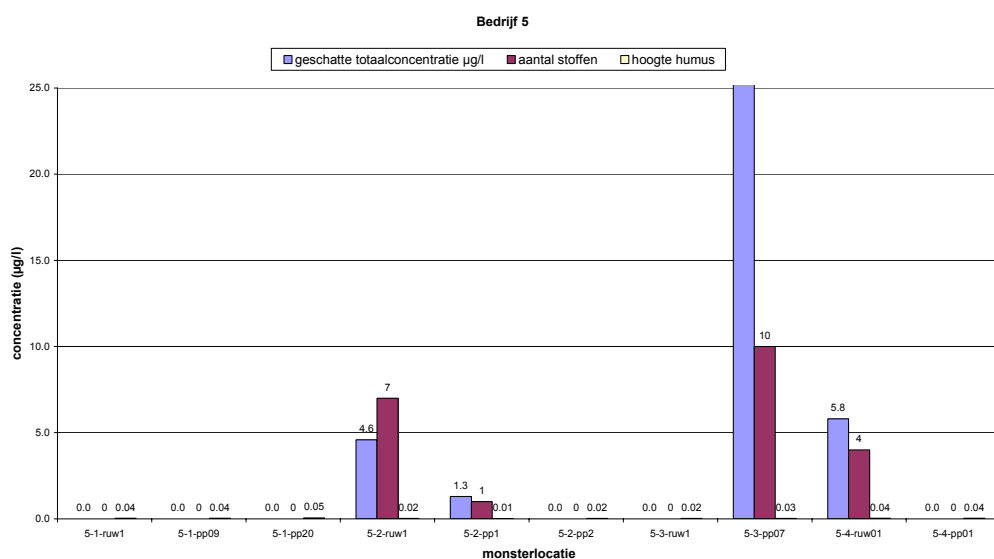
Figuur 10 Resultaten screening onbekende stoffen juni 2005, geschatte totale concentratie, aantal stoffen en relatieve DOC-gehalte.



Figuur 11 Resultaten screening onbekende stoffen juni 2005, geschatte totale concentratie, aantal stoffen en relatieve DOC-gehalte.



Figuur 12 Resultaten screening onbekende stoffen juni 2005, geschatte totale concentratie, aantal stoffen en relatieve DOC-gehalte.



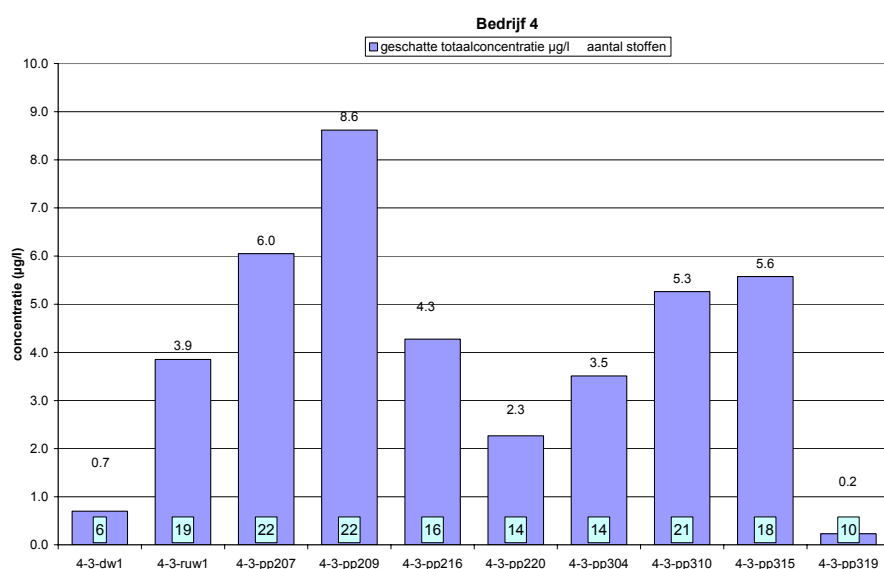
Figuur 13 Resultaten screening onbekende stoffen juni 2005, geschatte totale concentratie, aantal stoffen en relatieve DOC-gehalte.

Uit de resultaten blijkt dat bij de eerste screening uitgevoerd in de periode mei /juni 2005 in 39 van de 49 onderzochte monsters stoffen zijn aangetroffen met geschatte concentraties van meer dan 0,5 µg/l. Het maximum aantal stoffen aangetroffen in één monster bedraagt 24. De totale geschatte concentratie bedroeg in enkele monsters meer dan 25 µg/l. In een tiental monsters zijn geen stoffen aangetroffen in concentraties hoger dan 0,5 µg/l.

4.2 Screening van onbekende organische microverontreinigingen, najaar 2005

Een compleet overzicht van de resultaten van de tweede meetserie, uitgevoerd in de periode september tot november 2005, in een selectie van de in juni onderzochte winningen, is weergegeven in bijlage III. Bij deze selectie is vooral als criterium de mate waarin verontreinigingen in de eerste meetserie zijn aangetroffen, gehanteerd. In de figuren zijn het aantal aangetroffen stoffen (aanwezig in concentraties van meer dan 0,1 µg/l) en de som van de geschatte concentraties in de onderzochte watermonsters weergegeven. Het betreft zowel de met UV-detectie gemeten stoffen en/of met massaspectrometrie gemeten stoffen. Naast grondwater van enkele meest bedreigde individuele pompputten en enkele onverdachte, niet bedreigde pompputten is in deze tweede serie metingen ook het gemengde ruwwater en het drinkwater onderzocht. Een voorbeeld van de resultaten van een winning, waar beïnvloeding van het grondwater door landbouw en infiltratie van lokaal oppervlaktewater plaatsvindt is weergegeven in figuur 14.

Links is in de figuur de geschatte totale concentratie en het aantal stoffen in het reine water weergegeven (code . - . dw.), daarnaast in verschillende ruwwaterstrengen (code . - . ruw.) en in individuele pompputten (code . - . - pp...).



Figuur 14 Voorbeeld van geschatte totale concentratie en aangetroffen aantal stoffen in diverse watermonsters van een winning.

In alle gevallen worden door bijmenging van water van 'schone' pomputten in het gemengde ruwwater lagere concentraties aangetroffen dan in de speciaal geselecteerde, 'verdachte' pomputten.

In drinkwater kan een verdere verlaging optreden door de toegepaste zuivering en door bijmenging van andere schone ruwwaterstrengen. Op een aantal locaties vindt een aanvullende zuivering plaats in verband met reeds in het verleden geconstateerde verontreinigingen. Doordat analyses hebben plaatsgevonden in steekmonsters is een directe vergelijking tussen ruwwater en drinkwater niet altijd mogelijk, bijvoorbeeld door wisselingen in onttrekkingsregimes.

4.3 Onderzoek naar identiteit van aangetroffen stoffen

Met behulp van de gegevens van de massaspectrometrische detectie van de aangetroffen stoffen in combinatie met het absorptiespectrum verkregen bij de UV-DAD detectie en de (gecorrigeerde) retentietijd (KRetI, een maat voor de polariteit) is op zeer beperkte schaal onderzoek uitgevoerd naar de identiteit van een deel van de aangetroffen stoffen. Dit is alleen gebeurd voor de met MS aangetroffen

stoffen. Daarnaast is bij de screening met de UV-detector bij beide meetronden de HPLC-UV fingerprint library geconsulteerd, waarin gegevens over frequent voorkomende bestrijdingsmiddelen en geneesmiddelen zijn opgenomen. Hierbij zijn geen bekende stoffen aangetroffen.

Voor het identificeren van geheel onbekende verbindingen die niet zijn opgenomen in de bibliotheek van de LC-UV fingerprint methode, moet een massaspectrum beschikbaar zijn. Daarom kan alleen onderzoek naar de identiteit van onbekende verbindingen worden uitgevoerd als deze ook in het LC-MS chromatogram aanwezig is.

Bij het identificatie onderzoek is uitgegaan van een verbinding met de elementen koolstof (C), waterstof (H), stikstof (N), zuurstof (O) en fosfor (P). De aanwezigheid van de elementen chloor (Cl), broom (Br) en zwavel (S) kan meestal direct uit het massaspectrum worden bepaald door het karakteristieke isotooppatroon van deze elementen.

Voor het bepalen van een mogelijke elementsamenstelling (brutoformule) van de onbekende verbinding wordt gebruik gemaakt van de accurate massa zoals deze wordt verkregen bij Time-of-Flight massaspectrometrie. Ook is rekening gehouden met het gegeven of de verbinding wel of geen UV-absorptie vertoont (wel of geen piek in het LC-UV chromatogram), dit geeft namelijk aanvullende informatie over het chemische karakter van de verbinding. Door de beperkte beschikbaarheid van apparatuur kon hier in deze fase van het project nog geen gebruik van worden gemaakt.

De onderzochte verbindingen zijn gerangschikt op KRetI. Voor een vergelijk met de LC-UV analyse van fenylureum (FUH)-herbiciden zijn in onderstaande tabel de KRetI van deze FUH-herbiciden opgenomen.

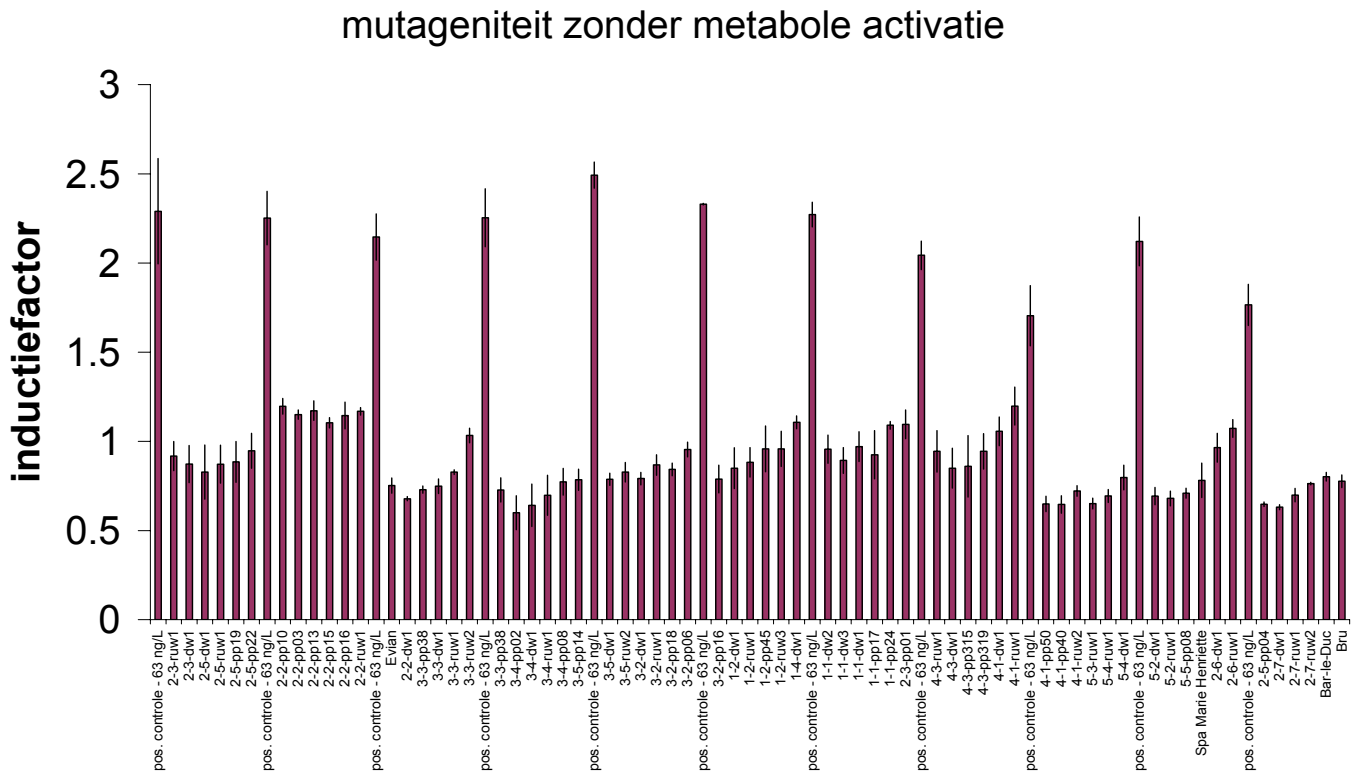
Tabel 2 *Relatieve retentietijden (KRetI) van fenylureumherbiciden.*

Naam	KretI (min.)	Naam	KRetI (min.)
Fenuron (i.s.)	21,12	Diuron	33,61
Metoxuron	26,43	Monolinuron	34,18
Monuron	28,17	Metobromuron	35,41
Methabenzthiazuron	30,93	Chlooroxuron (i.s.)	38,35
Chloortoluron	31,72	Linuron	39,24
Isoproturon	32,62	Chlorobromuron	40,12

i.s. = interne standaard

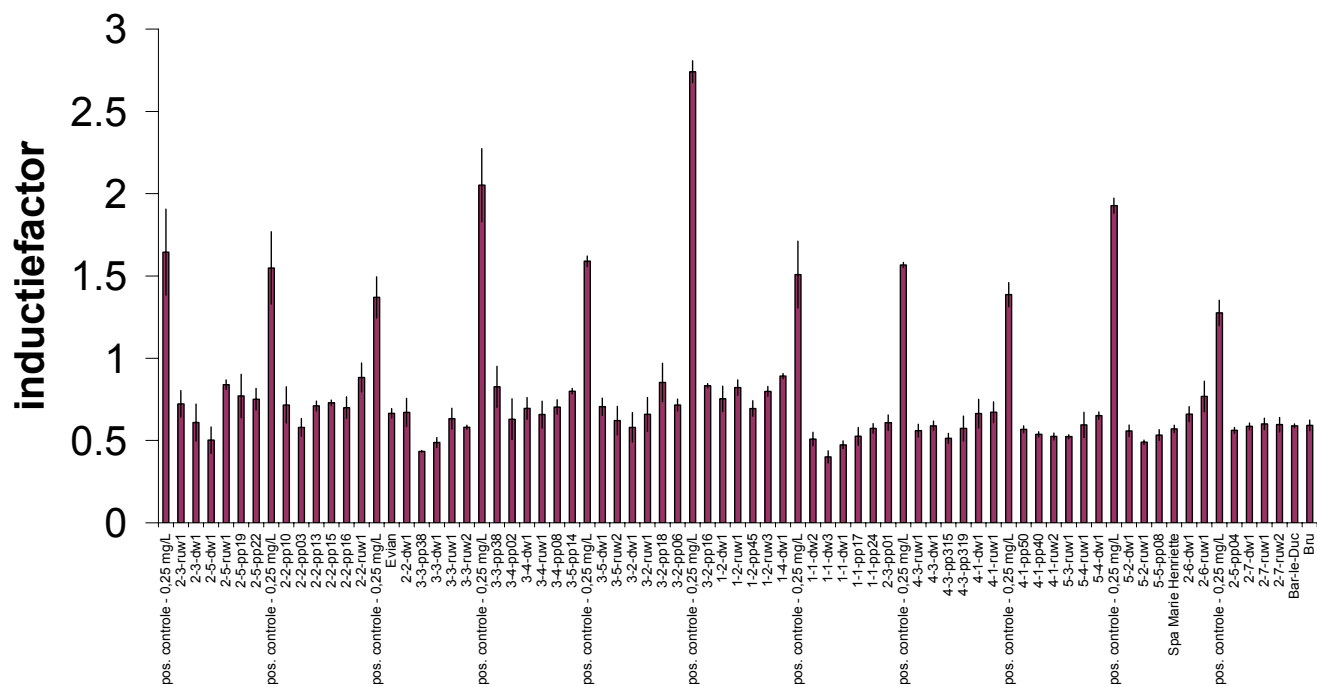
4.4 Onderzoek naar genotoxiciteit

Tegelijkertijd met het onderzoek naar onbekende organische microverontreinigingen is in een groot aantal monsters van september 2005 van met name verzameld ruwwater en reinwater, ook onderzoek uitgevoerd naar mogelijke genotoxische effecten van de aanwezige stoffen met de umu-test. De uitvoering van de umu-test is beschreven in bijlage II.



Figuur 14 Resultaten van de umu-test zonder metabole activatie voor grondwatermonsters, samen met de respons van de laagste geteste concentratie 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) van 63 µg/l. Deze positieve controle is te vergelijken met een concentratie in water van 63 ng/l. De eerste van elke gemeten zeven monsters is de positieve controle, te herkennen aan de duidelijk hogere respons. Tevens is de respons van vier bronwaterextracten weergegeven ter referentie. De weergegeven foutenmarge is de standaarddeviatie (n=3).

mutageniteit met metabole activatie



Figuur 15 Resultaten van de umu-test met metabole activatie voor grondwatermonsters, samen met de respons van de laagste geteste concentratie 2-aminoanthraceen (2-AA) van 250 $\mu\text{g/l}$. Deze positieve controle is te vergelijken met een concentratie in water van 250 ng/l . De eerste van elke gemeten zeven monsters is de positieve controle, te herkennen aan de duidelijk hogere respons. Tevens is de respons van vier bronwaterextracten weergegeven ter referentie. De weergegeven foutenmarge is de standaarddeviatie ($n=3$).

De gevonden inductiefactoren van de waterextracten, getest zonder en met metabole activatie met S9 staan weergegeven in respectievelijk figuur 14 en figuur 15.

Figuur 14 laat zien dat bij geen enkel grondwatermonster een inductiefactor groter dan 1,5 werd gemeten. In geen van de grondwatermonsters is daarom significante genotoxiciteit gevonden van direct werkende mutagenen (mutagenen die geen metabole activatie nodig hebben). De positieve controle van 63 $\mu\text{g/l}$ 4-NQO gaf wel een significante genotoxiciteit te zien. Als er in het waterextract 63 $\mu\text{g/l}$ of meer aan net zo mutagene stoffen had gezeten, ofwel 63 ng/l in het ongeëxtraheerde watermonster, was wel genotoxiciteit gevonden met deze umu-test. Daarom kan geconcludeerd worden dat er in de grondwatermonsters in ieder geval minder genotoxiciteit aanwezig is dan 63 ng/l van een sterk mutagene stof als 4-NQO aan genotoxiciteit bezit.

Hetzelfde kan geconcludeerd worden in figuur 15: voor geen enkel grondwatermonster werd een inductiefactor groter dan 1,5 gevonden. De positieve controle van 250 $\mu\text{g/l}$ 2-AA gaf wel een significante genotoxiciteit te zien. Als er in het waterextract 250 $\mu\text{g/l}$ of meer aan net zo (indirect) genotoxische stoffen had gezeten, ofwel 250 ng/l in het ongeëxtraheerde watermonster, was wel genotoxiciteit gevonden met deze umu-test. Er kan daarom ook geconcludeerd worden dat er in de grondwatermonsters minder indirecte genotoxiciteit aanwezig is dan 250 ng/l van 2-AA aan genotoxiciteit veroorzaakt.

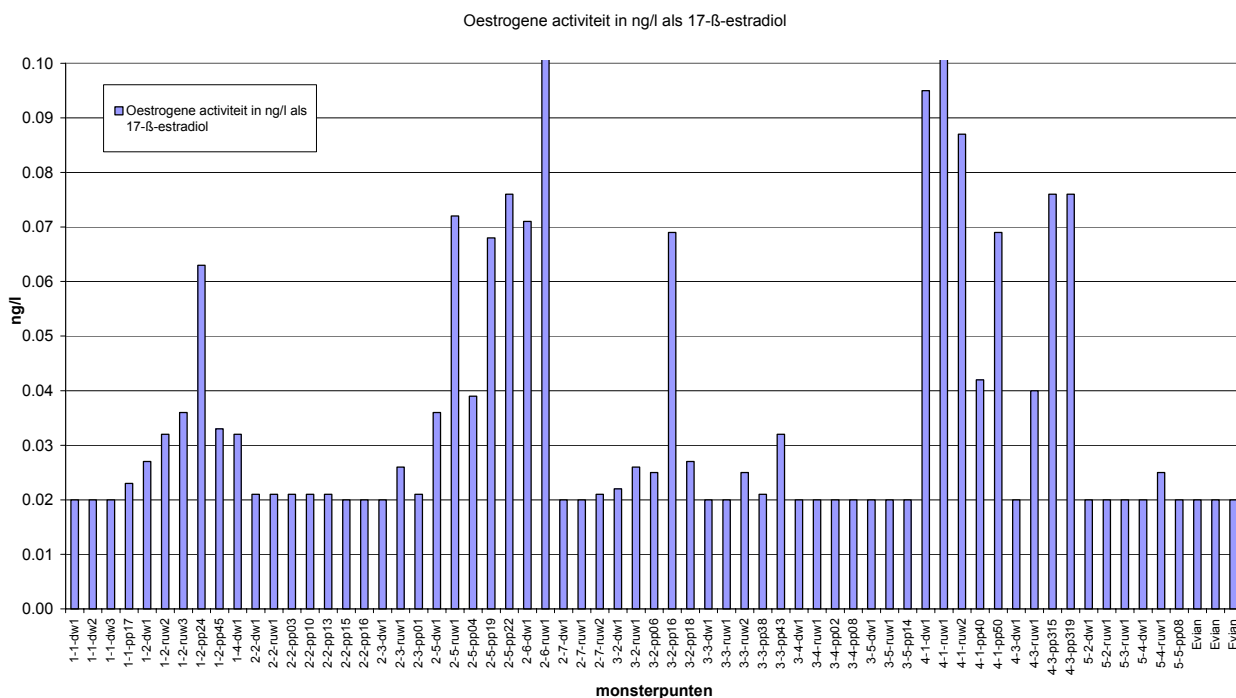
Ten slotte kan geconcludeerd worden dat de resultaten met de grondwaterextracten vergelijkbaar zijn met die van de bronwaterextracten.

Er dient wel te worden opgemerkt dat niet bekend is of de gebruikte methode voor de voorbereiding van de watermonsters echt alle genotoxische stoffen extraheert uit het water. Anderzijds is de monstervoorbereiding die is toegepast voor de umu-testen nagenoeg hetzelfde als de opwerking die is toegepast voor de chemische analyse. Er kan dus wel gesteld worden dat nagenoeg alle stoffen die in de chemische analyse gedetecteerd werden, zijn meegenomen in de umu-testen.

Daarnaast moet worden opgemerkt dat de umu-test niet alle soorten genotoxische stoffen detecteert. Daarvoor is een batterij van verschillende genotoxiciteitstesten nodig, waaronder bijvoorbeeld de Ames-test of de Comet-assay, die op dit moment nog niet beschikbaar is voor wateranalyses. Deze resultaten zijn dus geen absolute garantie dat er geen genotoxiciteit in het water aanwezig is, maar geven wel een goede indicatie daartoe.

4.5 Onderzoek naar oestrogene activiteit

De resultaten van de bepaling van de oestrogene activiteit met de ER-CALUX® bioassay zijn vermeld in figuur 16. De meetwaarden zijn uitgedrukt in ng/l 17β-estradiol equivalenten, (EEQ).



Figuur 16 Oestrogene activiteit gemeten met de ER-CALUX® bioassay in ng/l 17β-estradiol equivalenten (EEQ).

In circa de helft van de watermonsters is geen oestrogene activiteit gemeten. De waarden in deze watermonsters liggen beneden de meetgrens van 0,02 ng/l EEQ. In de overige helft van de 62 grond- en drinkwatermonsters is een zeer geringe oestrogene activiteit gemeten. De maximale oestrogene activiteit aangetroffen in een 2-tal ruwwater monsters bedraagt 0,20 ng/l EEQ, terwijl in drinkwater maximaal 0,1 ng/l EEQ is aangetroffen. Deze hoogste waarden zijn aangetroffen op locaties met anaeroob water (2-6, 4-2) waar nauwelijks onbekende stoffen zijn aangetroffen. Ook in enkele (onverdachte) monsters waarin met de screeningsmethode geen onbekende stoffen zijn aangetroffen, is een geringe oestrogene activiteit gemeten. Hier is nog geen verklaring voor, niet uitgesloten mag worden dat deze van nature aanwezig is. In mineraalwater uit flessen is geen oestrogene activiteit meetbaar.

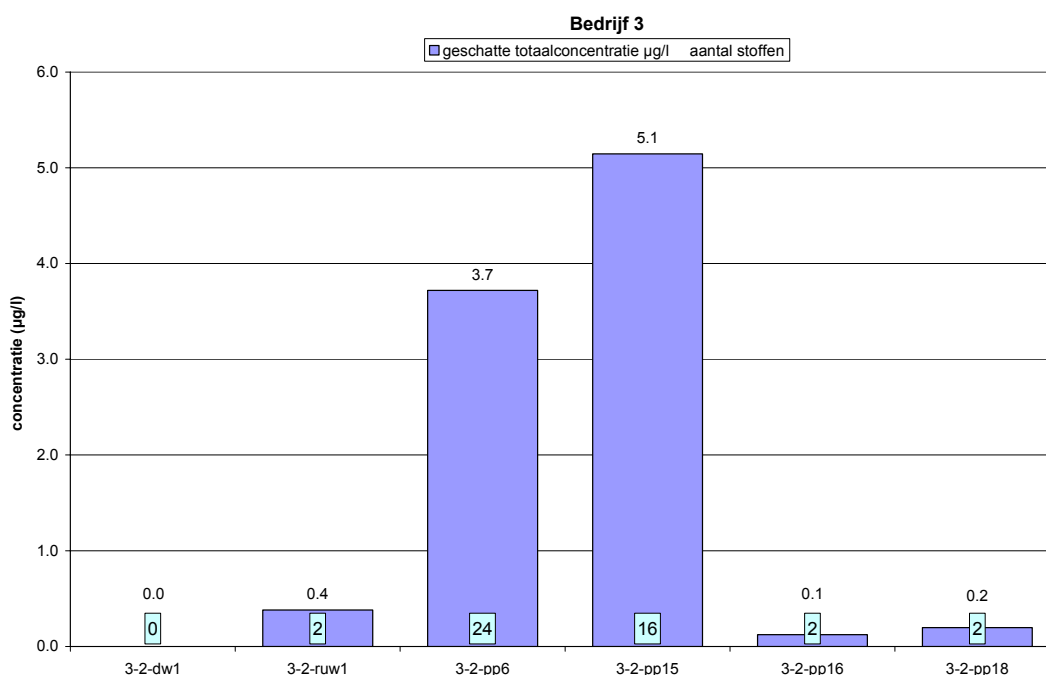
De meetwaarden liggen ver onder het niveau van de oestrogene activiteit gemeten in oppervlaktewater, waar concentraties tot ruim 5 ng/l zijn aangetroffen, [Puijker *et al.*, 2004].
Op basis van een evaluatie uitgevoerd door het RIVM in 2004, is vastgesteld dat de meetwaarden geen risico voor de consumptie van drinkwater vormen [Mennes, 2004].

5 Evaluatie van gegevens van screening onbekende stoffen

5.1 Vergelijking van meetgegevens voor grondwatermonsters afkomstig van dezelfde winning

Er is voor een aantal locaties een vergelijking gemaakt van de aanwezigheid van stoffen in monsters van de verschillende fase van een winning (pompputten, gemengd ruwwater en het reine water), op basis van de retentietijd en het absorptiespectrum. Hieruit blijkt dat een groot aantal stoffen in verschillende pompputten in het verzameld ruw en reine water worden teruggevonden. Dit hoeft niet altijd het geval te zijn voor alle pomputten of ruwwaterstrengen. Soms zijn ook juist enkele onverdachte pompputten of ruwwaterstrengen onderzocht die uit een ander deel van het intrekgebied met vooral natuurgebied, grondwater onttrekken.

Dit wordt geïllustreerd aan de hand van figuur 17: pompput 15 onttrekt grondwater uit de richting van een stortplaats, pompput 6 vanuit een gebied dat ook deels beïnvloed wordt door deze stortplaats, landbouw en deels natuur, terwijl pompput 16 en 18 vooral grondwater onttrekken vanuit natuurgebied en een gering percentage landbouw (pompput 18).



Figuur 17 Verschillen in (grond)waterkwaliteit binnen een winning, dw = reine water, ruw = ruwwaterstreng, pp = pompput).

Er blijken soms een aantal meer polaire als apolaire stoffen in ruwwater aanwezig te zijn die niet meer in het drinkwater zijn aangetroffen (winning 3-3). Dit is een effect van de extra zuiveringstap met actieve kool. Ook kan dit voor stoffen, aangetroffen in enkele pompputten in lage concentraties tot circa 0,5 µg/l, door verdunning veroorzaakt worden.

Soms worden ook stoffen in lage concentraties in een drinkwatermonster aangetroffen die niet in enkele onderzochte pompputten of ruwwater-monsters aangetroffen zijn. In hoeverre kwaliteitsverschillen tussen alle putten en onttrekkingsregimes hierop van invloed zijn kon nog niet worden nagegaan.

Uit een vergelijking van meetgegevens uit de eerste en tweede meetronde blijkt dat er soms verschillen optreden in de aard en het aantal aangetroffen stoffen en de geschatte concentraties.

Bij de tweede meetronde zijn in verontreinigde water monsters vaak meer stoffen aangetroffen vergeleken met de eerste meetronde, omdat toen alle stoffen vanaf een geschatte concentratie van 0,1 µg/l, in plaats van 0,5 µg/l zijn meegeteld.

In enkele gevallen zijn beduidend minder stoffen en in lagere concentraties aangetroffen, bijvoorbeeld voor stoffen in het onttrokken grondwater van pompputten van bedrijf 2, winning 6. Dit kan deels verklaard worden uit verschillen in omstandigheden en de tussenliggende periode van circa 3 maanden. Om het optreden van vals positieve, onbekende stoffen door bijvoorbeeld contaminatie tijdens de monsternamen op te sporen moet er bij voorkeur een bevestiging van de meetresultaten plaatsvinden door een snelle herhaling van de bemonstering en analyse onder dezelfde omstandigheden uit te voeren. Contaminatie tijdens de bemonstering kan ondanks alle voorzorgsmaatregelen zoals het ruim voorspoelen van leidingen en kraantjes, nooit helemaal worden uitgesloten.

Overigens zijn er geen aanwijzingen dat contaminatie op grote schaal is opgetreden: in de verschillende grondwatermonsters die als een soort referentie dienden, zijn (bijna) geen stoffen aangetroffen.

5.2 Relaties tussen aangetroffen stoffen in winningen met een vergelijkbaar landgebruik

Voor een aantal winningen met een globaal vergelijkbaar landgebruik in het intrekgebied is onderzocht of er een overeenkomst bestaat tussen de aangetroffen stoffen in die winningen. Het betrof enkele winningen met vooral landbouw of stedelijk gebied of vuilstorten en bedrijventerreinen in het intrekgebied. De relatie tussen de watermonsters en het landgebruik is in bijlage IV weergegeven, voor zover dat mogelijk is.

In een aantal winningen betreft het vermoedelijk dezelfde stoffen (gebaseerd op eenzelfde retentietijd en zelfde UV-spectrum). Zo zijn dezelfde stoffen aangetroffen in pompputten en ruwwater van zowel winning 3-3 als 3-5, die in de nabijheid van vuilstorten of bedrijventerreinen liggen. Stoffen met een vergelijkbaar spectrum zijn ook aangetroffen in winning 2-7. Het betreft alle 3 winningen in stedelijk gebied en in de nabijheid van een stort of bedrijventerrein.

Een enkele maal zoals voor een monster in winning 2-7 betreft het een stof die zowel met UV als met MS bij dezelfde KRetI is gemeten.

Uit de evaluatie blijkt dat een aantal stoffen met eenzelfde KRetI en spectrum ook in andere winningen zijn aangetroffen. Maar er is meestal geen relatie met een zelfde specifiek landgebruik. Overigens kan dat mogelijk ook verklaard worden uit het feit dat er zelden sprake is van één homogeen gelijksoortig landgebruik, meestal is het een mix van diverse invloeden. Dit geldt nog meer voor het reine water en het gemengde ruwwater, dat vaak vanuit meerdere deelgebieden met een verschillend landgebruik naar de winning toestroomt. Voor individuele pompputten is de kans op een sterke relatie met één type landgebruik groter. Bij de evaluatie is dan ook vooral naar de aangetroffen stoffen in individuele pompputten gekeken.

De resultaten voor de verschillende winningen laten zien dat het grootste aantal stoffen en de hoogste totale geschatte concentraties voorkomen op geselecteerde locaties met lozing van rioolwater (3-3-pp38), vuilstorten (3-2-pp15, 4-1-pp07) of bedrijventerreinen (3-1-pp14, 2-5-21) in de directe omgeving. Naast diverse kleinere puntbronnen in oud stedelijk gebied lijkt ook infiltratie van verontreinigd oppervlaktewater een belangrijke mogelijke bron van verontreiniging van het grondwater te zijn (1-2-pp39, 1-2-pp45, 2-5-pp18, 3-1-pp10, 3-1-pp13, 4-3-diverse pp).

6 Conclusies en vervolgonderzoek

6.1 Conclusies

Uit de eerste fase van het onderzoek naar de aanwezigheid van onbekende, polaire organische microverontreinigingen in het grondwater van diverse kwetsbare winningen kunnen een aantal conclusies worden getrokken.

Onbekende stoffen aangetroffen

In de meeste voor het onderzoek geselecteerde winningen zijn onbekende stoffen aangetroffen. Het aantal aangetroffen stoffen in grondwatermonsters bedroeg in een 6-tal winningen meer dan 10 stoffen, tot meer dan 30, terwijl de geschatte totale concentratie op enkele locaties meer dan 25 µg/l bedroeg. Ook in het gemengde ruwe water en drinkwater zijn een groot aantal stoffen aangetroffen.

Geschatte concentraties verontreinigingen

Het betreft zeer waarschijnlijk verontreinigingen gezien het feit dat in vergelijkbare grondwatermonsters van onverdachte pompputten van dezelfde winning of van andere grondwaterwinningen geen stoffen worden aangetroffen. De werkelijke concentraties van de aangetroffen stoffen kunnen aanzienlijk afwijken van de geschatte concentraties doordat de gevoeligheid of respons van de twee toegepaste detectiemethoden voor de aangetroffen onbekende stoffen niet bekend is.

Identiteit stoffen nog niet bekend

Door de beperkte beschikbaarheid van analyseapparatuur kon de identiteit van de aangetroffen stoffen in deze fase van het onderzoek nog niet onderzocht worden. Voor dit onderzoek zal met name de detectie met behulp van massapectrometrie een belangrijk middel zijn. Uit een vergelijking met de in een bibliotheek vastgelegde gegevens van enkele tientallen bestrijdingsmiddelen en geneesmiddelen blijkt dat het geen bekende, eerder aangetroffen verontreinigingen betreft.

Geen of verwaarloosbaar effect

Bij het onderzoek naar de mogelijke betekenis van de aangetroffen stoffen met screeningstechnieken voor genotoxische effecten en hormoonversturende effecten (oestrogene activiteit) is geen of een verwaarloosbaar effect in drinkwater vastgesteld.

Verontreiniging als gevolg van bestaand landgebruik

Uit een eerste evaluatie blijkt dat de kwaliteit van het grondwater op kwetsbare locaties vooral bedreigd wordt als er sprake is van aanwezigheid van (in volgorde van belangrijkheid):

- vuilstorten
- bedrijventerreinen
- stedelijk gebied
- infiltrerend verontreinigd oppervlaktewater
- landbouw

6.2 Vervolgonderzoek

Het vervolgonderzoek binnen dit project is voornamelijk gericht op:

identificatie van de aangetroffen stoffen
vaststellen van de concentratie van de aangetroffen stoffen
toxicologische evaluatie.

In de vervolgfase van het project zal het onderzoek zich vooral richten op het vaststellen van de aard (identificatie) en de concentratie van de aangetroffen stoffen. Daarbij zal voor geïdentificeerde stoffen een toxicologische evaluatie van de betekenis van deze stoffen voor de kwaliteit van het drinkwater plaatsvinden. Hiervoor zullen in overleg met betrokken waterbedrijven winningen geselecteerd worden. Als selectie criterium geldt daarbij onder meer de in de eerste fase aangetoonde aanwezigheid van stoffen in het drinkwater. Dit onderzoek vereist een grote onderzoeksinspanning, in de orde van grootte van

enkele maanden per winning. Bij dit vervolgonderzoek zullen ook de laboratoria van de waterbedrijven betrokken worden. Tot slot zal het onderzoek ook uitgebreid worden naar de overige kwetsbare grondwaterwinningen en locaties waar oevergrondwater en oppervlaktewater als grondstof voor de drinkwaterproductie worden gebruikt.

Voor de drinkwatervoorziening is het evident om na te gaan wat de precieze herkomst van de verontreinigingen is om de kwaliteit van de grondstof voor de toekomst zeker te stellen. Wat niet wil zeggen dat 'het probleem' zich daarmee direct oplost. Onderzoek naar mogelijkheden voor verwijdering van de aangetroffen stoffen, en de effectiviteit van die zuiveringsmethode blijft noodzakelijk.

In beide is binnen de huidige onderzoeksopzet niet voorzien en moeten dus elders opgepakt worden.

De toegepaste nieuwe screeningstechniek op basis van een 'Solid Phase Extraction (SPE)', vloeistofchromatografie en detectie met een combinatie van detectoren gebaseerd op UV-absorptie meting en massaspectrometrie is een zeer geschikte methode om profielen van de waterkwaliteit op te nemen.

Juist de met deze screeningstechniek ook gemeten polaire stoffen kunnen op grond van hun hoge mobiliteit in de bodem en gedrag in de zuivering een bedreiging voor de kwaliteit van het drinkwater vormen. Inzet van deze techniek is daarom noodzakelijk bij de waterkwaliteitbeoordeling.

7 literatuur

Bobeldijk, I. en E. Emke (2000): Onderzoek waterkwaliteit organische stoffen, HPLC-UV fingerprint 2000. Kiwa-rapport nr. BTO 20000.236 (c), Kiwa, Nieuwegein.

Bobeldijk, I. en E. Emke (2002): Onderzoek waterkwaliteit organische stoffen. Kiwa rapport nr. BTO 2001.217 (c), Kiwa, Nieuwegein.

Brandt, A., J.A. van Leerdam, E. Emke en A.C. Hogenboom(2004): Onderzoek waterkwaliteit organische stoffen, HPLC-UV fingerprint 2003 - 2004, Kiwa-rapport nr. KWR 04.056.

Mennes, W. (2004): Assessment of human health risks for oestrogenic activity detected in water samples, using the ER-CALUX assay. RIVM notitie, RIVM, Bilthoven.

Puijker, L.M. (2004): De aanwezigheid van hormoonverstoorders in drinkwaterbronnen en de betekenis voor drinkwater. Kiwa-rapport nr. BTO 2004.052, Kiwa, Nieuwegein.

Puijker, L.M., J. van Genderen en Th. van den Hoven (2004): Oestrogene effecten in drinkwater en oppervlaktewater uit de Maas. RIWA-Maas/Kiwa rapport, RIWA-Maas, Werkendam.

Puijker, L.M., M.P. Laeven, C.M. van Hemel-Gommer, J. van Genderen en C.G.E.M. van Beek (1997): Organische microverontreinigingen in ruwwater van Nederlandse grondwaterwinningen. Onderzoek 1995 - 1996. SWE-97.002, Kiwa, Nieuwegein.

Puijker, L.M. en C.G.E.M. van Beek (1999): Monitoring van bestrijdingsmiddelen in grondwater. SWE-99.001, Kiwa, Nieuwegein.

Veenendaal, G., C.G.E.M. van Beek en L.M. Puijker (1986): Het voorkomen van organische stoffen in het grondwater onttrokken door Nederlandse waterleidingbedrijven. Mededeling nr. 97, Kiwa, Nieuwegein.

I Beschrijving toegepaste screeningsmethoden

Screening op onbekenden m.b.v. HPLC-UV/DAD-QToF/MS

Voorbehandeling, isolatie en scheiding van stoffen

Het monster is gefiltreerd over een 0,45 µm filter (Satorius cellulose nitraat filter). Vervolgens zijn interne standaardstoffen fenuron en chlooroxuron toegevoegd in een concentratie van 1,7 µg/l.

Het monster is on-line geëxtraheerd met behulp van een automatische monsterwisselaar (ASPEC Xli, Gilson international). Het monstervolume was 60 ml. Voor bepaling van de blanco componenten is zeer zuiver water gefiltreerd en geanalyseerd. Voor de extractie en scheiding bij lage pH zijn de monsters en het eluens aangezuurd met 500 µl trifluorazijnzuur per liter (pH is dan circa 2,3).

De extractie van het monster is on-line uitgevoerd op een 20x3 mm (i.d.) kolom, gepakt met Oasis HLB (Waters). Deze preconcentratiekolom is gemonteerd op de injectiekraan van de autosampler en vervangt de injectielus.

De analytische kolom is een 250 x 4,6 mm (i.d.) Omnispher C18 gepakt met 5 µm deeltjes (Varian). Voor de analytische kolom is een 'Phenomenex Security Guard' guard-kolom (Phenomenex/ Bester) geïnstalleerd.

Tabel 1 LC-gradiënt programma.

Tijd Stap (min.)	tijd totaal (min.)	%A	%B	flow (ml/min.)
0	0	100	0	0,7
52	52	0	100	0,7
4	56	0	100	0,7
10	66	0	100	1,0
1	67	100	0	1,0
20	87	100	0	1,0
0	87.01	100	0	0,7

A = milli-Q water + 10% acetonitril (+ 500 µl/l trifluorazijnzuur.)

B = acetonitril

Temperatuur kolom: 8 °C

Detectie met UV-DAD

De gescheiden componenten worden door een UV-diode array detector (DAD) geleid (Waters, type 2996 voorzien van Empower software). Van elke piek wordt op deze manier een UV-spectrum verkregen in het golflengtegebied van 200 tot 350 nm.

De chromatogrammen van de monsters zijn met de zogenaamde Maxplot weergegeven. Maxplot heeft als voordeel dat alle UV absorberende stoffen in een bepaald gebied zichtbaar zijn (hier 200 tot 350 nm). Dit in tegenstelling tot het meten bij een vaste golflengte waarbij alleen die stoffen zichtbaar zijn die op die golflengte UV absorberen en alle andere stoffen niet (Brandt, 2004).

Aan de hand van de toegevoegde interne standaarden fenuron en chlooroxuron zijn alle retentietijden omgerekend naar zogenaamde KRetI-retentietijden (Bobeldijk, 2002).

De gevonden piekhoogten zijn aan de hand van de toegevoegde interne standaard gekwantificeerd als $\mu\text{g/l}$ chlooroxuron (Cx). Zo wordt een geschatte concentratie berekend relatief ten opzichte van chlooroxuron. De werkelijke concentraties kunnen significant afwijken. De monsters zijn gecorrigeerd voor de blanco (1piek).

Detectie met QToF-MS

Na de DAD wordt het eluens gesplitst zodat circa $150 \mu\text{l/min}$ in een 'Time of Flight' massaspectrometer (QToF-MS) wordt geleid (model Micro, Waters Micromass). De MS is uitgerust met een Electrospray Ionisatie Interface (ESI) en een Lockspray™ unit. Met behulp van deze Lockspray™ unit wordt tijdens de analyse continu een oplossing van een stof met fragmenten met bekende massa's ingelaten (fosforzuur 0,1% in acetonitril/ultra-puur water 50/50 v/v; $3 \mu\text{l/min}$). Door de gemeten massa's te corrigeren voor deze referentiemassa's wordt een zeer betrouwbare massa-aanduiding verkregen. Bij dit onderzoek zijn alle monsters bij lage pH geëxtraheerd en gescheiden, en vervolgens gemeten met positieve ionen in de full scan mode (scangebied: 80-800 amu, scantijd: 1 sec.). Een beperkt aantal monsters is ook bij neutrale pH met negatieve ionen in de full scan mode gemeten (scangebied: 80-800 amu, scantijd: 1 sec.).

Aan de hand van de toegevoegde interne standaardstoffen fenuron en chlooroxuron zijn de retentietijden omgerekend naar zogenaamde KRetI-retentietijden. De gevonden piekoppervlakten zijn aan de hand van de toegevoegde interne standaard gekwantificeerd als $\mu\text{g/l}$ chlooroxuron (Cx). Zo wordt een geschatte concentratie berekend relatief ten opzichte van chlooroxuron. De werkelijke concentraties kunnen significant afwijken.

II Meting van genotoxiciteit m.b.v. umutest

Voorbehandeling watermonsters:

Alle watermonsters zijn vooraf gefiltreerd over een 0,45 µm filter (Satorius cellulose nitraat filter). Van elk te testen watermonster werd 1,0 liter genomen. Dit werd aange-zuurd tot pH 2,2 met 36-38 % zoutzuur (J.T. Baker). Vervolgens werd het watermonster door een Waters Oasis HLANDBOUW 6cc 500 mg SPE kolom getrokken met behulp van een vacuümpomp. Wanneer al het water over de kolom was gepasseerd werd de kolom nog 1 uur drooggezogen met de vacuümpomp, om al het water te verwijderen. De kolom werd geëluëerd met 9,0 mL acetonitril, verdeeld over drie porties van 3,0 ml. Het eluaat werd in zijn geheel opgevangen in een glazen puntbuis, die vervolgens drooggedampt werd onder een stikstofstroom. Het residu werd opgenomen in 1,0 ml milli-Q water (Millipore) met 4,5 % DMSO (Merck, 99,7 %) en vervolgens intensief geschud en gehomogeniseerd met vortex-apparatuur. Deze oplossing werd bewaard bij 1 - 8 °C tot gebruik in de umu-test.

Op deze manier werden ook 1-liter monsters van Evian, Spa Marie Henriette, Bar-le-Duc en Bru geëxtraheerd.

Alle watermonsters werden hiermee een factor 1000 geconcentreerd.

Uitvoering umu test:

De uitvoering van de umu-test was conform het Kiwa-huisvoorschrift LMB-052, maar wordt hier kort samengevat. Dit huisvoorschrift is gebaseerd op het DIN voorschrift voor de umu-test (DIN 38415-3). Als enige afwijking van het huisvoorschrift werd als groeimedium niet het trypton-medium gebruikt, maar medium met Oxoid voedingsbouillon no. 2, zoals gebruikt wordt voor de Ames test. Dit medium gaf geen problemen met de groei van de bacteriën, in tegenstelling tot het trypton-medium.

De umu-test gebruikt een genetische gemodificeerde stam van *Salmonella typhimurium*:

TA1535/pSK1002. Dit is een stam vergelijkbaar met die voor de Ames-test met als verschil dat een gen voor de synthese van β-galactosidase (LacZ-gen) ingebouwd is gekoppeld aan het umuC-gen. Het umuC-gen is onderdeel van het bacteriële SOS-reparatiesysteem, dat reageert op DNA-schade. Als er DNA-schade optreedt in de bacteriën, wordt het umuC-gen geactiveerd, en door de koppeling in deze gemodificeerde organismen wordt dan ook het LacZ-gen geactiveerd. Dit leidt tot de productie van het enzym β-galactosidase, dat een toegevoegd substraat ONPG splitst tot een stof die in het medium een fel gele kleur geeft. Het ontstaan van geelkleuring wordt spectrofotometrisch gemeten bij 420 nm, als maat voor de genotoxiciteit die de bacteriën hebben ondervonden.

In de umu-test worden in een eerste voorbereidende stap de bacteriën overnacht opgekweekt, en daarna gecontroleerd op voldoende groei door middel van een spectrofotometrische dichtheidsmeting bij 595 nm. Vervolgens wordt de overnachtcultuur verdund en verder gekweekt gedurende 1,5 uur. Dan worden in eerste test-stap de bacteriën blootgesteld aan het te onderzoeken monster (waterextract, positieve controle of negatieve controle), met of zonder aanwezigheid van een metaboliserend enzym-mengsel (S9). Deze enzymen kunnen, net als in de lever van het menselijk lichaam, niet-genotoxische stoffen eventueel omzetten in genotoxische, maar ook genotoxische stoffen omzetten in onschadelijke stoffen. De blootstelling duurt 2 uur, daarna wordt het mengsel verdund om de bacteriën nog eens 2 uur verder te laten groeien. Na deze stap wordt de groei spectrofotometrisch gemeten bij 595 nm. Deze groei geeft aan of het onderzochte monster niet toxisch was voor de bacteriën, op een andere manier dan via genotoxiciteit. Als de cellen door een andere toxische eigenschap van het monster namelijk slechter zijn gaan groeien, dan beïnvloedt dat ook de genotoxiciteitsmeting. Na de meting wordt aan een gedeelte van het bacterie-monster mengsel het ONPG toegevoegd, wat een half uur mag reageren met het eventueel gevormde β-galactosidase. Na dat halve uur wordt de reactie gestopt en de geelkleuring gemeten bij 420 nm, als maat voor de genotoxiciteit van het onderzochte monster.

Naast de te onderzoeken monsters (de waterextracten) zijn ook blanco's, negatieve controles en positieve controles meegenomen. De blanco's waren reactiemengsels zonder bacteriën en zonder teststof of waterextract en dienden als achtergrondmeting. De negatieve controles waren reactiemengsels met bacteriën, maar zonder teststof, en dienden als controle dat er geen genotoxiciteit te meten is als er geen genotoxische stof toegevoegd is. De positieve controles waren reactiemengsels met bacteriën en met een bekende genotoxische stof, te weten 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) als er geen S9 werd bijgevoegd en 2-aminoanthraceen (2-AA) als er wel S9 werd bijgevoegd. Deze positieve controles dienden als controle dat de test werkte en genotoxiciteit gedetecteerd kon worden. Daarvoor werden op elke plaat 4 verschillende concentraties van deze positieve controles in triplo getest.

De gemeten absorptie voor de groei (bij 595 nm; A_{595}) werd gecorrigeerd voor de achtergrond door de absorptie van een blanco ervan af te trekken. De gecorrigeerde groei van de monsters werd daarna gedeeld door die van de negatieve controles om de relatieve groei (RG) te krijgen (vergelijking 1).

$$RG = \frac{A_{595,monster} - A_{595,blanco}}{A_{595,neg. controle} - A_{595,blanco}} \quad (1)$$

Deze relatieve groei mag niet lager zijn dan 0,5, wil de test werkzaam geacht worden, want dan is er sprake van te hoge toxiciteit naast genotoxiciteit. De gemeten absorptie voor genotoxiciteit (bij 420 nm; A_{420}) werd ook gecorrigeerd door de absorptie van de blanco's af te trekken. De genotoxiciteit (G) van de negatieve en positieve controles en monsters werd berekend door de gecorrigeerde absorptie bij 420 nm te delen door de gecorrigeerde absorptie bij 595 nm (er werd dus gerelateerd aan de groei van de bacteriën; vergelijking 2).

$$G = \frac{A_{420,x} - A_{420,blanco}}{A_{595,x} - A_{595,blanco}} \quad (2)$$

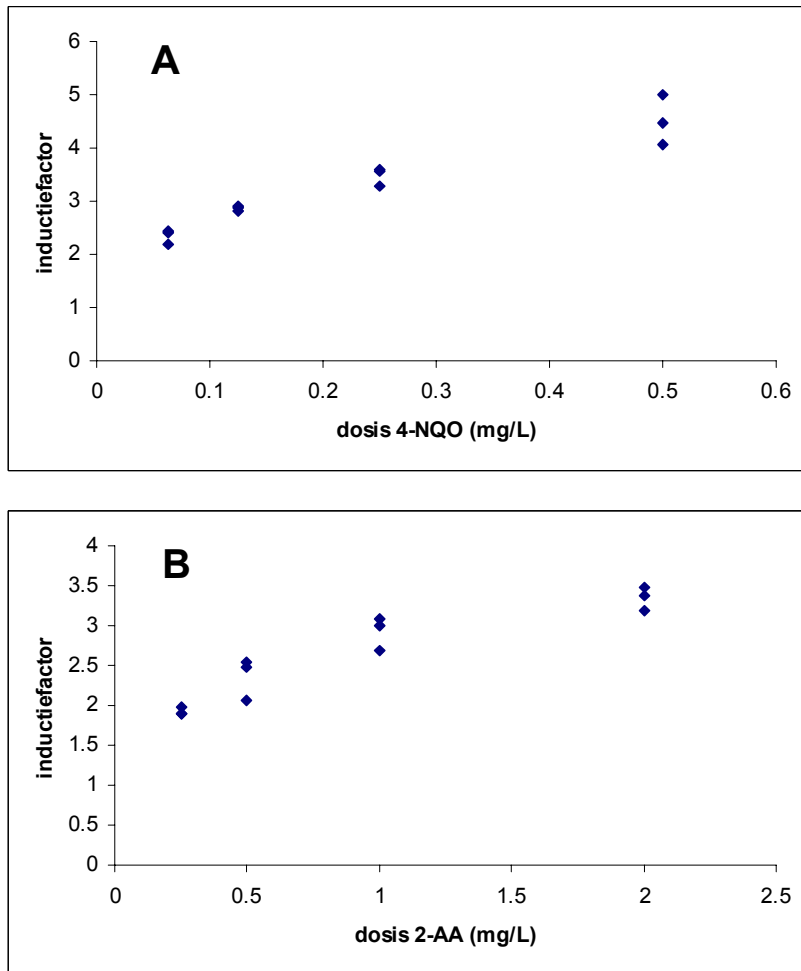
Vervolgens werd een inductiefactor (IF) voor genotoxiciteit berekend voor de waterextracten (en positieve controles), door de genotoxiciteit van een waterextract (of positieve controle) te delen door de genotoxiciteit van de negatieve controle (vergelijking 3).

$$IF = \frac{G_{monster}}{G_{neg. controle}} \quad (3)$$

Bij een inductiefactor van 1,5 en hoger wordt een monster beschouwd als genotoxisch. De inductiefactor voor de positieve controles werd op een zelfde manier berekend en moest groter dan 2 zijn om duidelijk een verhoogde genotoxiciteit aan te geven.

Toelichting resultaten umu-test:

In elke test was de groei van de waterextracten en positieve controles voldoende om de test werkzaam te achten ($GR > 0,5$). De positieve controles gaven op elke plaat een dosis-respons curve, waarvan twee voorbeelden zijn gegeven in figuur 1.



Figuur 1 Voorbeelden van dosis-respons curves van de positieve controles in de umu-test. A: 4-nitroquinoline-N-oxide; B:2-aminoanthraceen. De gegeven doses zijn de concentraties van de stof in de oplossing die werd toegevoegd aan de bacteriën.

Over het algemeen werd bij de hoogste concentratie bij beide stoffen een afbuiging gevonden van de dosis-respons curve. Dit kan duiden op het bereiken van een maximum in de te meten absorptie (moet nog nader onderzocht worden), of een maximum in de productie van β -galactosidase. De laagste concentraties bij deze stoffen gaven vaak een inductiefactor beneden de voorgeschreven 2,0, en kwamen soms zelfs in de buurt van de 1,5, waarbeneden genotoxiciteit niet meer significant hoger is dan bij de negatieve controle. Blijkbaar is er maar een nauw bereik waarin genotoxiciteit een significante, lineaire respons geeft in de umu-test.

De gevonden inductiefactoren van de waterextracten, getest zonder en met metabole activatie met S9 staan weergegeven in respectievelijk figuur 14 en figuur 15 (hoofdstuk 5).

Figuur 14 laat zien dat bij geen enkel grondwatermonster een inductiefactor groter dan 1,5 werd gemeten. In geen van de grondwatermonsters is daarom significante genotoxiciteit gevonden van direct werkende mutagenen (mutagenen die geen metabole activatie nodig hebben). De positieve controle van 63 $\mu\text{g/l}$ 4-NQO gaf wel een significante genotoxiciteit te zien. Als er in het waterextract 63 $\mu\text{g/l}$ of meer aan net zo mutagene stoffen had gezeten, ofwel 63 ng/l in het ongeëxtraheerde watermonster, was wel genotoxiciteit gevonden met deze umu-test. Daarom kan geconcludeerd worden dat er in de grondwatermonsters in ieder geval minder genotoxiciteit aanwezig is dan 63 ng/l aan een sterk mutagene stof als 4-NQO aan genotoxiciteit bezit.

Hetzelfde kan geconcludeerd worden in figuur 15: voor geen enkel grondwatermonster werd een inductiefactor groter dan 1,5 gevonden. De positieve controle van omgerekend naar watermonsters van 250 ng/l 2-AA gaf wel een significante genotoxiciteit te zien. Er kan daarom geconcludeerd worden dat er in de grondwatermonsters minder indirecte genotoxiciteit (genotoxiciteit waarvoor wel metabole activatie nodig is) aanwezig is dan 250 ng/l van een indirect mutagene stof aan genotoxiciteit veroorzaakt.

Ten slotte kan geconcludeerd worden dat de resultaten met de grondwaterextracten vergelijkbaar zijn met die van de bronwaterextracten.

Er dient wel te worden opgemerkt dat niet bekend is of alle aanwezige mutagene stoffen in het watermonsters daadwerkelijk terecht komen in het waterextract. Het gebruikte SPE materiaal is gekozen om het brede bereik van polariteit van de stoffen dat het extraheert, maar er blijft een mogelijkheid dat belangrijke stoffen in de watermonsters hier toch buiten vallen. Ook het eluatiemiddel (ethylacetaat) kan selectief stoffen hebben gedesorbeerd. Anderzijds is de extractiemethode die is toegepast voor de umu-testen nagenoeg hetzelfde als de opwerking die is toegepast voor de chemische analyse. Voor de chemische analyse werd ook geëxtraheerd met Oasis HLB vaste fase, en het acetonitril waarmee dit geëluëerd werd is zeer vergelijkbaar met het ethylacetaat van de umu-testopwerking. Er kan dus wel gesteld worden dat nagenoeg alle stoffen die in de chemische analyse gedetecteerd werden, zijn meegenomen in de umu-testen.

Daarnaast moet worden opgemerkt dat de umu-test alleen die genotoxische stoffen detecteert, die DNA-schade veroorzaken, die het SOS-reparatiesysteem van bacteriën activeert. Genotoxische stoffen die andere DNA-schade veroorzaken, worden hiermee dus niet opgemerkt. Hierin verschilt de umu test van bijvoorbeeld de veelgebruikte Ames test, die niet de reparatie, maar bepaalde DNA-schade zelf meet. Het is niet bekend in welke mate de umu-test het brede scala aan genotoxische stoffen detecteert, daarom zijn deze negatieve resultaten geen garantie dat er geen genotoxiciteit in het water aanwezig is. Om wel een dergelijke garantie te krijgen, zou een batterij van genotoxiciteitstesten nodig zijn, die duidelijk het hele scala aan genotoxische stoffen afdekt.

Het is niet bekend welk risico op kanker gerelateerd is aan drinkwater concentraties van 63 ng/l aan 4-NQO en 250 ng/l aan 2-AA, om een beeld te krijgen van de ernst van een eventueel gevonden genotoxiciteit in de umu-test. Dit verdient nader onderzoek. Aangezien in deze grondwatermonsters echter geen genotoxiciteit is gedetecteerd met de umu-test, hoeft geen gezondheidkundig risico bepaald te worden uit de meetresultaten.

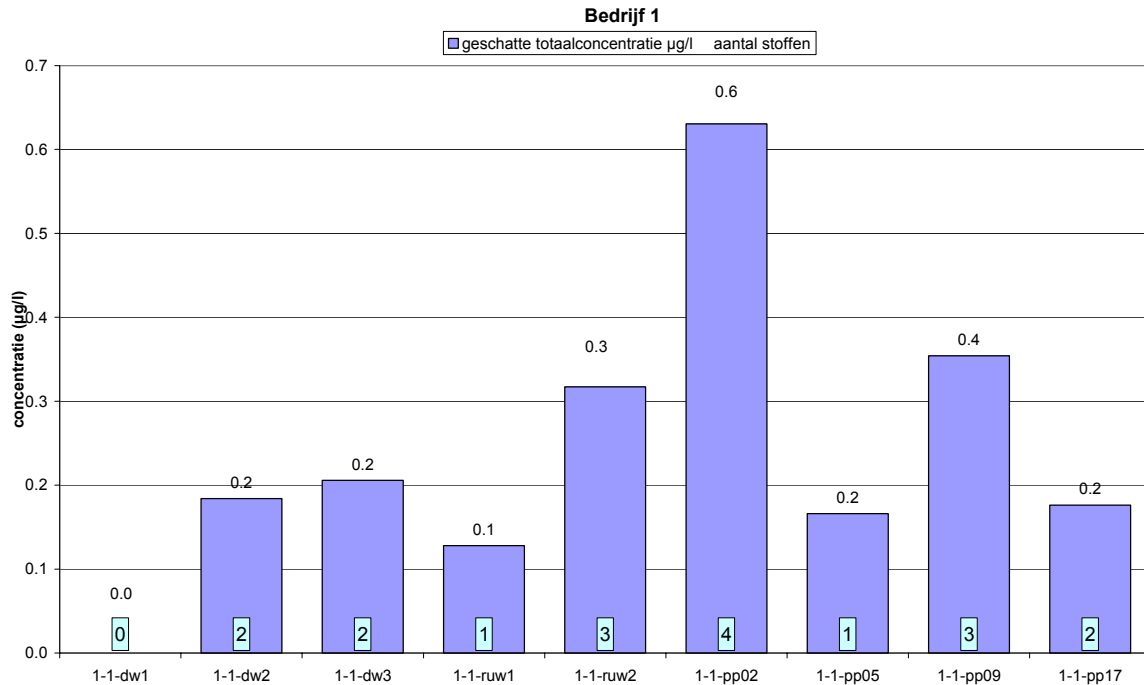
Opvallend is dat de inductiefactoren van de grondwatermonsters relatief vaak beneden de 1,0 liggen, ongeacht of er metabole activatie aanwezig was of niet. Vooral bij de tests met metabole activatie (met S9) is de inductiefactor van de grondwatermonsters erg laag. Dat zou betekenen dat er in deze monsters gemiddeld minder genotoxiciteit aanwezig was dan in de negatieve controle, wat niet logisch is.

Waarschijnlijk wordt de lage inductiefactor veroorzaakt door de hogere groei van de bacteriën bij de grondwatermonsters. De relatieve groei was in de meeste platen namelijk groter dan 1,0.

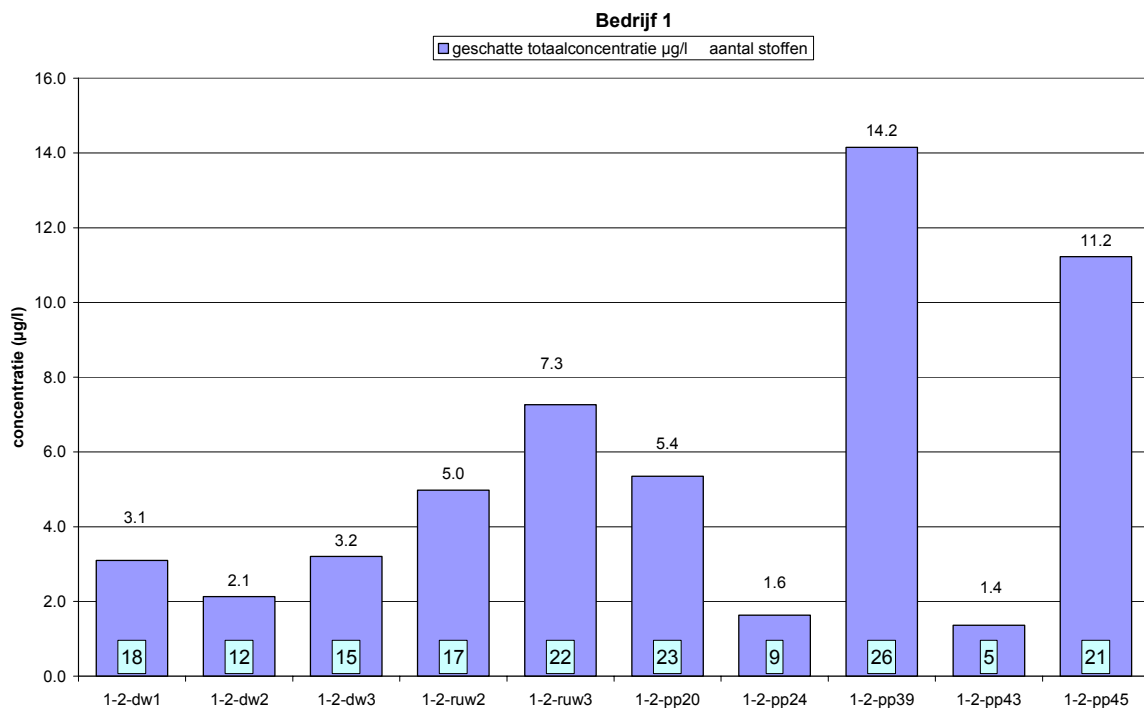
De reden voor de hogere groei van de bacteriën in de wells met grondwaterextract ten opzichte van de wells met negatieve controle is niet bekend. Mogelijk zitten er in de grondwaterextracten stoffen die de groei bevorderen. Dit zouden voedingsstoffen kunnen zijn, maar het is onwaarschijnlijk dat de grondwaterextracten zoveel extra voeding zouden kunnen leveren in vergelijking met de media die hier speciaal een overmaat van bevatten. Een andere mogelijkheid is dat er in de grondwaterextracten licht-toxische stoffen zitten, die door hun lage dosis de stofwisseling en celdeling stimuleren in de bacteriën als tegenwerkende respons op de lichte toxiciteit. Een dergelijk fenomeen staat bekend als hormesis: een tegengesteld effect bij doses onder de laagste dosis waarbij toxiciteit optreedt, waarschijnlijk veroorzaakt door een overcompensatie van het verdedigingmechanisme tegen het beginnende toxische effect. Het kan ook zijn dat een bepaalde stof in de grondwaterextracten licht absorberen bij 595 nm en daardoor de groei hoger laten lijken zijn. Dit fenomeen van verhoogde groei dient nader onderzocht te worden.

III Resultaten van individuele winningen

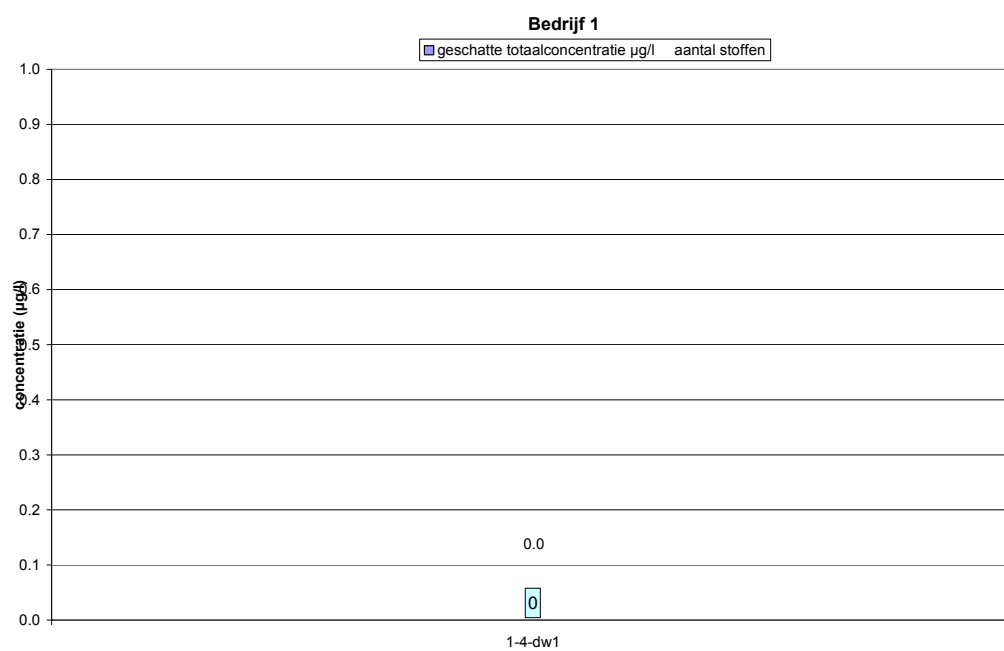
Bedrijf 1 winning 1, september - november 2005



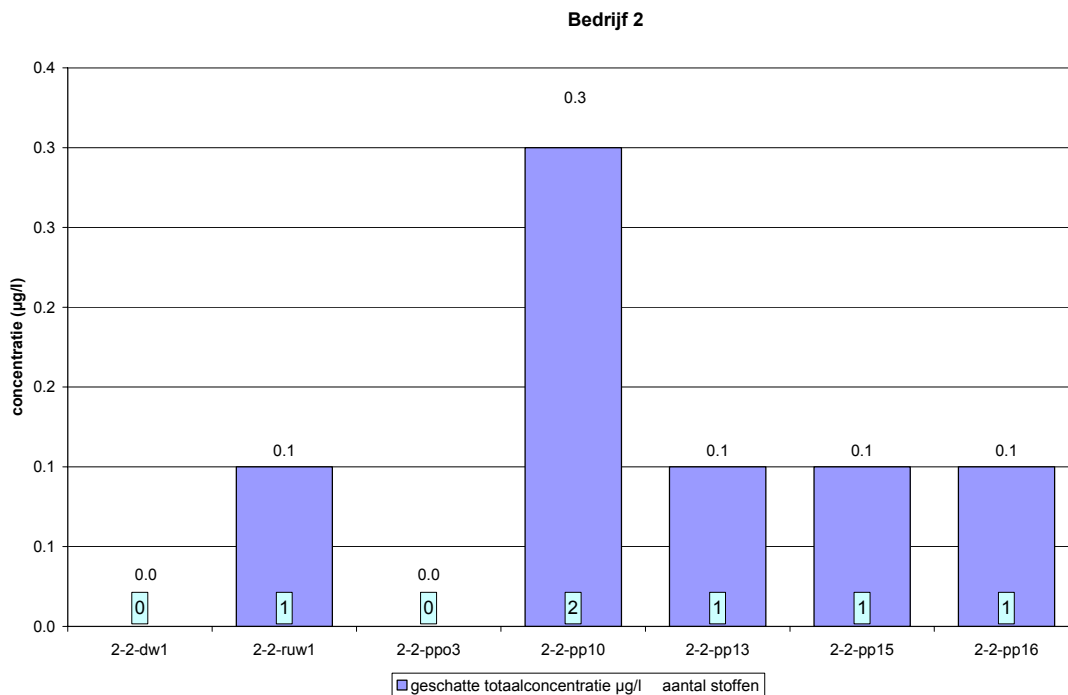
Bedrijf 1, winning 2, september-november 2005



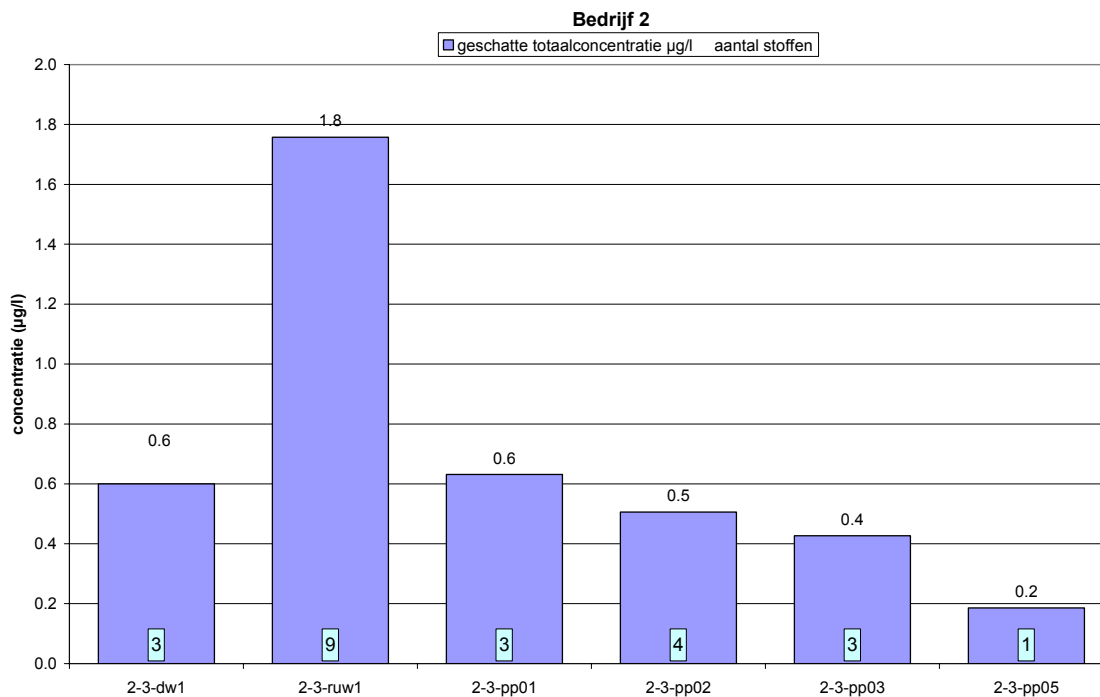
Bedrijf 1, winning 4, september-november 2005



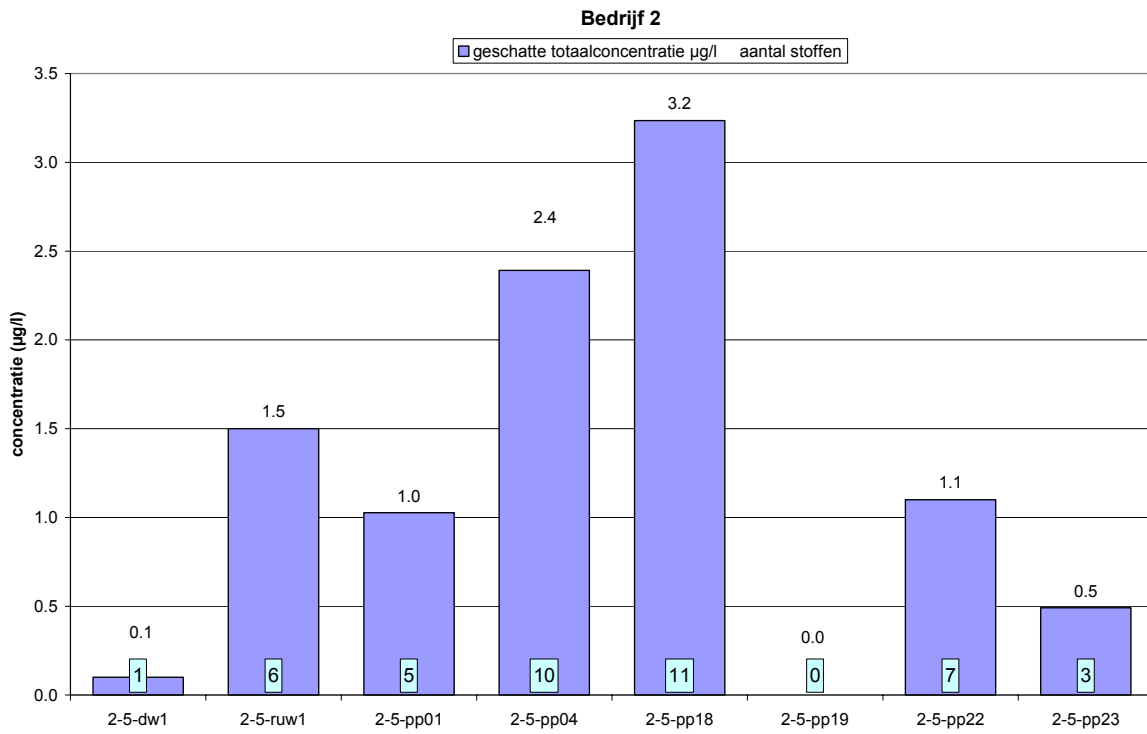
Bedrijf 2, winning 2, september-november 2005



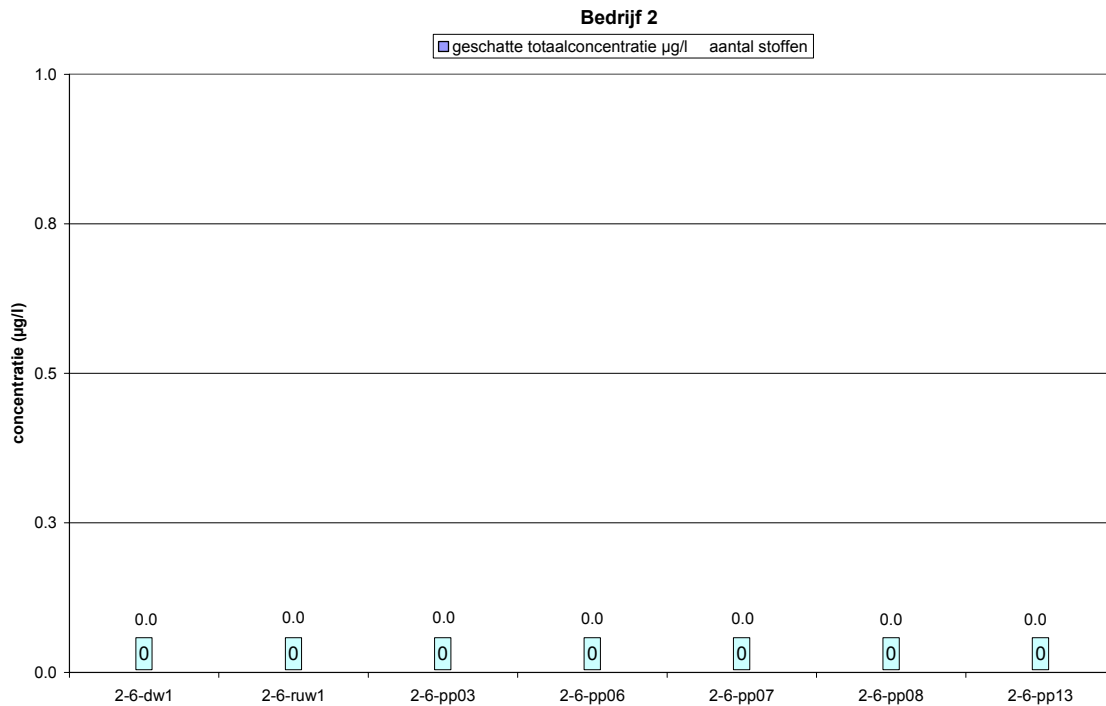
Bedrijf 2, winning 3, september-november 2005



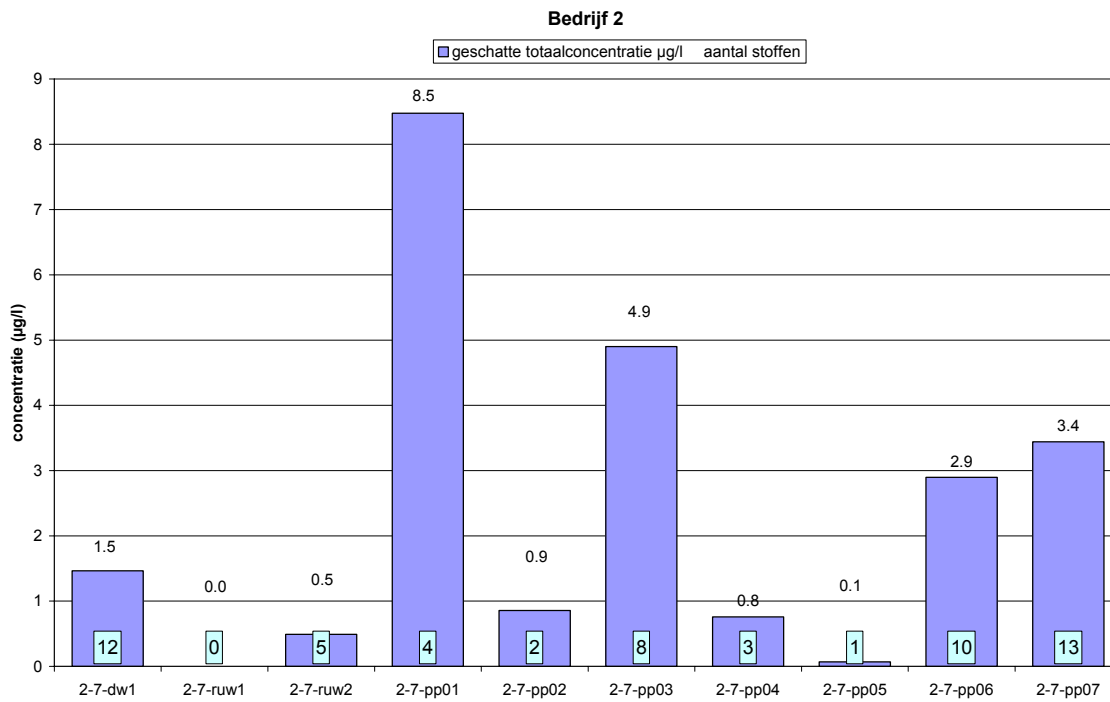
Bedrijf 2, winning 5, september-november 2005



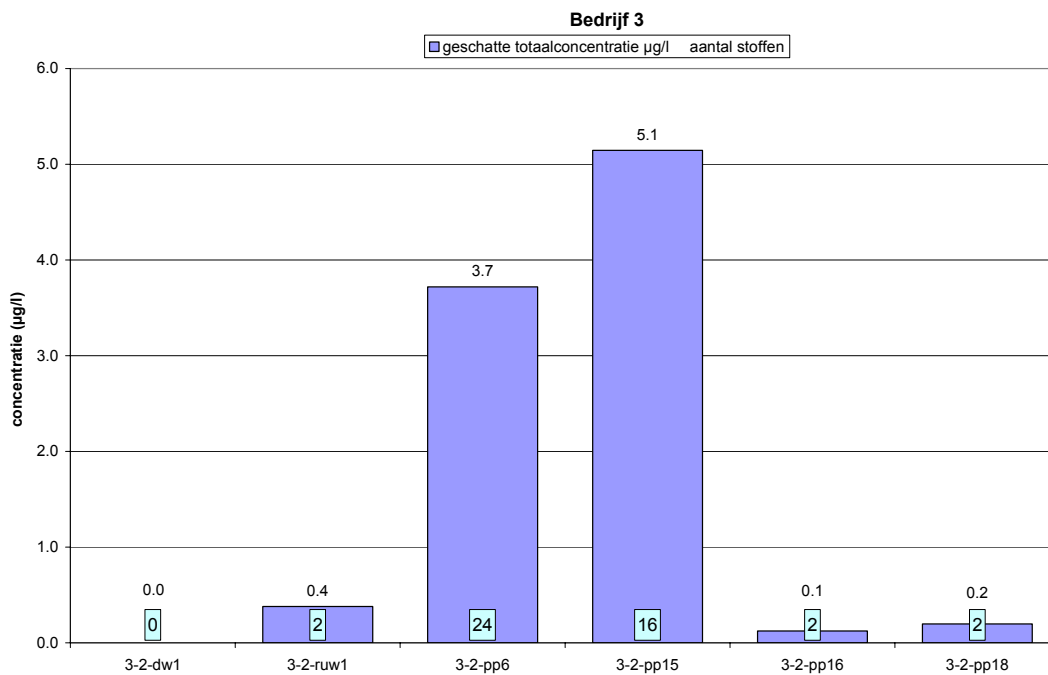
Bedrijf 2, winning 6, september-november 2005



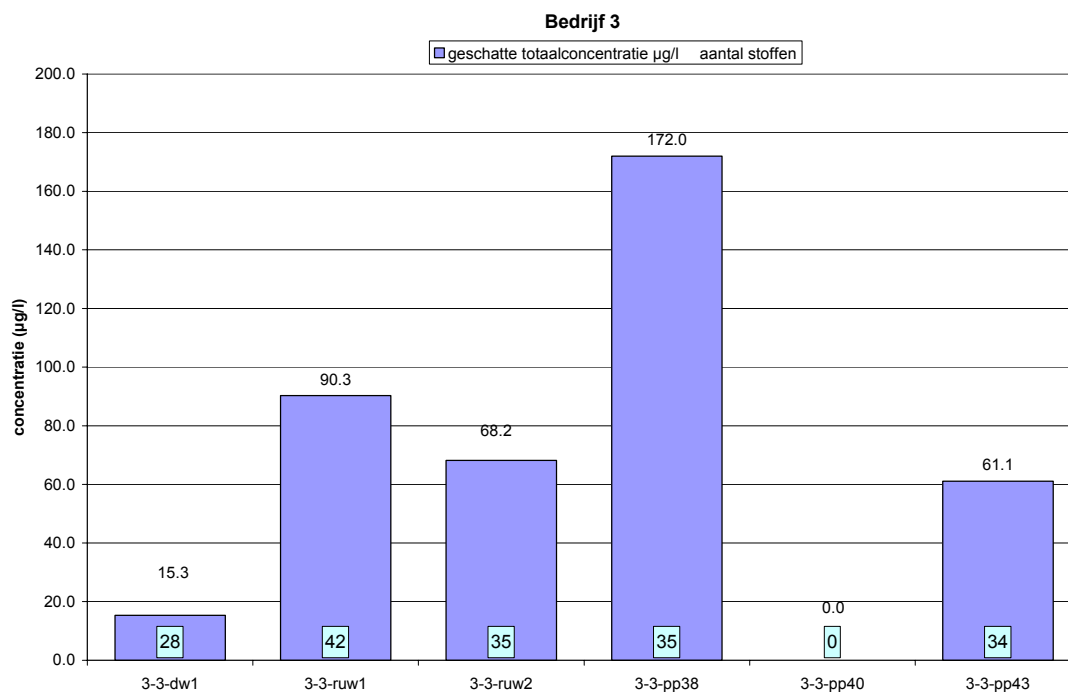
Bedrijf 2, winning 7, september-november 2005



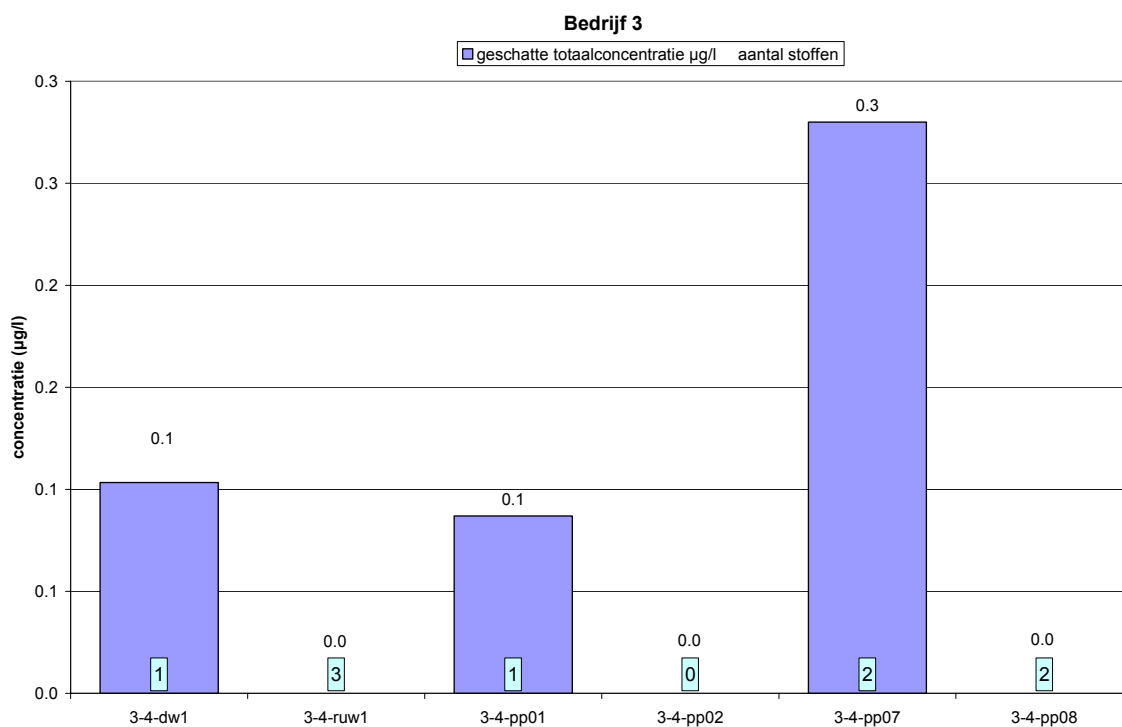
Bedrijf 3, winning 2, september-november 2005



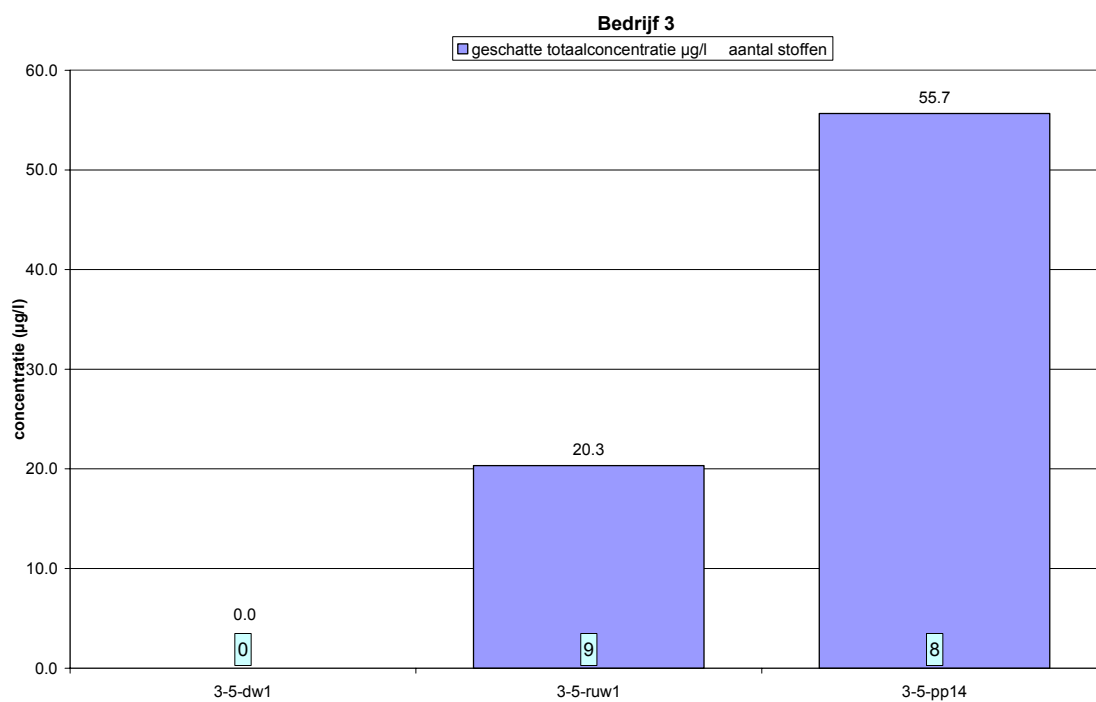
Bedrijf 3, winning 3, september-november 2005



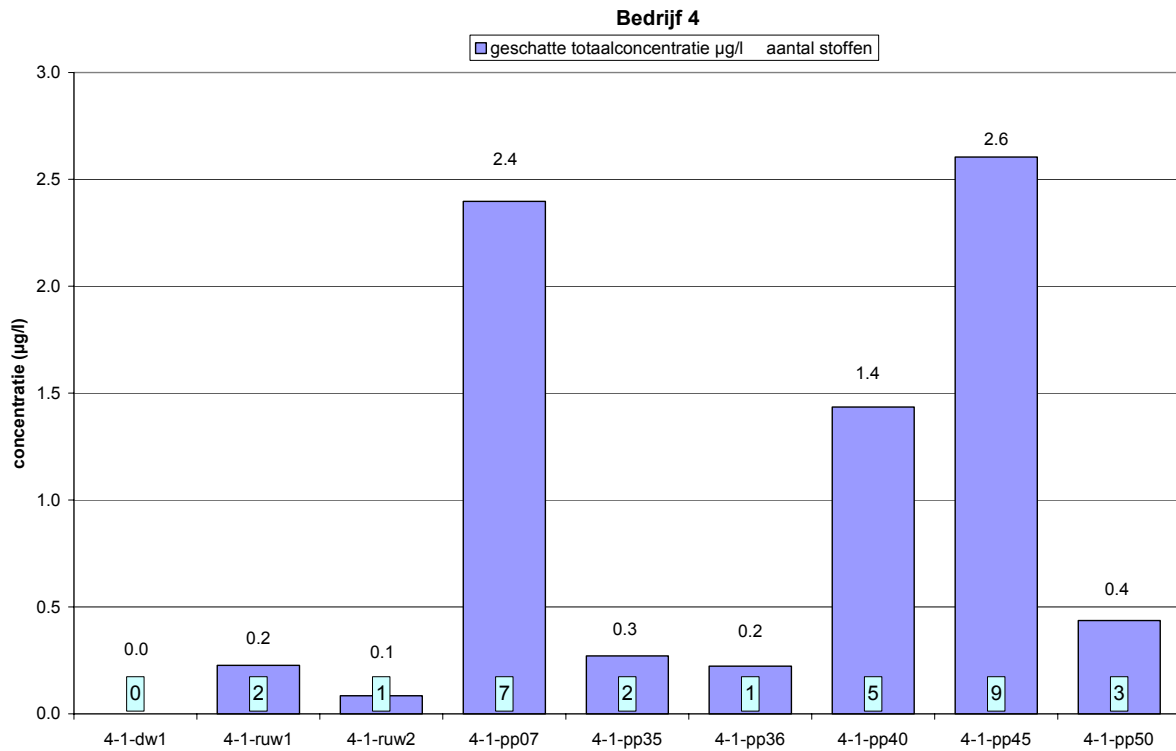
Bedrijf 3, winning 4, september-november 2005



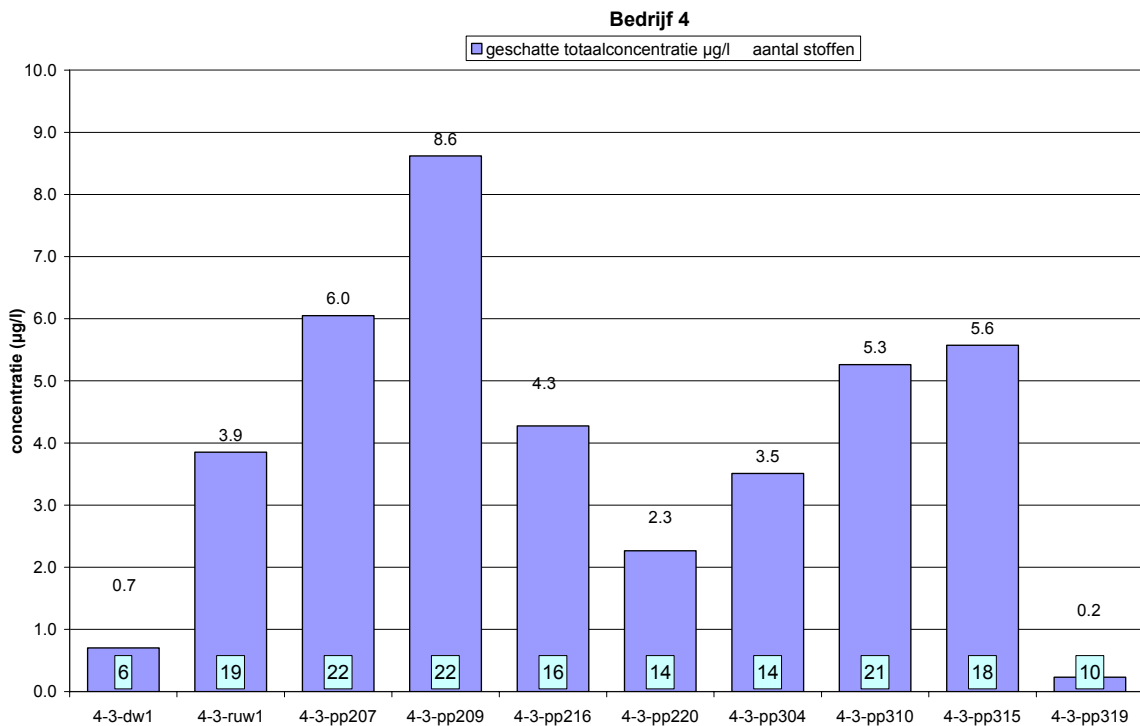
Bedrijf 3, winning 5, september-november 2005



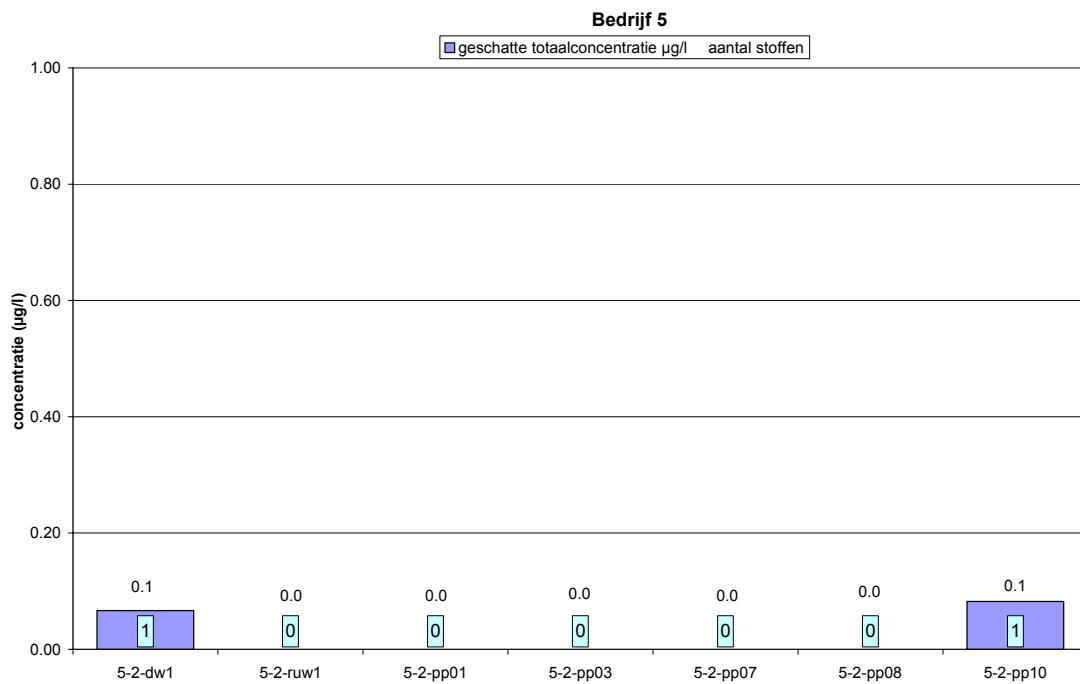
Bedrijf 4, winning 1, september-november 2005



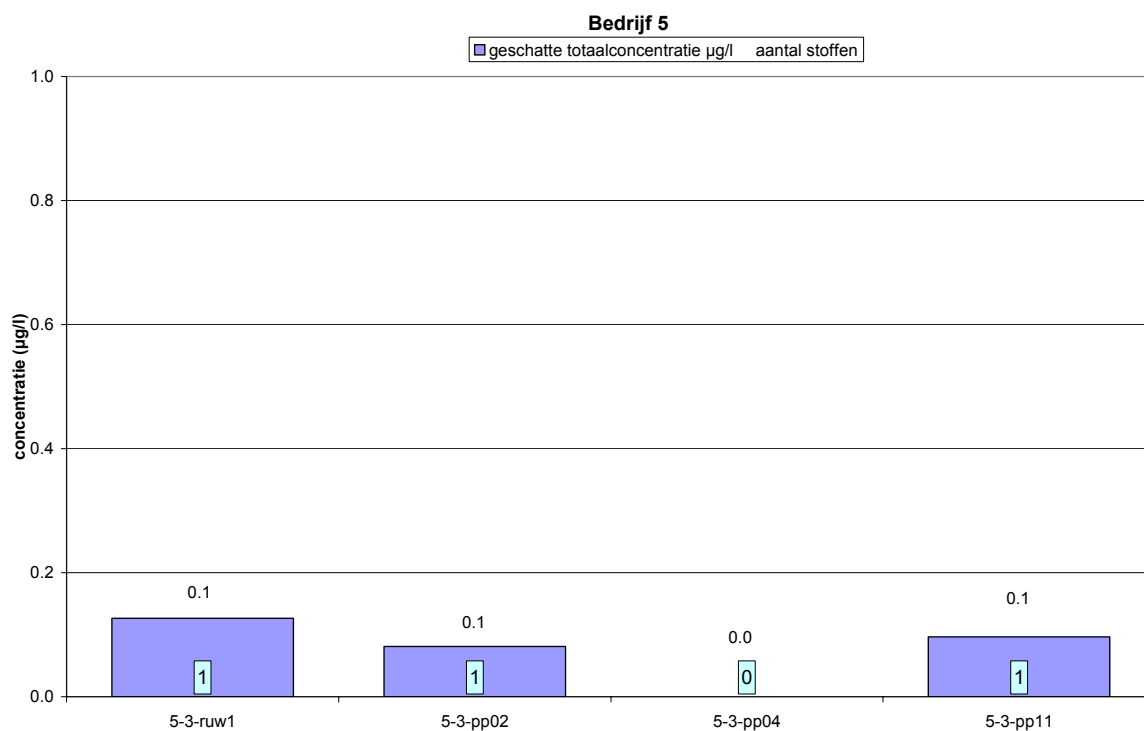
Bedrijf 4, winning 3, september-november 2005



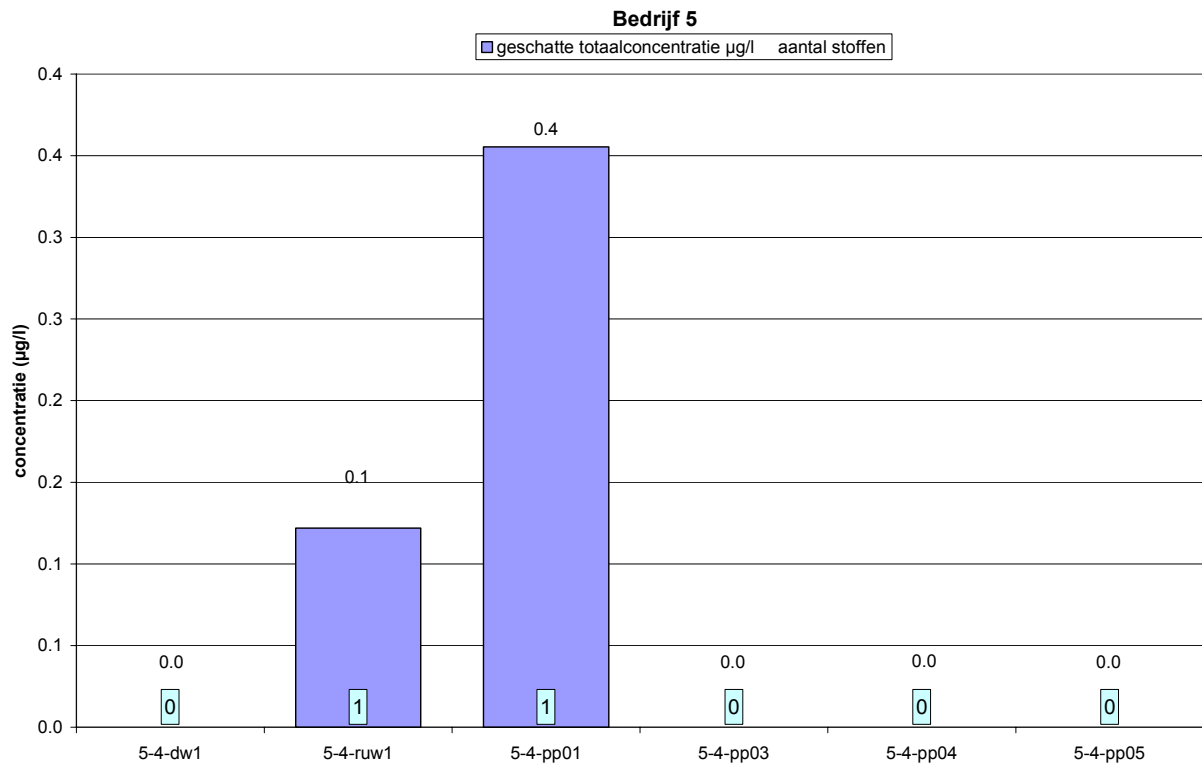
Bedrijf 5, winning 2, september-november 2005



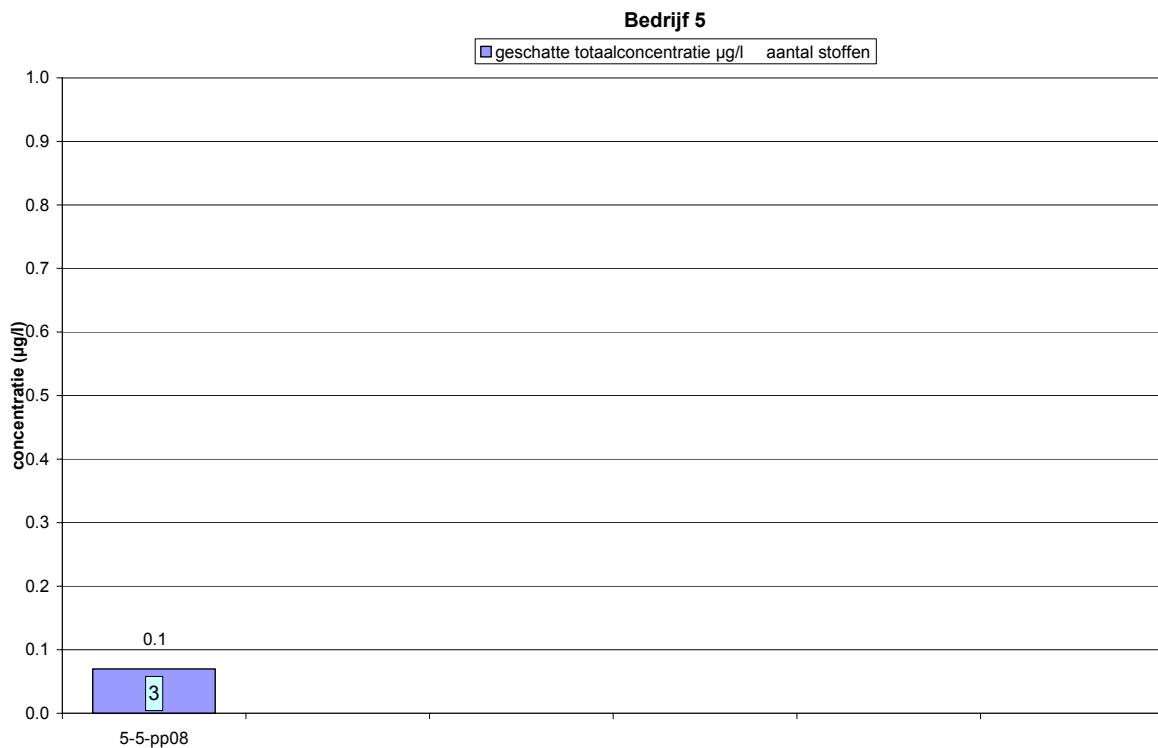
Bedrijf 5, winning 3, september-november 2005



Bedrijf 5, winning 4, september-november 2005



Bedrijf 5, winning 5, september-november 2005



IV Relaties monsterlocaties en landgebruik

Codering locatie	Landgebruik	Eerder gevonden stoffen
1-1-dw1		
1-1-dw2		
1-1-dw3		
1-1-pp02	landbouw, bos	
1-1-pp05	landbouw, bos	
1-1-pp09	landbouw, bos	
1-1-pp17	landbouw, bos	
1-1-ruw1		
1-1-ruw2		
1-1-wf01		
1-2-dw1		
1-2-dw2		
1-2-dw3		
1-2-pp20	landbouw	
1-2-pp24	stedelijk gebied	1,4-dioxaan en 1,1-dichloorethaan
1-2-pp39	stedelijk gebied, infiltratie	tri en per
1-2-pp43	stedelijk gebied	
1-2-pp45	landbouw, infiltratie	
1-2-ruw1		
1-2-ruw2		
1-2-ruw3		
1-3-pp01	landbouw, bos	
1-3-pp02	landbouw, bos	
1-4-dw1	bos	
2-1-pp08	landbouw, spoor	
2-1-pp24	spoor	
2-1-pp26	bos	
2-2-dw1		
2-2-pp03	landbouw	
2-2-pp10	landbouw	
2-2-pp13	landbouw	
2-2-pp15	landbouw	
2-2-pp16	landbouw	
2-2-pp16	landbouw	
2-2-ruw1	landbouw	
2-3-dw1		
2-3-pp01	landbouw	bentazon, MCP
2-3-pp02	landbouw	
2-3-pp03	landbouw	NO ₃
2-3-pp05	landbouw	
2-3-ruw1		
2-4-pp19	stedelijk gebied, spoor	
2-4-pp32	landbouw	
2-4-pp39	landbouw, spoor	
2-5-dw1		
2-5-pp01	stedelijk gebied	
2-5-pp04	stedelijk gebied	

2-5-pp18	stedelijk gebied, infiltratie	
2-5-pp19	stedelijk gebied	AOX
2-5-pp21	bedrijventerrein, landbouw	
2-5-pp22	stedelijk gebied	BAM
2-5-pp23	stedelijk gebied, infiltratie	
2-5-ruw1		
2-6-dw1		
2-6-pp03	landbouw	
2-6-pp06	landbouw, stedelijk gebied	
2-6-pp07	landbouw, stedelijk gebied	
2-6-pp08	landbouw, stedelijk gebied	
2-6-pp13	landbouw	bestrijdingsmiddelen
2-6-pp17	landbouw	
2-6-ruw1		
2-7-dw1		
2-7-pp01	stedelijk gebied, bos	
2-7-pp02	landbouw, natuur, stedelijk gebied	
2-7-pp03	stedelijk gebied	
2-7-pp04	spoor, bos, stedelijk gebied, landbouw	
2-7-pp05	spoor, bos, stedelijk gebied	
2-7-pp06	bos, stedelijk gebied, landbouw	
2-7-pp07	bos, stedelijk gebied, landbouw	
2-7-ruw1		
2-7-ruw2		
3-1-pp10	landbouw, infiltratie	
3-1-pp13	landbouw, infiltratie	
3-2-dw1		
3-2-pp06	stort, bos, landbouw, bedrijventerrein	
3-2-pp15	stort	
3-2-pp16	bos	
3-2-pp18	bos, landbouw	
3-2-ruw1		
3-3-dw1		
3-3-pp38	rioolwater, stedelijk gebied	VOCL
3-3-pp40	rioolwater, bos, stedelijk gebied	
3-3-pp43	rioolwater	
3-3-ruw1		
3-3-ruw2		
3-4-dw1		
3-4-pp01	stedelijk gebied, bos	
3-4-pp02	stedelijk gebied, bos	
3-4-pp03	stedelijk gebied, bos	
3-4-pp07	stedelijk gebied, bos, stort	
3-4-pp08	stedelijk gebied, bos	
3-4-ruw1	stedelijk gebied, bos	
3-5-dw1		
3-5-pp03	stedelijk gebied, bedrijventerrein	
3-5-pp10	stedelijk gebied, bedrijventerrein	
3-5-pp14	stedelijk gebied, bedrijventerrein	
3-5-ruw1		
4-1-dw1		
4-1-pp07	stedelijk gebied, stort	
4-1-pp35	stedelijk gebied, bos	
4-1-pp36	stedelijk gebied, bos	

4-1-pp40	stedelijk gebied
4-1-pp45	bedrijventerrein, stedelijk gebied
4-1-pp50	bedrijventerrein, stedelijk gebied
4-1-pp50	bedrijventerrein, stedelijk gebied
4-1-ruw1	
4-1-ruw2	
4-2-pp02	bos, landbouw
4-2-pp14	stort, bos, landbouw
4-2-ruw1	
4-3-dw1	
4-3-pp207	landbouw, infiltratie
4-3-pp209	landbouw, infiltratie
4-3-pp216	landbouw, infiltratie
4-3-pp220	landbouw, infiltratie
4-3-pp223	landbouw, infiltratie
4-3-pp304	landbouw, infiltratie
4-3-pp310	landbouw, infiltratie
4-3-pp315	landbouw, infiltratie
4-3-pp319	landbouw, infiltratie
4-3-ruw1	landbouw, infiltratie
5-1-pp20	
5-1-pp9	
5-1-ruw1	
5-2-dw1	
5-2-pp01	
5-2-pp02	
5-2-pp03	
5-2-pp07	
5-2-pp08	
5-2-pp10	
5-2-ruw1	
5-3-pp02	
5-3-pp04	
5-3-pp07	
5-3-pp11	
5-3-ruw1	
5-4-dw1	
5-4-pp01	
5-4-pp03	
5-4-pp04	
5-4-pp05	
5-4-ruw1	
5-5-pp08	

