

KWR 2016.018 | April 2016

DPWE robuustheid: toepassen van bioassays.

DPWE Zuiveringen

DPWE robuustheid: toepassen van bioassays.

KWR 2016.018 | April 2016

Opdrachtnummer

400607-006, 400911-007

Projectmanager

Luc Palmen, Bas Wols (KWR)

Opdrachtgever

Het onderzoeksprogramma van Dunea, PWN, Waternet en Evides (DPWE)

Kwaliteitsborger(s)

Pim de Voogt (KWR)

Auteur(s)

Merijn Schriks (KWR), Tinka Murk (WUR), Bas Hofs (KWR), Bas Wols (KWR)

Verzonden aan

Leden van de DPWE begeleidingsgroep zuivering

Dit rapport is niet openbaar en slechts verstrekt aan de opdrachtgevers van het contractonderzoekproject/adviesproject. Eventuele verspreiding daarbuiten vindt alleen plaats door de opdrachtgever zelf.

Jaar van publicatie
2016

Meer informatie

Merijn Schriks
T +31306969564
E merijn.schriks@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



KWR | April 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, 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.

Managementsamenvatting

Rapport titel:

DPWE robuustheid: toepassen van bioassays

Auteur(s):

Merijn Schriks (KWR), Tinka Murk (WUR), Bas Hof's (KWR), Bas Wols (KWR)

Datum verschijnen:

April 2016

Begeleidingsgroep:

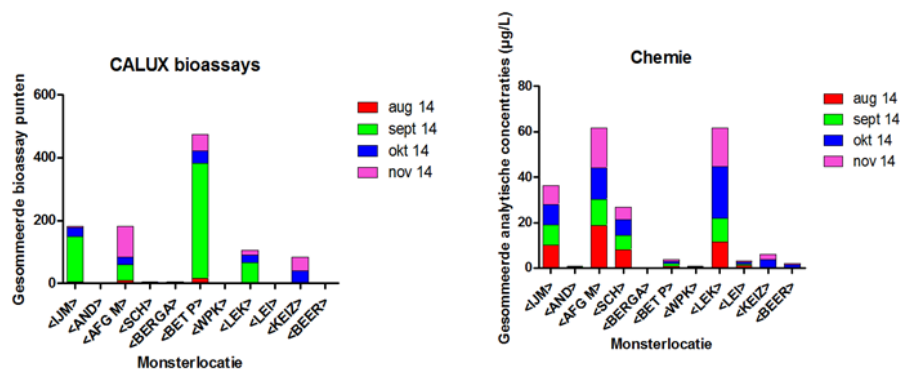
Bram Martijn (PWN), Wim Oorthuizen (Dunea), Eric Baars, Petra Scholte (Waternet), Rinnert Schurer (Evides)

Rapportnummer:

KWR 2016.018

Samenvatting:

Watermonsters van innamepunten (zg. bronnen) én drinkwater zijn onderzocht met een combinatie van bioassays en chemische analyses. Met name in de bronnen lieten de chemische analyses een breed spectrum organische microverontreinigingen zien en de bioassays een spectrum aan biologische activiteit. Figuur 13 uit het rapport toont verschillen tussen de geïntegreerde respons van de toegepaste CALUX bioassays (weergegeven door gesommeerde bioassay punten) en de gesommeerde analytische concentraties. Deze verschillen worden verklaard door het feit dat de zoetstoffen, complexvormers en metformine -die in relatief grote hoeveelheden worden aangetoond met de chemische analyses- geen biologische activiteit vertonen en dus geen respons geven in de bioassays. Hieruit blijkt een toegevoegde waarde van bioassays: chemische stoffen die biologisch niet relevant zijn, worden ook niet opgepikt.



Figuur 13. vergelijking tussen de geïntegreerde CALUX bioassay respons en de gesommeerde analytische concentraties.

Een aantal van de CALUX bioassays gaf wel een duidelijk signaal bij innamewater, maar geen in drinkwatermonsters. Glucocorticoiden werden zowel met de bioassays als met chemische metingen nauwelijks gevonden.

Bioassays:

Een bioassay geeft informatie over een mogelijk gezondheidskundig effect van de in een monster aanwezige chemische stoffen (genotoxiciteit, hormoonverstoring of effecten op het metabolisme). Bovendien geven bioassays een goed beeld van het effect van het aanwezige mengsel van chemische stoffen. Daarnaast detecteren bioassays ook de effecten van de afbraakproducten die kunnen ontstaan in de verwijdering, bijvoorbeeld met een oxidatieve behandeling. Dergelijke afbraakproducten kunnen ook reactief zijn.

Aanpak, monstername en voorbereiding:

Om de bruikbaarheid en de toegevoegde waarde van bioassays voor het huidige onderzoek te testen, zijn in 2014 op zes innameplaatsen in 4 achtereenvolgende maanden (voor Evides 2) monsters genomen door HWL en Aqualab Zuid. Met deze monsters zijn verschillende bioassays getest. Daarvoor werden de monsters eerst voorbereid met de standaard vaste fase extractie twee alternatieve protocollen. Dit deels in directe samenwerking met het postdoc project van Victoria Osorio Torrens. De voorbereide monsters zijn vervolgens getest met de gebruikelijke chemische analysemethoden, 9 routine bioassays (bij BDS) en 3 nieuwe bioassays (bij de WUR). Eén daarvan (acetylcholine-esterase, waarmee neurotoxiciteit wordt gemeten) kan worden geoptimaliseerd voor watermonsters, de andere twee werken niet goed door de aanwezigheid van interfererende stoffen zoals humuszuren.

Drempelwaarden:

In de huidige rapportage is tevens het handelingsperspectief inzichtelijk gemaakt. Voor monitoringdoeleinden hebben drempelwaarden van bioassays grote toegevoegde waarde. Zonder drempelwaarde is alleen te bepalen of het biologische effect verminderd gedurende drinkwaterbehandeling. Er waren slechts drempelwaarden voor twee van de gebruikte bioassays. Mede uit het huidige onderzoek is gebleken dat de toepassing van bioassays wel moet passen bij de onderzoeksopzet. Bioassays zonder drempelwaarde hebben beperkte toegevoegde waarde als ze maar een enkele keer (of kortlopend) toegepast worden. Meerjarige toepassing (bijvoorbeeld in RIWA verband) zou hier de gewenste opzet moeten zijn. Bioassays met drempelwaarde zijn ook geschikt voor enkelvoudige toepassing om de waterkwaliteit te evalueren. Als de respons onder de drempelwaarde blijft is er geen aanleiding tot verder verdiepend onderzoek en een risicoanalyse. Binnen gericht toegepast onderzoek om de efficiëntie van zuiveringsstappen te bepalen is dit anders: immers het feit dat het toepassen van een zuiveringstechniek aanleiding geeft tot nieuwe bioactieve stoffen, heeft meerwaarde op zichzelf hetgeen weer aanleiding kan zijn tot verder onderzoek.

Aanbeveling: panel bioassays combineren met chemische analyses.

De combinatie van bioassays en chemische analyses zegt meer over (organische micro)verontreinigingen in water en geeft een completer beeld dan alleen meten met alleen bioassays of chemie. De chemie maakt de aanwezigheid van microverontreinigingen inzichtelijk terwijl de bioassays de biologische betekenis beter duiden.

Belang voor DPWE:

De DPWE-bedrijven overwegen bioassays toe te voegen aan hun vijfjaarlijks uitgevoerde onderzoek naar de robuustheid van de zuivering, waarbij zij in pilotinstallaties testen hoe goed de zuivering werkt door voor zuivering specifieke stoffen toe te voegen en achteraf te meten hoeveel daarvan is verwijderd. Omdat het panel van bioassays wordt gecombineerd met artificiële spikes bij veelal onrealistische milieuconcentraties (>1 µg/L) is het voor de hand liggend dat (gezondheidskundige) drempelwaarden overschreden worden. Hiermee kunnen de bioassays mogelijk inzicht in de relatieve afname of toename van het gezondheidskundig effect voor- en na de zuiveringsstap onder DPWE-condities.

Van belang voor:

Verantwoordelijke voor drinkwaterkwaliteit

Verantwoordelijke voor de zuivering(sinstallatie)

Trefwoorden:

Bioassays, nieuwe stoffen, robuuste zuivering, genotoxiciteit, hormoonverstoring, inname, CALUX

Inhoud

Managementsamenvatting	3
Inhoud	6
1 Inleiding	7
2 Onderzoekopzet, bemonstering, materiaal en methoden	9
2.1 Onderzoekopzet	9
2.2 Monsterlocaties en bemonstering	9
2.3 Vaste fase extractie	10
2.4 Uitvoering in vitro CALUX bioassays	10
2.5 Uitvoering geavanceerde assays	10
2.6 Uitvoering analytische chemie	11
2.7 Verwerking resultaten	12
3 Resultaten en discussie	15
3.1 CALUX bioassays	15
3.2 Geavanceerde bioassays	18
3.3 Chemische analyses - Overzicht	21
3.4 Chemische analyses - per maand	22
4 Conclusies	25
5 Literatuur	28
Bijlage I Meetplan	29
Bijlage II Aanvullende data bioassays	30
Bijlage III Totaaloverzicht van de chemische meetresultaten (gemiddelde somconcentraties van stoffen in een detectiemethode) per monsterlocatie.	34

1 Inleiding

Dunea, PWN, Waternet (en sinds medio 2014 ook Evides) voeren in een vijfjarige cyclus onderzoek uit naar de robuustheid van hun drinkwaterzuiveringen in DPWE verband. De zuiveringen bestaan uit een diversiteit aan technologieën zoals duininfiltratie, poederkool en snelfiltratie, geavanceerde oxidatie/kool en UV/kool. De achterliggende redenering om dit onderzoek periodiek uit te voeren is dat er continu nieuwe inzichten verkregen worden over de aanwezigheid van antropogene chemische stoffen in de bronnen van drinkwater. Voor Dunea en Evides bestaat de bron voornamelijk uit Maaswater (respectievelijk afgedamde Maas en Maas) en voor PWN en (deels voor) Waternet uit door Rijn water beïnvloed oppervlakte water (respectievelijk Lek en Amsterdam Rijnkanaal¹) en IJsselmeer). Daarnaast gebruikt Waternet oppervlaktewater (uit kwel) uit de Bethunepolder. Dit is voor de genoemde drinkwaterbedrijven aanleiding om alert te blijven op (nieuw) gedetecteerde antropogene chemische stoffen in de bron van drinkwater en het gedrag daarvan tijdens de drinkwaterzuivering. Hoewel de ontwikkelingen binnen de analytische chemie het laatste decennium snel verlopen zijn, is de identificatie en structuuropheldering van grote aantallen stoffen een uitdaging. Daaraan gekoppeld blijft het duiden van eventuele gezondheidskundige risico's achter bij de snelle toename van het aantal analytisch chemisch bepaalde stoffen. Bioassays kunnen een complementaire rol spelen omdat deze niet alleen informatie leveren over de aanwezigheid van stoffen die een bepaald effect geven en de mate waarin een bepaald effect op kan treden, maar ook over het type effect (zoals hormoonverstoring). Daarnaast worden onbekende chemische stoffen gedetecteerd, mits het biologische mechanisme is vertegenwoordigd in de batterij bioassays. Bovendien geven in vitro bioassays ook een beeld van eventuele mengselinteracties die kunnen optreden door verschillende stoffen. Het is daarom ook niet verwonderlijk dat bioassays aanbevolen worden als complementaire tools voor de evaluatie van drinkwater kwaliteit (van Wezel et al., 2010). Bioassays kunnen in twee hoofdcategorieën ingedeeld worden namelijk (i) in vivo assays gebruik makend van levende organismen en (ii) in vitro assays gebruik makend van delen van organismen zoals levende cellen of geïsoleerde eiwitten. Binnen de tweede categorie zijn er bioassays beschikbaar die de aanwezigheid van potentieel toxische stoffen aangeven, onafhankelijk van een bepaalde groep organismen (bijvoorbeeld de aanwezigheid en toxische potentie van oestrogene stoffen in oppervlaktewater en drinkwater). Vanwege de vele bioassays die op dit moment (semi)commercieel beschikbaar zijn, is in het kader van BTO en het Europese DEMAU project uitgebreid literatuuronderzoek gedaan naar de voor- en nadelen van een selectie van in vitro bioassays (Schriks en Baken, 2015). In het literatuuronderzoek is de focus gericht op in vitro bioassays met eindpunten die relevant zijn voor de gezondheid van de mens. Voorts is op basis van eerder onderzoek zoals uitgevoerd door Escher et al. (2014) naar een selectie van biologische eindpunten gekeken, namelijk (i) hormoonachtige effecten, (ii) effecten op het metabolisme, (iii) reactieve effecten (zoals genotoxiciteit), (iv) effecten op de adaptieve stress respons en (v) effecten op de ontwikkeling en reproductie. Uit de literatuurinventarisatie volgt onder andere dat zgn. CALUX² bioassays een gunstige kosten/batenverhouding hebben. Deze bioassays bestaan uit genetisch gemodificeerde cellijnen die stabiel getransfecteerd zijn met een luciferase reporter gen. Door het luciferase reporter gen selectief achter een doelgen te plakken, kan de expressie (werking) van het betreffende doelgen gekwantificeerd worden.

¹ De bron Amsterdam Rijnkanaal wordt door Waternet slechts incidenteel ingezet als alternatief voor de Bethunepolder.

² Chemically Activated Luciferase Gene Expression

In het kader van het huidige project is door middel van een tweetal workshops discussie geweest over de batterij toe te passen bioassays. Naast de CALUX bioassays zijn door Wageningen UR drie andere bioassays uitgevoerd om de toepasbaarheid voor waterkwaliteit te evalueren. Het doel van het huidige project is om de toepasbaarheid van de verschillende bioassays te bepalen voor zuiveringsprocessen ten opzichte van analytisch chemische methoden. Onderstaande Tabel 1 presenteert de toegepaste bioassays en de bijbehorende eindpunten.

TABEL 1. TOEGEPASTE BIOASSAYS IN HET HUIDIGE PROJECT.

Type toxiciteit	Eindpunt	Mechanisme	Bioassays	Selectie doelstoffen
Niet specifiek Reactief	Cytotoxiciteit	Cytotoxiciteit voor gistellen	YES assay	Organotinverbindingen (tributyltin)
	Oxidatieve stress respons	Oxidatieve potentie	nrf2 CALUX	Polycyclische aromaten (benzo[a]pyreen)
	Mutageniteit	Mutagene potentie (met en zonder metabole activatie)	p53 CALUX +/- S9	Genotoxische stoffen (cyclofosfamide)
Specifiek	Detoxificatie	Eiwit expressie/detoxificatie	PXR CALUX	Geneesmiddelen (nicardipine)
	Endocrien	Oestrogene activiteit	ERa CALUX	Oestrogene stoffen (oestradiol)
	Endocrien	Glucocorticogene activiteit	GR CALUX	Glucocorticoïden (dexamethason)
	Endocrien	Metabolisme	PPARg CALUX	Geneesmiddelen (rosiglitazone)
	Endocrien	Anti-androgeniteit	Anti-AR CALUX	Ftalaten, fenolen en esters (bisfenol A)
	Endocrien	Binding aan schildklierhormoon transporters	TTR assay	Polybroomdifenylethers (BDE66)
	Neurotoxiciteit	Inhibitie van acetylcholineesterase (AChE)	AChE assay	Pesticiden (dichloorvos)

2 Onderzoeksopzet, bemonstering, materiaal en methoden

2.1 Onderzoeksopzet

De onderzoeksopzet is verdeeld in twee componenten, namelijk “routine” en “advanced” (zie bijlage 1). De routinecomponent richt zich op standaardopwerking van watermonsters (oppervlakte- én drinkwater) met Oasis HLB (200 mg) Solid Phase Extraction (SPE) kolommen en analyse van waterextracten in een zevental CALUX bioassays namelijk: ERa CALUX, anti AR CALUX, GR CALUX, PXR CALUX, PPAR γ CALUX, nrf2 CALUX en de p53 CALUX. De resultaten zijn vergeleken met analyseresultaten (brede screening) uit de routineanalyses van DPWE voor de betreffende monsterlocaties.

De tweede component van het onderzoek (“advanced”) richt zich meer op exploratief onderzoek met oppervlaktewater verzameld in de maanden september en november (voor Evides alleen in de maand november). In deze component van het onderzoek werden de oppervlaktewatermonsters eveneens geëxtraheerd worden met alternatieve extractiemethoden waaronder Oasis MCX en de Singer SPE cartridge. Deze laatste cartridge is opgebouwd uit meerdere laagjes verschillende vaste fase en moet met de hand gepakt worden.

De extracten zullen voor twee doelen gebruikt worden namelijk voor identificatie van stoffen met behulp van geavanceerde analytische chemie (postdoc project EDA EMERGE) en analyseren op effecten in een selectie van geavanceerde bioassays namelijk: TTR-ANSA assay, AChE assay en de yeast toxicity assay. De eerste twee genoemde bioassays zullen uitgevoerd worden met én zonder metabole activatie, dus er worden in totaal 5 bioassays uitgevoerd in de “advanced” component van het onderzoek (samenwerkingspartner WUR). In aanvulling zullen de DMSO extracten ook getest worden in de “standaard” CALUX bioassays.

2.2 Monsterlocaties en bemonstering

Voor Dunea, PWN en Waternet is in de maanden augustus (18-19), september (15-16), oktober (13-14) en november (10-11) 2014 bemonsterd op de locaties die vermeld staan in Tabel 2. De oppervlaktewateren zijn door middel van steekmonsters verzameld. Omdat Evides in een later stadium van het onderzoek betrokken is geraakt, zijn voor Evides alleen monsters verzameld en geanalyseerd in de maanden oktober en november 2014. In totaal zijn er vijf oppervlaktewatermonsters verzameld en zes drinkwatermonsters. De bemonstering voor Dunea, PWN en Waternet is uitgevoerd door het Waterlaboratorium (HWL) en voor Evides door Aqualab Zuid (ALZ). Na bemonstering in (door KWR geleverde) 1000 mL ultra-schone glazen groene flessen, werden de monsters binnen een dag bij KWR afgeleverd waar ze maximaal 2 dagen gekoeld en donker bewaard werden.

TABEL 2. MONSTERLOCATIES EN LABORATORIUMCODERING.

Bedrijf	Oppervlaktewater	Labcodering	In dit rapport gehanteerde afkorting	Drinkwater	labcodering	In dit rapport gehanteerde afkorting
Dunea	Afgedamde Maas	PBL-INF	AFG M	Scheveningen	PSC-DW	SCH
Dunea				Bergambacht PILOT	PBA-PI-O3UVL-EF-1	BERGA
PWN	IJsselmeer Andijk	IJM-PWN	IJS	Andijk	PAN-PO-RW	AND
Waternet	Lek	PNG-OW-02	LEK	Leiduin	PLD-RW-001	LEI
Waternet	Toevoerkanaal Bethunepolder	WBR-TK-001	BET P	Weesperkarspel	PWK-PO-001	WPK
Evides	Maas - Keizersveer	RKEI00MEET	KEIZ	Beerenplaat	PBPL80HD2-2	BEER

2.3 Vaste fase extractie

De vaste fase extracties werden uitgevoerd volgens protocol zoals beschreven in Kolkman et al., 2014 en Huntscha et al., 2012. Samengevat werden de HLB en MCX cartridges gepreconditioneerd met acetonitril, methanol en aangezuurd demiwater. De watermonsters werden aangezuurd en gefilterd over een 0,45 µM filter. Daarna werden de watermonsters (1 liter per cartridge) over de cartridges geleid met een snelheid van 10 mL/minuut. Hierna werden de cartridges gespoeld met 8 mL aangezuurd demiwater. Tenslotte werden de cartridges gedroogd met stikstof en geëluëerd met 2,5 mL acetonitril en 2 x 2,5 mL ammoniumhydroxide. Een deel van het extract werd gebruikt voor chemische analyse en het andere deel werd drooggedampt en opgelost in 50 µL DMSO (totale concentratiefactor = 20.000 x).

De Singer cartridge werd met de hand samengesteld door een lege cartridge te vullen met 10 mg Oasis HLB en 10 mg van een mengsel Stata-X-AW, Strata-X-CW en Isolute ENV+ in een verhouding 1/1/1,5. De watermonsters werden met een snelheid van 2 mL/minuut over de cartridges geleid en daarna (in terugspoelopstelling) geëluëerd in methanol met 0,1% mierenzuur met een snelheid van 30 µL/minuut gedurende 7 minuten. De verdere procedure verliep zoals boven beschreven.

2.4 Uitvoering in vitro CALUX bioassays

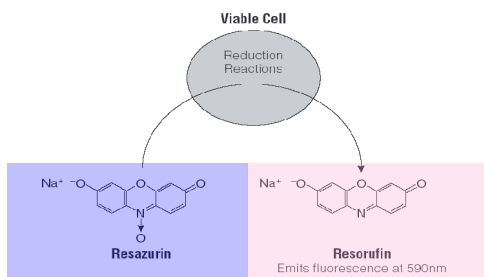
De CALUX bioassays zijn uitgevoerd zoals beschreven in van der Linden et al. (2014). Samengevat werden de cellen verdeeld in 96 wells microtiterplaten met medium. Na 24 uur incubatie bij 37°C en 7,5% CO₂, werd het medium vervangen door vers medium met de verdunde extracten. Na 24 uur incubatie werd het medium verwijderd en werden de cellen gelyseerd in 30 µL buffer. De hoeveelheid luciferase werd gemeten met een luminometer. In het geval van anti-androgeniteit (anti-AR CALUX) was de procedure hetzelfde, maar werd de positieve controle dihydrotestosteron (DHT) toegevoegd op EC₅₀ niveau.

2.5 Uitvoering geavanceerde assays

Yeast Toxicity Assay

De yeast toxicity assay (afgekort YTA) is gebaseerd op het feit dat levende cellen mitochondriale enzymen bezitten die in staat zijn om chemische stoffen te metaboliseren. De levensvatbaarheid van de cellen bepaald de enzymactiviteit. Deze bioassay is gebaseerd op het vermogen van levende cellen om een blauwe kleurstof (resazurine) om te zetten in een fluorescente roze eindproduct (resorufine) (figuur 1). De levensvatbaarheid van de gistcellen kan bepaald worden door de hoeveelheid gevormd resorufine te meten bij een excitatiegolflengte van 530 nm en een emissiegolflengte van 590 nm. Tributyltin (TBT) wordt gebruikt als positieve referentiestof.

FIGUUR 1. OMZETTING VAN RESAZURINE NAAR RESORUFINE DOOR GISTCELLEN.



ANSA-TTR assay

Deze assay wordt gebruikt om te bepalen in welke mate chemische stoffen in staat zijn om thyroxine (T4) van het transporteiwit transthyretine (TTR) te verdringen. Bij de ANSA-TTR wordt als modelstof voor T4 een fluorescerend label (ANSA) gebruikt. Als TTR en het label ANSA gebonden zijn geeft dit een fluorescente respons (Montano et al., 2012). Echter, in de aanwezigheid van T4, individuele stoffen of milieuextracten zal het label ANSA verdrongen worden van TTR, hetgeen resulteert in een afname van de fluorescente respons. De fluorescentie wordt gemeten bij een excitatiegolflengte van 375 nm en een emissiegolflengte van 475 nm.

AChE assay

In het centrale zenuwstelsel wordt informatie doorgegeven (prikkeloverdracht) door z.g. neurotransmitters. Deze worden uitgescheiden door een presynaptisch neuron en binden aan receptoreiwitten die zich in het postsynaptisch deel bevinden (bijvoorbeeld een spier). Een van de belangrijkste neurotransmitters is acetylcholine (ACh). Om de prikkeloverdracht te stoppen wordt ACh snel gehydrolyseerd door het enzym acetylcholinesterase (AChE). Vergelijkbaar met acetylcholine kunnen sommige insecticiden (en geneesmiddelen) binden aan AChE, maar de hydrolyse vindt veel langzamer (of niet) plaats. Dat betekent dat het enzym geblokkeerd raakt en acetylcholine het postsynaptisch deel overprikkelde. In de AChE assay wordt de inhibitie van het enzym AChE bepaald ten opzichte van een positieve controle namelijk dichloorvos. Het enzym AChE wordt geïsoleerd uit de koppen van bijen en geïncubeerd met de milieuextracten. Vervolgens wordt het substraat acetylthiocholine (ATC) toegevoegd wat gehydrolyseerd zal worden tot acetaat en thiocholine door het deel van AChE dat niet geïnhibeerd is. De indicator DNTB vormt een geel complex met het geproduceerde thiocholine dat met behulp van een spectrofotometer gemeten kan worden. De hydrolyse van ATC wordt gedurende 8 minuten gevolgd en de potentie wordt uitgedrukt ten opzichte van dichloorvos. Op dit moment zijn er twee methoden beschikbaar namelijk de commerciële Amplex red assay en de reeds genoemde versie met bijenkoppen (zie tevens Hamers et al., 2000).

2.6 Uitvoering analytische chemie

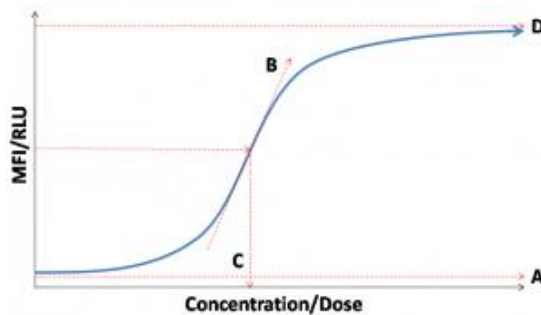
Voor de rapportage is gebruik gemaakt van verschillende bronnen voor de chemie. Voor de maanden augustus t/m november 2014 is er voor de locaties van PWN, Dunea en Waternet gebruik gemaakt van de (maandelijkse) chemische analyses van HWL. Voor oktober en november 2014 is er voor de locaties van Evides gebruik gemaakt van de (maandelijkse) chemische analyseresultaten van Aqualab Zuid. Voor een uitgebreide beschrijving van materialen en methoden wordt verwezen naar de respectievelijk rapportages van HWL en Aqualab Zuid. Daarnaast zijn er voor september en november 2014 voor alle locaties bij KWR

extracties uitgevoerd met verschillende extractiematerialen, te weten Oasis HLB, MCX en Singer.

2.7 Verwerking resultaten

2.7.1 In vitro CALUX bioassays

Van alle bioassays zijn standaard concentratie-responscurves gegenereerd met behulp van een referentiestof (zie willekeurig voorbeeld figuur 2). Meestal levert de relatie tussen concentratie en respons een typische S-vormige curve. In het algemeen wordt de respons van het monster geïnterpoleerd in het lineaire deel van de S-vormige curve. Soms is het noodzakelijk om het monster te verdunnen omdat anders de respons buiten het lineaire deel van de S-vormige curve valt. De geïnterpoleerde y-waarde (respons) levert een x-waarde die de concentratie van het monster vertegenwoordigt uitgedrukt als equivalent eenheden van de referentiestof (bijvoorbeeld nanogram oestradiol equivalenten per liter).



FIGUUR 2. GRAFISCHE REPRESENTATIE VAN EEN CONCENTRATIE-RESPONS CURVE. OP DE HORIZONTALE AS STAAT DE CONCENTRATIE VAN EEN REFERENTIESTOF UITGEZET EN DE VERTICALE AS GEEFT DE DAARMEE CORRESPONDERENDE RESPONS WEER IN DE BIOASSAY. MAXIMALE CONCENTRATIE (A), HELLINGSHOEK VAN HET LINEAIRE GEDEELTE (B), VANUIT DE RESPONS GEÏNTERPOLEERDE CONCENTRATIE (C), PLATEAU VAN DE RESPONS (D).

Tabel 3 presenteert een overzicht van de verschillende toegepaste CALUX bioassays en de bijbehorende referentiestoffen.

TABEL 3. TOEGEPASTE CALUX BIOASSAYS EN BIJBEHORENDE REFERENTIESTOFFEN.

Toegepaste CALUX bioassays	Referentiestof
ERa CALUX	17b estradiol
GR CALUX	Dexamethasone
PPARg CALUX	Rosiglitazone
Anti-AR CALUX	Flutamide
PXR CALUX	Nicardipine
nrf2 CALUX	Curcumine
p53 CALUX (zonder S9)	Actinomycine
p53 CALUX (met S9)	Cyclofosfamide

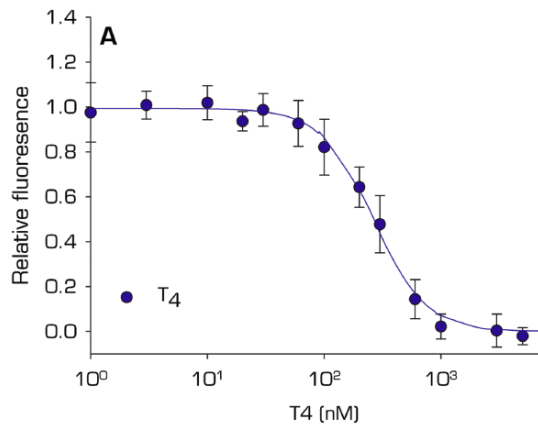
2.7.2 Geavanceerde assays

Yeast Toxicity Assay

De vitaliteit van de blootgestelde gistcellen wordt gerelateerd aan de concentratie-responscurve met tributyltin (TBT). De waterextracten werden 400 maal verdund in demiwater. Deze verdunde extracten werden gebruikt om de gistcellen bloot te stellen.

ANSA-TTR assay

De binding van onbekende stoffen aan het transporteiwit TTR wordt gerelateerd aan de binding door T4 (zie figuur 3).

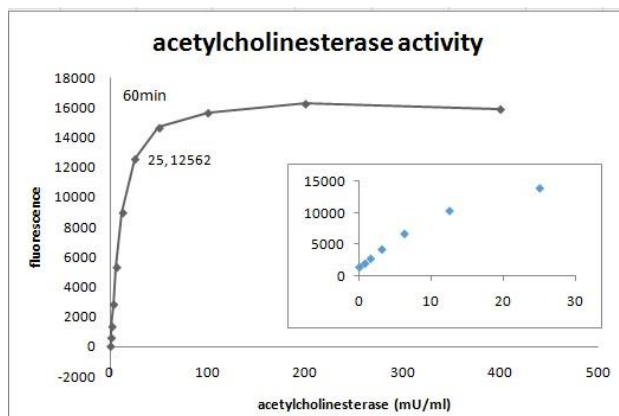


FIGUUR 3. VERDRINGINGSCURVE VAN ANSA BINDING AAN TTR DOOR T4 (MONTANO ET AL., 2012).

Vergelijkbaar met de YTA assay werden alle waterextracten getest op een eventueel achtergrondsignaal. Daarvoor werd een scan gemaakt van het emissiespectrum bij een vaste excitatie golflengte van 375 nm.

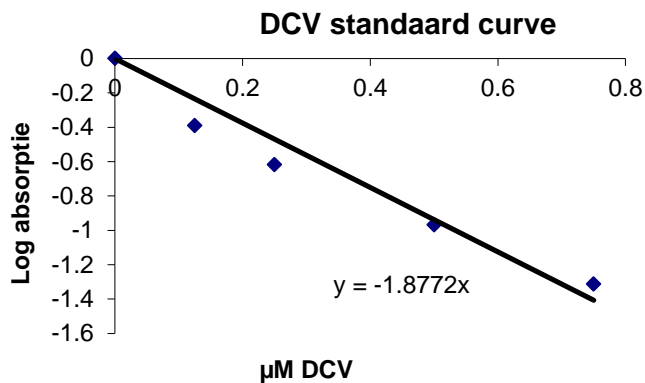
AChE assay

Figuur 4 illustreert de relatie tussen de vrije fractie AChE en de fluorescentie. Deze is lineair zolang de vrije fractie AChE lager is dan 25 mU/mL. De remming door het monster wordt in de Amplex red assay bepaald door vergelijking met de dosis-responscurve van de vrije fractie enzym.



FIGUUR 4. ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITEIT GEMETEN ALS RESORUFINEPRODUCTIE (FLUORESCENTIE) MET EEN TOENEMENDE ENZYMCENTRATIE (AMPLEX RED ASSAY).

In de AChE assay variant waarbij bijenkoppen gebruikt worden, wordt de remming bepaald door deze te vergelijken met de remming door de modelstof dichloorvos (DCV) (figuur 5).



FIGUUR 5. DICHLOORVOS (DCV) STANDAARD CURVE VOOR DE INHIBITIE VAN ACETYLCHOLINESTERASE IN DE ACHE VARIANT WAARBIJ BIJENKOPPEN GEBRUIKT WORDEN.

2.7.3 Analytische chemie

Aangezien een groot deel van de data bij HWL is gemeten (hoofdzakelijk met behulp van LC-MS/MS), is uitgegaan van de stoffen en methoden zoals deze bij HWL worden gemeten. Er is besloten om de data op een hoger aggregatieniveau te bekijken, en individuele stoffen zo veel mogelijk buiten beschouwing te laten, behalve daar waar dat duidelijk een meerwaarde gaf. Voor elke maand is een overzicht gemaakt. Deze overzichten zijn ingedeeld met de monsterlocaties en de methodes (van HWL). Voor de data van KWR en Aqualab Zuid geldt dat de gehanteerde detectiemethodes zijn heringedeeld volgens de methodiek van HWL, om een vergelijking op dit niveau mogelijk te maken. Om in één oogopslag een overzicht te kunnen krijgen is gewerkt met een kleurenschema, waarmee de hoogte van de concentraties is aangegeven. De volgende categorieën zijn daarbij onderscheiden: niet gemeten, onder de rapportagegrens, tot 100 ng/l, tot 1 μg/l en meer dan 1 μg/l.

3 Resultaten en discussie

3.1 CALUX bioassays

Tabel 5 presenteert een overzicht van de resultaten van de verschillende CALUX bioassays. Slechts voor twee van de acht uitgevoerde CALUX bioassays zijn streefwaarden (ook wel trigger values genoemd) beschikbaar namelijk 3,8 ng oestradiol equivalenten/L en 21 ng dexamethason equivalenten/L voor respectievelijk de ER CALUX en GR CALUX (Brand et al., 2013). Voor de andere toegepaste CALUX bioassays geldt dat de trigger values nog ontwikkeld moet worden binnen de diverse onderzoeksprogramma's zoals bijvoorbeeld BTO. Tabel 5 presenteert de resultaten van de CALUX bioassays op een andere manier, namelijk als verhoging ten opzichte van de bioassay aantoonbaarheidsgrens (LOD). De aantoonbaarheidsgrens van de individuele CALUX bioassays is opgenomen in tabel 5.

De data is op deze manier uitgewerkt om deze overzichtelijker te presenteren en om een snelle "hotspot" analyse te faciliteren. Hiervoor zijn vijf arbitraire classificaties gehanteerd namelijk niet verhoogd (blauw), 1-3 maal verhoogd ten opzichte van de LOD (groen), 3-10 maal verhoogd ten opzichte van de LOD (geel), 10-30 maal verhoogd ten opzichte van de LOD (oranje) en tenslotte 30-100 maal verhoogd ten opzichte van de LOD (rood). Deze manier van weergeven heeft géén relatie met eventuele gezondheidkundige effecten (zoals bij trigger values), maar is richtinggevend om te beoordelen waar effecten worden gevonden. De resultaten zoals behaald met Oasis MCX en de Singer SPE cartridge zijn niet uitgewerkt in de huidige rapportage omdat deze elders gepubliceerd zullen worden (Torrens et al., publicatie in voorbereiding). In zijn algemeenheid wordt er in drinkwater soms een (zeer lage) respons gevonden in de toegepaste CALUX bioassays. De achtergrond van deze respons is niet bekend, maar verdient niet directe aandacht omdat de respons zeer laag is (nét boven de LOD). De hoogste oestrogene activiteit werd in november gemeten in de Afdamde Maas (1.8 ng oestradiol equivalenten/L). Gedurende de meetperiode werd geen enkele keer glucocorticogene activiteit gemeten. Dit is opmerkelijk omdat in het verleden glucocorticogene activiteit in de Rijn gerapporteerd werd tot een hoogte van ca. 3 ng dexamethason equivalenten/L (o.a. Schriks et al., 2013). Verder blijkt uit de chemische analyse (uitgevoerd door HWL) dat in oktober triamcinolone acetonide met een concentratie van 390 ng/L is aangetroffen in het Lekkanaal. Deze concentratie zou zeker een respons moeten leveren in de GR CALUX en deze discrepantie is op het moment van schrijven dan ook niet te verklaren. Alle responsen zoals behaald met ER CALUX en de GR CALUX waren beneden de gezondheidkundige trigger values. Met behulp van de anti-AR CALUX worden verschillende anti-androgene responsen gevonden o.a. in de Bethunepolder en in het Lekkanaal. Potente anti-AR respons is eerder geobserveerd in een speerpuntonderzoek van Waternet. Op dit moment is er nog niet veel ervaring met het verklaren van anti-androgene responsen, maar een artikel van Weiss et al., 2009 wijst in de richting van bepaalde fenolen en ftalaten zoals nonylfenol. In aanvulling is bekend dat NOM (humuszuren) en sommige pesticiden een anti-androgene respons kunnen geven. Uitsluitend in de maand september zijn responsen in de PPAR CALUX geobserveerd. Dit is opmerkelijk en kan op het moment van schrijven niet goed verklaard worden. De PXR CALUX is een relatief aspecifieke bioassay die gevoelig is voor een breed spectrum aan chemische stoffen. De resultaten maken dit als zodanig inzichtelijk omdat de bioassay in de meeste gevallen (ten opzichte van andere bioassays) een positieve respons geeft. De nrf2 CALUX is ook een relatief aspecifieke bioassay die gevoelig is voor m.n. reactieve stoffen zoals desinfectiebijproducten. Recentelijk is met de nrf2 CALUX ervaring opgedaan in het kader van BTO Verkennend Onderzoek/DPWE

robuustheidsproef 2013. Het bleek dat ozonering een uitstekende methode is om een breed bereik aan (toegevoegde) chemische stoffen te verwijderen. Uit het resultaat van de nrf2 CALUX bleek dat er ook nieuwe reactieve stoffen gevormd werden, die tenslotte goed verwijderd werden door GAC (Schriks et al., niet gepubliceerde data). In het huidige meetplan geeft de nrf2 CALUX slechts een bescheiden respons. Dit kan te maken hebben met de gevoeligheid van de bioassay. Tenslotte is de p53 CALUX toegepast als parameter voor genetische schade. Met uitzondering van een verhoogde respons in de Bethunepolder (mét S9) (september 2014) maakt deze bioassay inzichtelijk dat er nauwelijks genotoxische activiteit gevonden wordt in de bronnen en dat deze afwezig is in drinkwater.

TABEL 5. OVERZICHT VAN RESULTATEN VAN DE RESPONS IN VERSCHILLENDE CALUX BIOASSAYS VAN EXTRACTEN VERKREGEN MET HLB KOLOMMEN (VOOR RUWE DATA ZIE BIJLAGEN II EN III). DE RESULTATEN ZIJN GECATEGORISEERD T.O.V. LOD (ZIE TEKST). VOOR AFKORTINGEN ZIE TABEL 2. DE AANTOONBAARHEIDSGRENS (LOD) VAN DE RESPECTIEVELIJK CALUX ASSAYS IS 0.02 NG 17 β -ESTRADIOL EQ/L (ER α CALUX), 2.2 NG DEXAMETHASONE EQ/L (GR CALUX), 28 NG ROSAGLITAZONE EQ/L (PPAR CALUX), 130 NG FLUTAMIDE EQ/L (ANTI-AR CALUX), 18 μ G NICARDIPINE EQ/L (PXR CALUX), 30 μ G CURCUMINE EQ/L (NRF2CALUX), 1231 PG ACTINOMYCINE D EQ/L (P53 CALUX - S9 EN 50,1 μ G CYCLOPHOSPHAMIDE EQ/L.

AUG 2014													1	x LOD
HLB extractie	Bioassay	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BERGA>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>	1,1-3	x LOD
Endocrine interference	Era CALUX	1	1	1	1	1	7,5	1	1	1	NB	NB	3,1-10	x LOD
	GR CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NB	NB	10,1-30	x LOD
	anti-AR CALUX	1	1	6	1	1	5	1	1	1	NB	NB	30,1-100	x LOD
Metabolic interference	PPAR CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NB	NB		
	PXR CALUX	1,6	1	1,7	1	1,5	1,5	1	1,6	1	NB	NB		
Oxidative stress respons	nrf2 CALUX	2,5	1	1,1	1	1	1,8	1	1	1	NB	NB		
Genotoxicity	p53 CALUX + S9	1,3	1	1	1	1	1	1	1	1	NB	NB		
	p53 CALUX - S9	1	1	1	1	1	1,2	1	1	1	NB	NB		

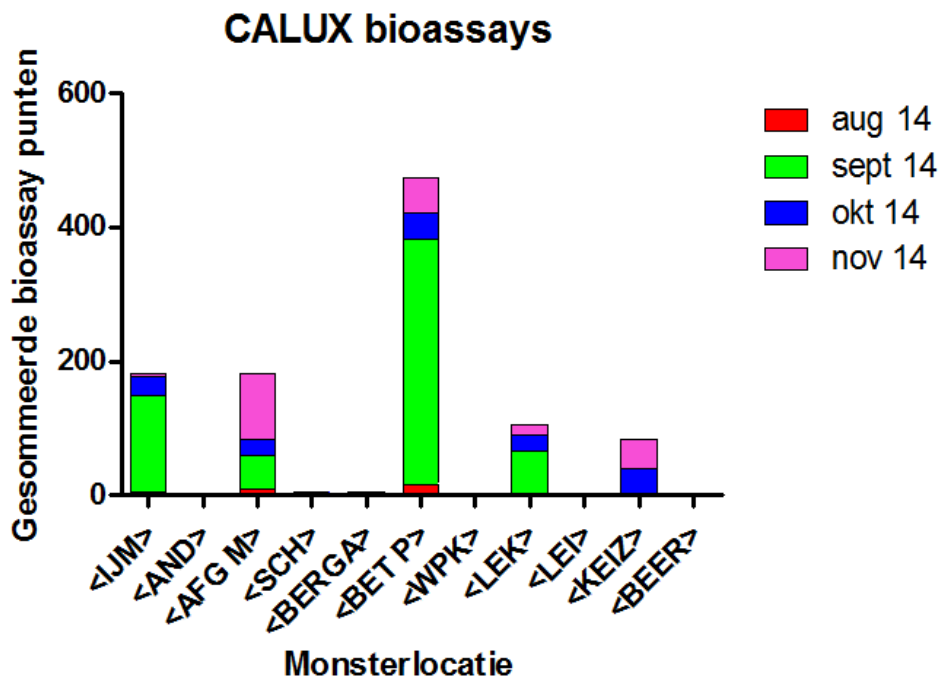
SEPT 2014													1	x LOD
HLB extractie	Bioassay	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BERGA>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>	1,1-3	x LOD
Endocrine interference	Era CALUX	1	1	1	1	1	3,7	1	40	1	NB	NB	3,1-10	x LOD
	GR CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NB	NB	10,1-30	x LOD
	anti-AR CALUX	3	1	8	1	1	6	1	13	1	NB	NB	30,1-100	x LOD
Metabolic interference	PPAR CALUX	5	1	12	1	1	4	1	7	1	NB	NB		
	PXR CALUX	129	1	30	3	1	49	1	3	1	NB	NB		
Oxidative stress respons	nrf2 CALUX	1,1	1	1,1	1,1	1	1,1	1	1,1	1	NB	NB		
Genotoxicity	p53 CALUX - S9	4	1	1	1	3	1	1	1	1	NB	NB		
	p53 CALUX + S9	1,1	1	1	1	1	301	1	1	1	NB	NB		

OKT 2014													1	x LOD
HLB extractie	Bioassay	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BERGA>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>	1,1-3	x LOD
Endocrine interference	Era CALUX	1	1	5	1	1	18,6	1	4,88	1	1	1	3,1-10	x LOD
	GR CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10,1-30	x LOD
	anti-AR CALUX	2	1	1,1	1	1	2	1,1	1,1	1,1	2	1	30,1-100	x LOD
Metabolic interference	PPAR CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	PXR CALUX	23	1	16	1	1	18	1	18	1	36	1		
Oxidative stress respons	nrf2 CALUX	1,1	1	1,1	1	1	1,1	1	1,1	1	1,1	1		
Genotoxicity	p53 CALUX + S9	1,1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	p53 CALUX - S9	1,1	1	1,1	1	1	1	1	1	1	1	1		

NOV 2014													1	x LOD
HLB extractie	Bioassay	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BERGA>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>	1,1-3	x LOD
Endocrine interference	Era CALUX	1	1	90	1	1	38,5	1	7	1	43	1	3,1-10	x LOD
	GR CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10,1-30	x LOD
	anti-AR CALUX	1	1	8,6	1	1	8,6	1	3,6	1	1	1	30,1-100	x LOD
Metabolic interference	PPAR CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	PXR CALUX	3	1	1	1	1	4,6	1	3,3	1	1,7	1		
Oxidative stress respons	nrf2 CALUX	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,1	1		
Genotoxicity	p53 CALUX - S9	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	p53 CALUX + S9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		

Figuur 6 presenteert een geïntegreerd overzicht van de resultaten van de CALUX bioassays over de verschillende maanden. Op de horizontale as staan de diverse monsterlocaties aangegeven. Op de verticale as staat de gesommeerde CALUX bioassay respons weergegeven uitgedrukt als totaal bioassay punten. Het totaal aantal punten is samengesteld uit de gesommeerde responsen van de verschillende CALUX bioassays uitgedrukt als verhoging ten opzichte van de LOD (Tabel 5). De figuur maakt inzichtelijk dat in de Bethunepolder de hoogste gesommeerde bioassay respons waargenomen wordt. Uit Tabel 5 blijkt dat deze

respons veroorzaakt wordt door een respons in de p53 CALUX na metabolisatie. In theorie kan deze respons verklaard worden door inactieve stoffen die geactiveerd worden na metabolisme in het lichaam. Dezelfde respons wordt ook wel voor pyreen-achtige stoffen geobserveerd. Het is niet duidelijk welke stoffen voor de geobserveerde respons verantwoordelijk zijn. Om de respons te bevestigen en de verantwoordelijke stoffen te identificeren zou aanvullend onderzoek noodzakelijk zijn. Er kan geen koppeling gemaakt worden met eventuele gezondheidskundige risico's. Uit figuur 6 volgt tevens dat de maand september 2014 de grootste bijdrage levert aan de gesommeerde bioassay responsen.

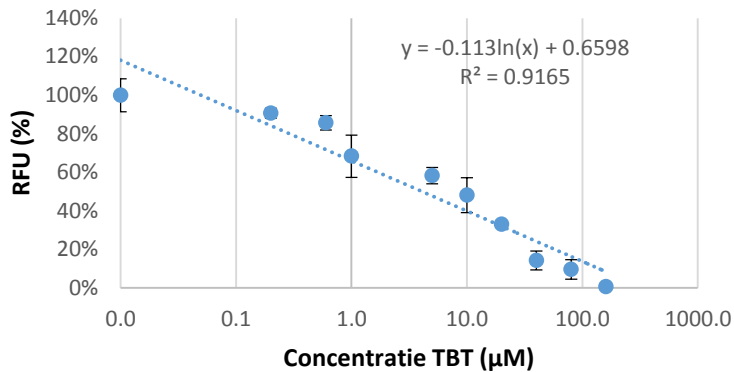


FIGUUR 6. GESOMMEERDE CALUX BIOASSAY RESPONS UITGEDRUKT ALS BIOASSAY PUNTEN. VOOR AFKORTINGEN ZIE TABEL 2.

3.2 Geavanceerde bioassays

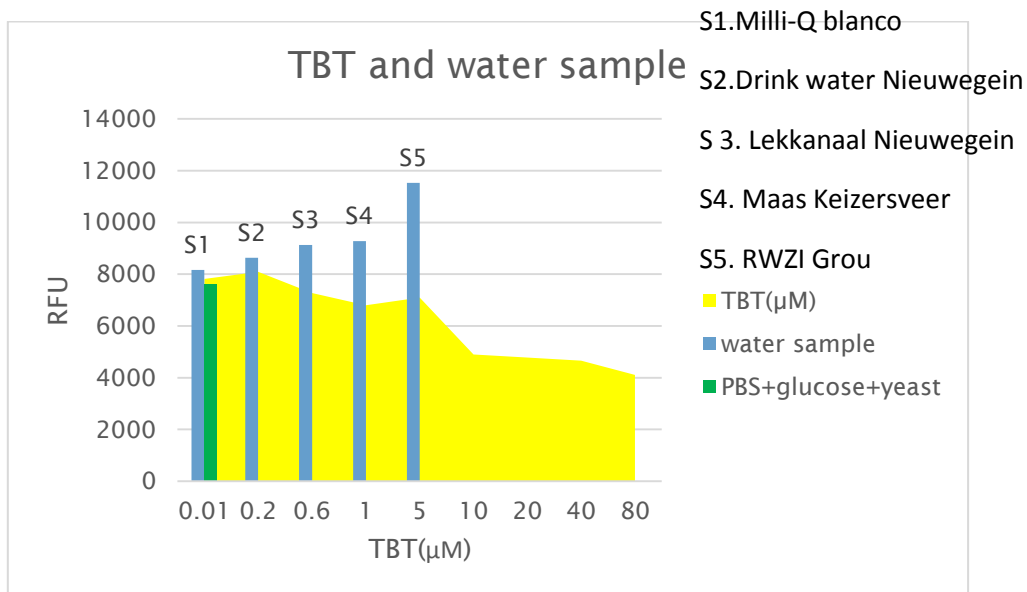
Yeast Toxicity Assay

Het achtergrondsignaal van de waterextracten ligt rond de emissiegolflengte van 400-450 nm. Er is geen storende piek op 590 nm, dat de emissiegolflengte is van de YTA. Daardoor kan geconcludeerd worden dat de waterextracten getest kunnen worden in de YTA. Figuur 7 presenteert de standaardcurve van tributyltin (TBT) in de YTA. Een PBS buffer met glucose wordt gebruikt als blanco. Het concentratiebereik is tot 160 μM . Bij een hogere concentratie TBT wordt de fluorescentie lager hetgeen aangeeft dat de metabole activiteit van de gisten gereduceerd wordt.



FIGUUR 7. DE STANDAARD CURVE VAN TBT IN DE YTA. DE LIJN IS UITGEDRUKT IN % VITALITEIT TOV DMSO (100%) EN ALLE GIST IS DOOD BIJ 100 µM (0 % VITALITEIT). (Y-AS RELATIEVE FLUORESCENTIE EENHEDEN).

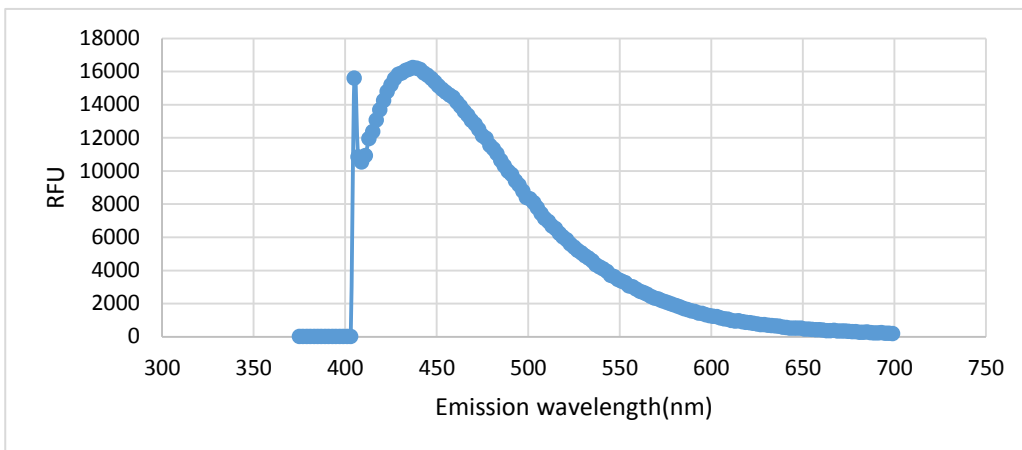
Een selectie van de waterextracten blijken een onverwacht effect te vertonen, namelijk dat ze een identieke of zelfs sterkere respons leveren dan de blanco en de TBT controles (figuur 8). Dit suggereert dat in de extracten chemische stoffen aanwezig zijn die de groei van gisten kunnen stimuleren. Hierbij kan gedacht worden aan bijvoorbeeld (vet)zuren. Om deze reden is de YTA niet verder uitgewerkt.



FIGUUR 8. RESPONS VAN WATEREXTRACTEN (HLB EXTRACTIE) IN DE YTA. TRIBUTYLTIN (TBT). (Y-AS RELATIEVE FLUORESCENTIE EENHEDEN).

ANSA assay

Figuur 9 illustreert dat de waterextracten (HLB extractie) een zeer groot achtergrondsignaal geven in het bereik tussen 400-550 nm. In een poging om dit op te lossen werden in plaats van fluorescentie de absorptie gemeten, maar dit bleek niet succesvol (data niet opgenomen). Vervolgens werd geprobeerd om de waterextracten verder te verdunnen, maar de ANSA TTR assay bleek te ongevoelig om daarna nog een kwantificeerbare respons te genereren.



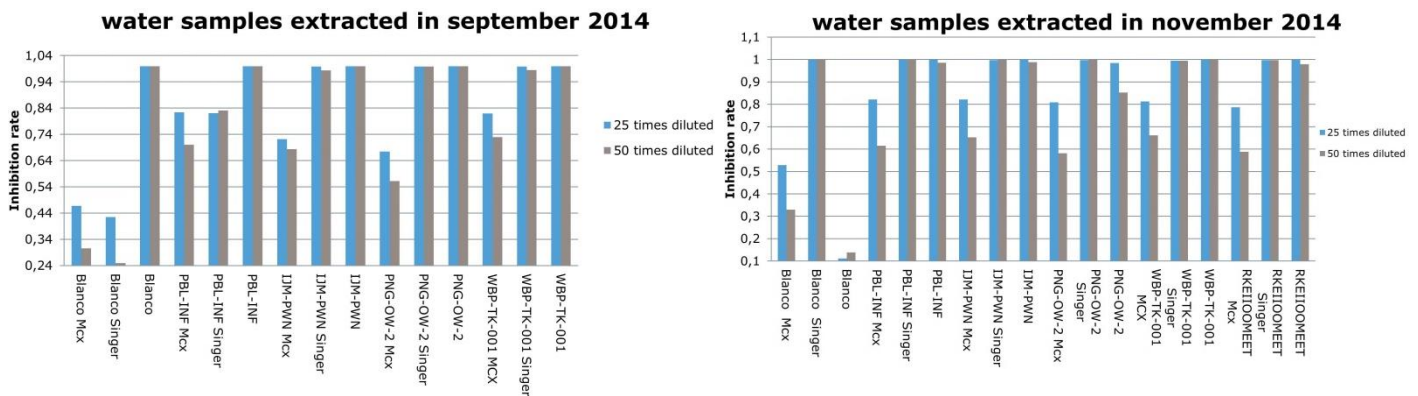
FIGUUR 9. EMISSIESPECTRUM VAN EEN WILLEKEURIG WATEREXTRACT (Y-AS RELatieve FLUORESCENTIE EENHEDEN).

AChE assay

Er zijn in het onderzoek twee verschillende AChE assays toegepast namelijk de Amplex red assay en de AChE assay die gebruik maken van bijenkoppen.

a) Amplex red AChE assay

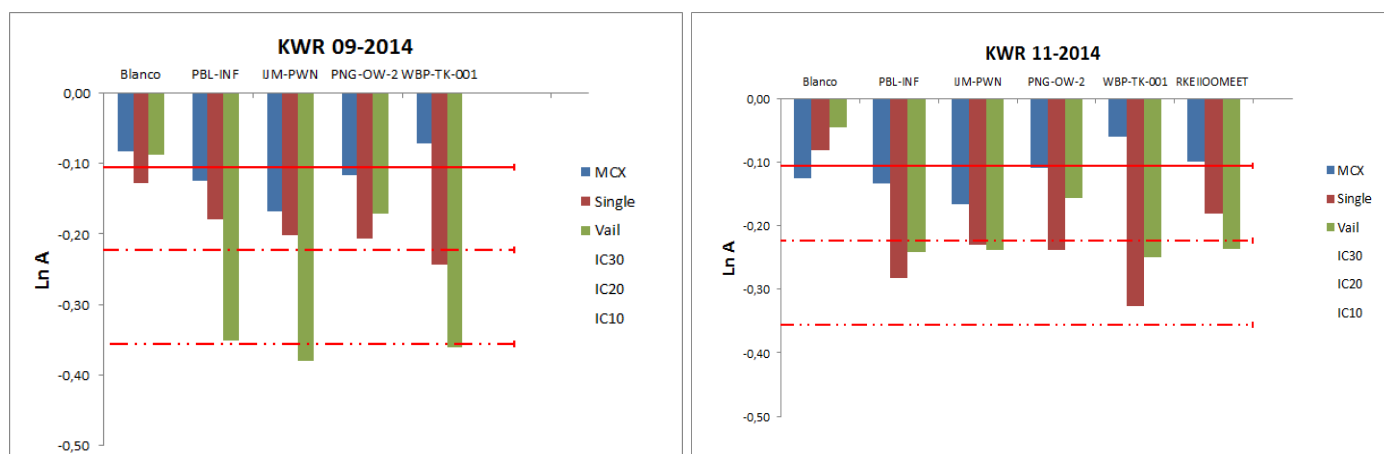
Figuur 10 illustreert de inhibitie van AChE activiteit door de waterextracten in twee verdunningen (25 en 50 maal). De gegeven potentie van de waterextracten zou om een verdere verdunning gevraagd hebben, maar dit was in het kader van het huidige onderzoek niet mogelijk. De extracten gemaakt met de MCX pakking vallen wel binnen het meetbare bereik, maar daaruit kan geconcludeerd worden dat deze pakking bioactieve stoffen onvoldoende bindt.



FIGUUR 10. INHIBITIE VAN DE AChE ASSAY (AMPLEX RED VARIANT) MET TWEE VERDUNNINGEN VAN DE WATEREXTRACTEN. EEN INHIBITIE VAN "1", BETEKENT MAXIMALE INHIBITIE.

b) AChE assay met bijenkoppen

Een honderdvoudige verdunning van elk van waterextracten werd getest in de AChE assay met bijenkoppen. In figuur 11 is te zien dat sommige monsters duidelijk een effect vertonen in de AChE inhibitie assay. Voor een kwantificering die goed genoeg is om met chemische analyse te vergelijken moet een dosis-respons lijn gemaakt worden zodat de kwantificering op het juiste deel van de ijklijn gebaseerd kan worden. Ook moet er dan genoeg extract zijn om via een TIE (Toxicity Identification and Evaluation) benadering de verantwoordelijke stoffen op te sporen.



FIGUUR 11. DE REMMING VAN DE AChE ACTIVITEIT (BIJENKOPPEN ASSAY) IN EXTRACTEN (VERKREGEN MET VERSCHILLENDE METHODEN) VERGELEKEN MET DE 10% (DOORGETROKKEN RODE LIJN), 20% (ENKEL GEPUNTE RODE LIJN) EN 30% REMMING (DUBBEL GEPUNTE RODE LIJN) VAN DE ACTIVITEIT DOOR DE POTENTE MODELSTOF DCV. MCX PAKKING, SINGLE (HLB PAKKING) EN VAIL (SINGER PAKKING).

Net zoals in regenwater (Hamers et al, 2000), zijn er in oppervlaktewater stoffen aanwezig die het enzym AChE remmen. Hierbij kan gedacht worden aan bijvoorbeeld pesticides. Beide methoden voor het meten van AChE blijken geschikt voor het meten van deze activiteit. Een meer uitgebreid onderzoek naar de relatie tussen AChE-remming en de aanwezigheid van specifieke stoffen is zinvol, gecombineerd met onderzoek naar de betekenis van een bepaalde activiteit (onder welke responswaarde is er geen reden tot zorg) en de verwijderingseffectiviteit van het drinkwaterzuiveringsproces.

3.3 Chemische analyses - Overzicht

Bijlage IV geeft het overzicht van alle chemische analyses (ruwe data), op het niveau van de detectiemethodes (van HWL) en de monsterlocaties. De witte of lege hokjes in de Tabellen geven aan dat er voor deze locatie geen gegevens zijn voor de stoffen in de methode. Blauw betekent dat er wel is gekeken of deze stoffen aanwezig zijn in de monsters, maar ze zijn niet gedetecteerd (boven de rapportagegrens). Groen geeft aan dat er stoffen zijn gedetecteerd, maar dat de gemiddelde somconcentratie boven de rapportagegrens is, maar onder de 0,1 µg/l. Geel is voor somconcentraties tussen de 0,1 en 1 µg/l, en oranje voor somconcentraties boven de 1 µg/l. Voor alle monsternamelocaties is de gemiddelde somconcentratie van de stoffen in de genoemde methode gegeven, hetzij in µg/l of ng/l (methode van HWL, somconcentratie kan ook zijn bepaald uit metingen van KWR of Aqualab Zuid, metingen van Augustus tot en met November – zie Bijlage I voor meetplan waarin staat beschreven op welke tijdstippen de monsternamen is gedaan).

Wat opvalt is dat er veel blauw en groen is, wat betekent dat er vaak niets of weinig wordt gedetecteerd. Tevens geldt dat het ruwe water (IJsselmeer bij Andijk, Afdamde Maas, Bethune polder, Lek, Keizersveer) hogere concentraties heeft dan het drinkwater (Andijk, Scheveningen, Weesperkarspel, Leiduin, Beerenplaat). Dit is geheel volgens verwachting, aangezien bij de drinkwaterbereiding veel stoffen worden verwijderd.

Een kanttekening die gemaakt moet worden bij het overzicht van de chemische analyses is dat niet in alle analysepakketten voor de verschillende locaties dezelfde stoffen zitten. Daarnaast kunnen een aantal stoffen in meerdere categorieën vallen: zo vallen guanylureum en metformin zowel in de groep emerging als metformine, en iopromide zowel in de groep

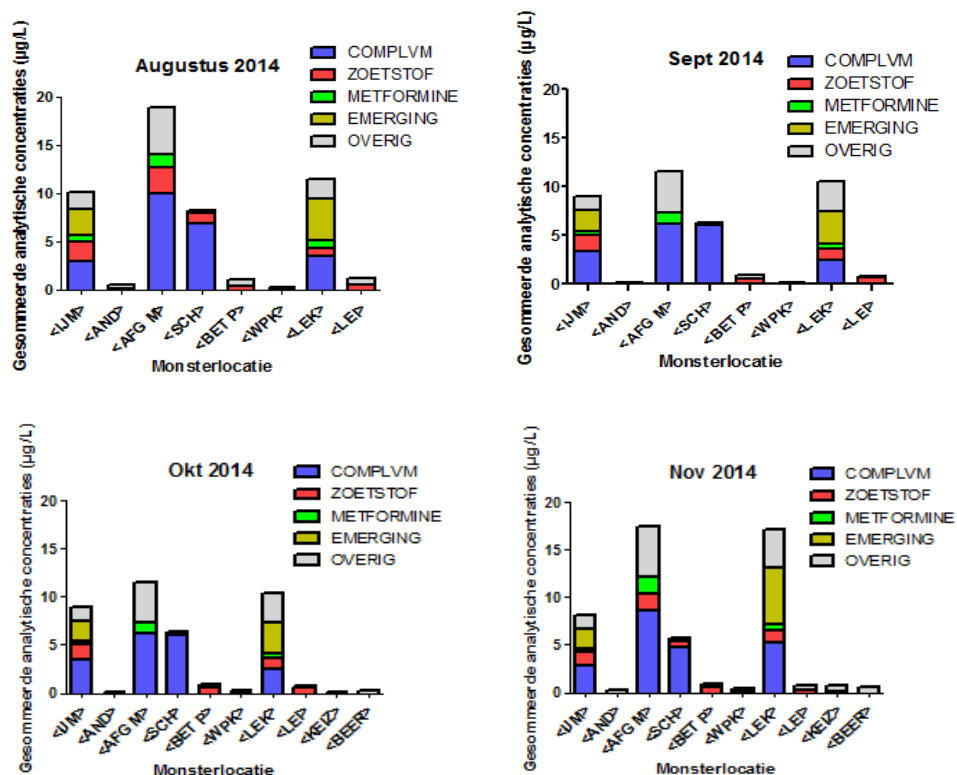
röntgencontrastmiddelen als pharma specifiek. Een overzicht met alle meetgegevens is daarom als supplementaire informatie toegevoegd (Excel-sheet).

Van de bronnen lijken de Bethunepolder en het Keizersveer het schoonst, maar dit is deels schijn. Voor Keizersveer is er geen data meegenomen over het voorkomen van complexvormers en röntgencontrastmiddelen, waarvan bekend is dat deze in hogere (>1 µg/l) concentraties kunnen voorkomen in de bronnen.

Van het drinkwater lijken Weesperkarspel en Andijk het schoonst, maar ook dit is mogelijk deels schijn. Hier zijn voor Andijk bijvoorbeeld de complexvormers niet gemeten, en deze zijn ook voor Beerenplaat niet in de dataset opgenomen. In het drinkwater van Scheveningen komt de complexvormer EDTA voor. Aangezien EDTA een twee ordes van grootte hogere indicatieve grenswaarde (600 µg/l) (Schriks et al., 2010) heeft dan waarbij deze wordt gevonden in het drinkwater lijkt dit echter niet problematisch. Voor de meeste detectiemethodes waar in de bronnen hogere concentraties stoffen (>0,1 µg/l) worden gevonden, is ook in het drinkwater deze methode toegepast. Een uitzondering hierop zijn de beide methodes EMERGING-1 (dit zijn verschillende methoden, één gegeven in µg/l en de ander in ng/l – de µg/l EMERGING-1 bevat o.a. methyl-benzotriazolonen en metazachloor-metaboliëten, de ng/l EMERGING-1 bevat o.a. guanylurea, metformine en gabapentine). Tevens is voor de combinatie bron IJsselmeer (bij Andijk) en drinkwater Andijk voor een relatief groot aantal methoden geen data voor het drinkwater.

3.4 Chemische analyses – per maand

Figuur 12 presenteert een gecategoriseerde samenvatting van een groot aantal chemische stoffen. In aanvulling is de ruwe chemische data uitgesplitst per maand in bijlage IV. Figuur 12 maakt duidelijk inzichtelijk dat complexvormers en zoetstoffen een belangrijk aandeel vormen van de totale hoeveelheid chemische stoffen die op een locatie worden aangetroffen. Met name in de Afdamde Maas is de concentratie complexvormers hoog en als gevolg



FIGUUR 12. RESULTAAT VAN DE CHEMISCHE ANALYSES UITGEVOERD OP DE VERSCHILLENDE MONSTERLOCATIES IN DE TIJD. COMPLEXVORMERS: DTPA, EDTA, NTA; ZOETSTOFFEN: ACESULFAAM, CYCLAMAAT, SACCHARINE, SUCRALOSE; EMERGING CONTAMINANTS: 4/5-METHYLBENZOTRIAZOLE, MELAMINE, METABOLIET(EN) VAN METOLACHLOOR EN CARBAMAZEPINE, ACETYSULFAMETHOXAZOOL, GABAPENTINE, GUANLYUREUM, HYDROCHLOROTHIAZIDE, LAMOTRIGINE, N-ACETYL/FORMYL-4-AMINOANTIPYRINE; OVERIG: ALLE ANDERE GEANALYSEERDE STOFFEN.

daarvan dringen deze stoffen ook door in het drinkwater te Scheveningen. Ook in het IJsselmeer en in de Lek zijn de concentraties relatief hoog. Uit de vergelijking van de verschillende maanden valt te zien dat het algemene patroon dat hierboven is beschreven hetzelfde blijft. Daarnaast is er duidelijk variatie te zien in de tijd, alhoewel daar geen duidelijk patroon in lijkt te zitten.

Link tussen chemie en bioassays

Met uitzondering van de ER CALUX en de GR CALUX is het op het moment van schrijven niet mogelijk om een duidelijk kwantitatief verband te leggen tussen de bioassays en de chemische analyses. Voor de GR CALUX en de ER CALUX kan deze vergelijking gedeeltelijk worden gemaakt, omdat (i) voor een aantal stoffen bekend is wat de relatieve potentie (relative potencies, REP) is in deze CALUX bioassays (Schriks et al., 2010) en (ii) relatief goed bekend is welke stoffen voor een respons zorgen. Gedurende het meetplan (aug-nov 2014) is op geen enkele locatie glucocorticogene activiteit gemeten met behulp van de GR CALUX. In totaal zijn er 8 glucocorticoiden gekwantificeerd namelijk amcinonide, cortisol, cortison, betamethason, dexamethason, prednison, prednisolon en triamcinolon hexacetonide. Uit de chemische analyse volgt dat cortison de meeste aangetroffen glucocorticogene stof is (Tabel 6). Omdat deze stof een zeer lage potentie heeft (<0.0008) is het niet verwonderlijk dat cortison op zichzelf geen respons geeft in de GR CALUX. In oktober 2014 worden relatief hoge concentraties gemeten in het Lekkanaal van amcinonide en triamcinolone hexacetonide. Samen zouden deze stoffen (theoretisch) een gecalculerde bioassay respons (CBR) van ~ 171 ng dex EQs/L moeten geven. Deze respons is in het huidige onderzoek echter niet waargenomen, maar parallel aan het huidige onderzoek door HWL wel (persoonlijke mededeling Petra Scholte, Waternet). Het is niet duidelijk waardoor dit veroorzaakt is, mogelijk door verschillen in de gehanteerde opwerkprotocollen tussen KWR en HWL. Aanvullend onderzoek zou moeten uitwijzen of het om een artefact (bv. een vals positieve respons) gaat.

Ook voor de ER Calux kan een vergelijking worden gemaakt. Gedurende het meetplan (aug-nov 2014) is meerdere keren een zeer lage oestrogene activiteit gemeten (<1 ng E2 EQs/L) met behulp van de ER-CALUX assay (Tabel 7). In totaal zijn er 4 oestrogene stoffen chemisch geanalyseerd namelijk $17\text{-}\alpha\text{-estradiol}$, $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$, $17\text{-}\alpha\text{-ethinylestradiol}$ en estrone. Uit de chemische analyseresultaten volgt dat alleen estrone gedetecteerd en gekwantificeerd is. Estrone heeft een relatief lage REP (0.02) en zal daardoor niet alle oestrogene activiteit in de ER CALUX kunnen verklaren. De belangrijkste observatie is echter dat -over het hele meetplan beschouwd- een lage respons in de ER CALUX (< 1 ng E2 EQs/L) ook correspondeert met lage concentraties van oestrogene stoffen (~ 30 ng/L) (Tabel 7).

TABEL 6. GEMETEN GR CALUX RESPONS EN ANALYTISCHE CONCENTRATIES GLUCOCORTICOIDEN IN DIVERSE BRONNEN. NA = NOT AVAILABE, LOD = 2.2 NG DEX EQS/L

Monsterlokatie	Glucocorticoiden	Aug 2014				Sept 2014				Okt 2014				Nov 2014			
		GR CALUX (ng dex Eqs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng dex EQs/L)	GR CALUX (ng dex Eqs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng dex EQs/L)	GR CALUX (ng dex Eqs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng dex EQs/L)	GR CALUX (ng dex Eqs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng dex EQs/L)
<IJM>		<LOD			0	<LOD			0	<LOD			0	<LOD			<0,0013
	Cortisone (KWR)	NA		<0,0008		<LOD		<0,0008		NA		<0,0008		1,71		<0,0008	
<AFG M>		<LOD			32,3	<LOD			0	<LOD			0	<LOD			0
	Cortisone (KWR)	NA		<0,0008		<LOD		<0,0008		NA		<0,0008		1,62		<0,0008	
	Amcinonide (HWL)	19,0		1,7		NA		1,7		NA		1,7		<LOD		1,7	
<BET P>		<LOD		<LOD	0	<LOD		NA		0		0		<LOD		<LOD	0
<LEK>		<LOD			0	<LOD			0	<LOD			171,4	<LOD			0
	Cortisone (KWR)	NA		<0,0008		<LOD		<0,0008		NA		<0,0008		3,17		<0,0008	
	Amcinonide (HWL)	<LOD		1,7		<LOD		1,7		32		1,7		<LOD		1,7	
	Triamcinolone hexacetonide (HWL)	<LOD		0,3		<LOD		0,3		390		0,3		<LOD		0,3	
<KEIZ>		NA			0	NA			0	<LOD			0	<LOD			<0,0016
	Cortisone (KWR)	NA		<0,0008		<LOD		<0,0008		NA		<0,0008		2,03		<0,0008	

Lokaties: zie Tabel 2; [C], analytische concentratie uitgedrukt in ng/L; REP, Relatieve Potentie uitgedrukt als de ratio tussen de EC₅₀ (referentiestof) en de EC₅₀ (doelstof); CBR, Calculated Bioassay Response uitgedrukt in ng/L.

TABEL 7. GEMETEN ER CALUX RESPONS EN ANALYTISCHE CONCENTRATIES OESTROGENEN IN DIVERSE BRONNEN. NA = NOT AVAILABE, LOD = 0.02 NG 17B ESTRADIOL EQS/L

Monsterlokatie	Oestrogenen	Aug 2014				Sept 2014				Okt 2014				Nov 2014			
		ER CALUX (ng E2 EQs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng E2 EQs/L)	ER CALUX (ng E2 EQs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng E2 EQs/L)	ER CALUX (ng E2 EQs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng E2 EQs/L)	ER CALUX (ng E2 EQs/L)	[C] ng/L	REP	CBR (ng E2 EQs/L)
<IJM>		<LOD			NA	<LOD			0,12	<LOD			NA	<LOD			NA
	Estrone (KWR)	NA		0,02		6		0,02		NA		0,20		<LOD		0,02	NA
<AFG M>		<LOD			NA	<LOD			0,19	0,1		0,02		1,8		0,02	0,16
	Estrone (KWR)	NA		0,02		9,65		0,02		NA		0,02		7,81		0,02	
<BET P>		0,15			NA	0,1			0,35	0,1			NA	0,77			0,61
	Estrone (KWR)	NA		0,02		17,6		0,02		NA		0,02		30,32		0,02	
<LEK>		<LOD			NA	0,8			NA	0,1			NA	0,14			NA
	Estrone (KWR)	NA		0,02		<LOD		0,02		NA		0,02		<LOD		0,02	NA
<KEIZ>		<LOD			NA	<LOD			NA	<LOD			NA	0,86			NA
	Estrone (KWR)	NA		0,02		NA		0,02		NA		0,02		<LOD		0,02	NA

Voor lokaties, zie Tabel 2; [C], analytische concentratie uitgedrukt in ng/L; REP, Relatieve Potentie uitgedrukt als de ratio tussen de EC₅₀ (referentiestof) en de EC₅₀ (doelstof); CBR, Calculated Bioassay Response uitgedrukt in ng/L.

4 Conclusies

In het huidige onderzoek is onder andere door middel van bioassays onderzoek verricht naar de waterkwaliteit van (een selectie van) bronnen van drinkwater en het drinkwater zelf. Voorts zijn analytisch chemische gegevens verzameld om een indruk te krijgen van de toegevoegde waarde van de toegepaste bioassays. Uit de resultaten blijkt dat er met het gekozen panel van bioassays geen effecten gemeten zijn in drinkwater. Dit illustreert (i) dat de concentraties bioactieve stoffen in drinkwater beneden de detectielimieten zijn van de toegepaste bioassays of (ii) dat de toegepaste bioassays niet specifiek zijn voor de aanwezige stoffen. Parallel hieraan is het belangrijk om het concentreren van watermonsters verder te optimaliseren. De toegevoegde waarde van verschillende extractiemethoden zoals toegepast in het huidige onderzoek zal in meer detail gepresenteerd worden door een publicatie van Victoria Torrens (in voorbereiding op het moment van schrijven). De analytisch chemische resultaten maken inzichtelijk dat er wel degelijk chemische stoffen in het drinkwater gevonden worden (met name zoetstoffen en complexvormers). Van deze categorieën aan stoffen is bekend dat ze niet relevant zijn voor humane gezondheid (slechts de perceptie van consumenten speelt hier een rol). De analytische chemische resultaten maken tevens inzichtelijk dat ook stoffen zoals perfluorverbindingen gemeten worden in drinkwater. Van deze stoffen is bekend dat ze wel gezondheidskundige relevantie hebben, maar ze zijn in het huidige onderzoek niet opgepikt met de bioassays. Het is niet bekend of dit te maken heeft met gevoeligheid van de toegepaste bioassays of het gebrek aan specificiteit. Omdat de huidige rapportage tot stand is gekomen in opdracht van eindgebruikers, presenteert tabel 8 een overzicht van het handelingsperspectief dat voorligt als bioassays ingezet worden in toegepast onderzoek naar (drink)waterkwaliteit.

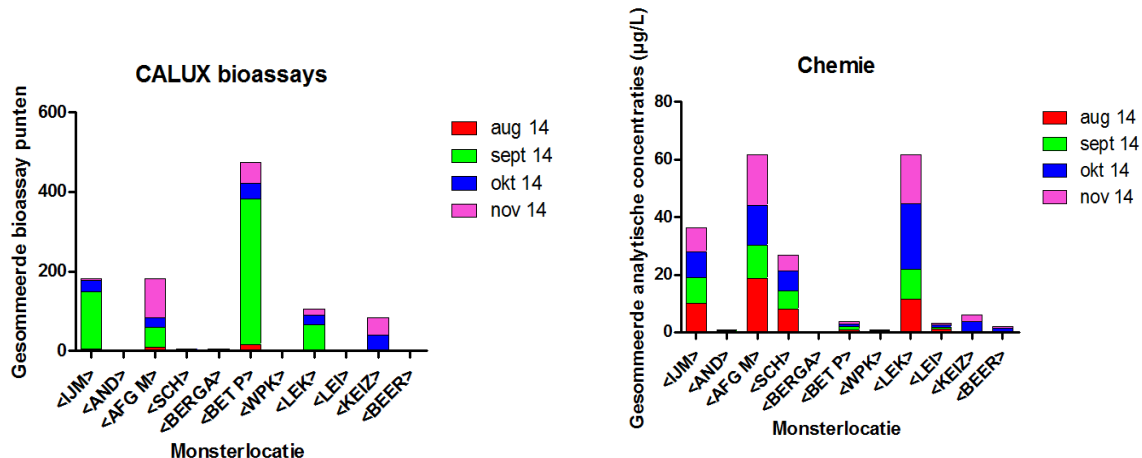
TABEL 8. TOEPASSING VAN BIOASSAYS (MET EN ZONDER DREMPELWAARDE) IN TOEGEPAST ONDERZOEK NAAR (DRINK)WATERKWALITEIT.

	Monitoring van oppervlaktwater en/of drinkwater	Handelingsperspectief eindgebruiker	Bepalen van de robuustheid van zuiveringsstappen^{***}	Handelingsperspectief eindgebruiker
Bioassays zonder gezondheidskundige drempelwaarde	+/-, geschikt om bijvoorbeeld trends in de tijd te volgen. Het is niet mogelijk om de mate van effect te interpreteren.	Heeft alleen toegevoegde waarde bij langdurige monitoringscampagnes. Bioassays die regelmatig een effect laten zien, geven aanleiding tot ontwikkeling van een drempelwaarde (de identiteit van verantwoordelijke stoffen moet daarvoor duidelijk zijn).	++, maken inzichtelijk of er bijproducten gevormd worden die toxicologisch relevant zijn.	Maakt inzichtelijk of er tijdens de zuivering ook nieuwe stoffen (afbraakproducten) gevormd worden, die op de klassieke manier (doelstof analyse) gemist zouden zijn. Bioassays die een effect laten zien, geven aanleiding tot ontwikkeling van een drempelwaarde (de identiteit van verantwoordelijke stoffen moet daarvoor bekend zijn).
Bioassays met gezondheidskundige drempelwaarde	++, geven een indicatie op toxicologische relevant effecten. Het is mogelijk om de mate van effect te interpreteren.	Als de drempelwaarde wordt overschreden is dit direct aanleiding tot vervolgonderzoek; vaststellen van de verantwoordelijke stoffen en een bijbehorende risicoanalyse.	+++, maken inzichtelijk of er bijproducten gevormd worden die toxicologisch relevant zijn. Het is mogelijk om de mate van effect te interpreteren (zie noot)	Als de drempelwaarde wordt overschreden is dit direct aanleiding tot vervolgonderzoek; vaststellen van de verantwoordelijke stoffen en een bijbehorende risicoanalyse.

""Noot: bij dit type onderzoek wordt gebruik gemaakt van artificiële spikes met een selectie van microverbindingen (bij relatief hoge concentraties) waardoor de samenstelling van het water niet meer representatief is voor het milieu. De toegevoegde waarde van een drempelwaarde is in deze context dus minder expliciet.

Het huidige onderzoek heeft tevens inzichtelijk gemaakt dat de toepassing van bioassays moet passen bij de onderzoeksopzet en onderzoeksvraag. Bioassays zonder drempelwaarde hebben bijvoorbeeld een beperkte toegevoegde waarde als ze maar een enkele keer (of kortlopend) toegepast worden. Meerjarige toepassing (bijvoorbeeld in RIWA verband) zou hier de gewenste opzet moeten zijn. Bioassays met drempelwaarde zijn ook geschikt voor enkelvoudige toepassing om de waterkwaliteit te evalueren. Als de respons onder de drempelwaarde blijft is er geen aanleiding tot verder verdiepend onderzoek en een risicoanalyse. Binnen gericht toegepast onderzoek om de efficiëntie van zuiveringsstappen te bepalen is dit anders: immers het feit dat het toepassen van een zuiveringstechniek aanleiding geeft tot nieuwe bioactieve stoffen, heeft meerwaarde op zichzelf hetgeen weer aanleiding kan zijn tot verder onderzoek. Een drempelwaarde kan meerwaarde bieden omdat hiermee een inschatting gemaakt kan worden van humane relevantie. De toegevoegde waarde van de drempelwaarde is echter minder expliciet in vergelijking met de onderzoeksopzet gericht op monitoren. De belangrijkste reden hiervoor is dat bij onderzoek gericht op de efficiëntie van zuiveringsstappen vaak gebruik gemaakt wordt van artificiële spikes bij veelal onrealistische milieuconcentraties (>1 µg/L). Het is dus haast voor de hand liggend dat (gezondheidskundige) drempelwaarden overschreden worden (zie bijvoorbeeld Brand et al., (2013) voor hormonen, ook is de Threshold of Toxicological Concern (TTC) voor biologisch reactieve stoffen (genotoxische stoffen en hormoon actieve stoffen) gesteld op 0.01 µg/L. Dit zijn weliswaar geen bioassay drempelwaarden, maar dit illustreert wel dat boven de 0.01 µg/L een drempelwaarde overschreden wordt voor biologisch reactieve stoffen). De grootste kracht van de onderzoeksopzet zit in de relatieve afname of toename voor- en na de zuiveringsstap.

Tenslotte, maakt figuur 13 inzichtelijk dat er verschillen zijn tussen de geïntegreerde respons van de toegepaste CALUX bioassays (weergegeven door gesommeerde bioassay punten) en de gesommeerde analytische concentraties over de maanden heen. Dit is verklaarbaar doordat zoetstoffen, complexvormers en metformine (grote vertegenwoordigers in het analytische pakket) niet actief zijn in de toegepaste bioassays. Dit illustreert de toegevoegde waarde van de bioassays. Chemische stoffen die biologisch niet relevant zijn, worden ook niet opikt.



FIGUUR 13. VERGELIJK TUSSEN DE GEÏNTEGREERDE CALUX BIOASSAY RESPONS EN DE GESOMMEERDE ANALYTISCHE CONCENTRATIES.

Uit het exploratieve onderzoek uitgevoerd in samenwerking met de WUR volgt dat slechts de acetylcholine esterase assay geschikt is voor onderzoek van oppervlaktewater. Dit heeft er mee te maken dat er stoffen (zoals humuszuren) aanwezig zijn in oppervlaktewater, die interfereren met de bioassays. Verdere optimalisatie is hier noodzakelijk

5 Literatuur

Brand, W. et al., 2013. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environ International* 55, 109-118.

Escher, B. et al., 2014. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environ Sci Technol* 48 (3), 1940-1956.

Hamers, T. et al., 2000. A small-volume bioassay for quantification of the esterase inhibiting potency of mixtures of organophosphate and carbamate insecticides in rainwater: Development and optimization. *Toxicol Sci* 58 (1), 60-67.

Huntscha, S. et al., 2012. Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromato A* 1268, 74-83.

Kolkman, A., et al., 2014. Sample preparation for combined chemical analysis and in vitro bioassay application in water quality assessment. *Environ Toxicol pharmacol* 36 (3), 1291-1303.

Montano, M. et al., 2012. New approaches to assess the transthyretin binding capacity of bioactivated thyroid hormone receptors. *Toxicol Sci* 130, 94-105.

Schriks, M. et al., 2010. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Res* 44(2) 461-176.

Schriks, M. et al., 2013. Occurrence of glucocorticogenic activity in various surface waters in The Netherlands. *Chemosphere* 93 (2), 450-454.

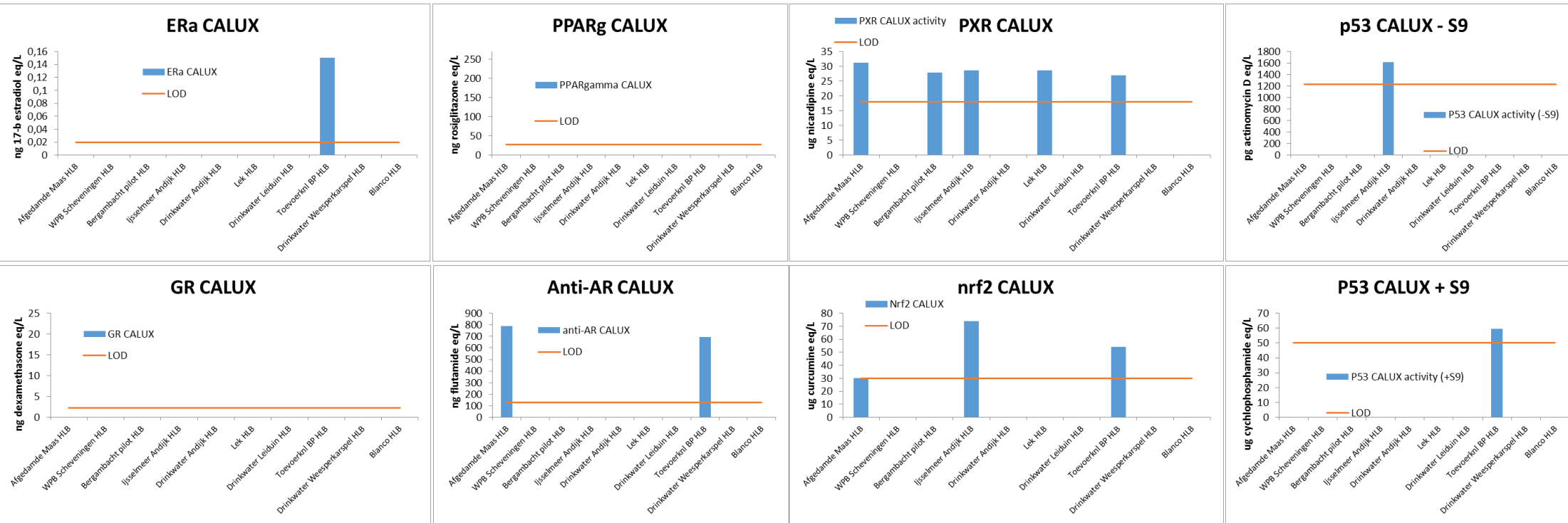
Schriks, M., Baken, K., 2015. Selection criteria to select in vitro bioassays for implementation and use. BTO/DEMEAU publication. Available on the DEMEAU website.

Van der Linden, S. et al., 2014. Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress. *Mut Res* 760, 23-32.

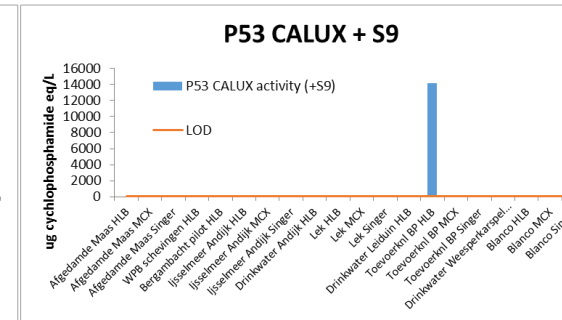
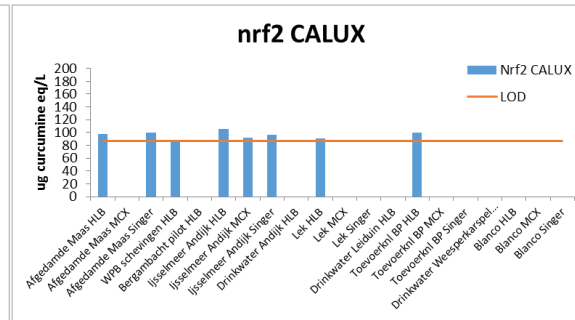
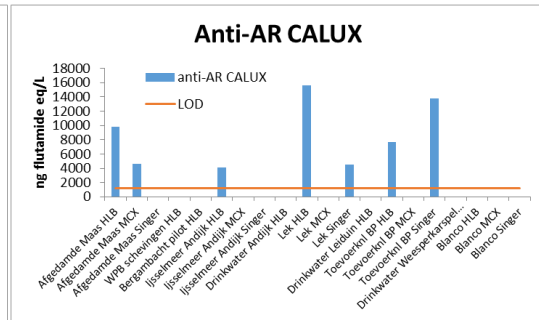
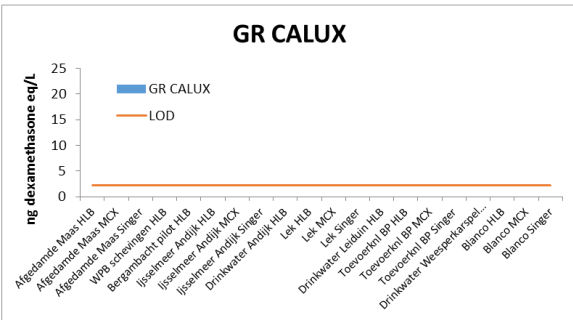
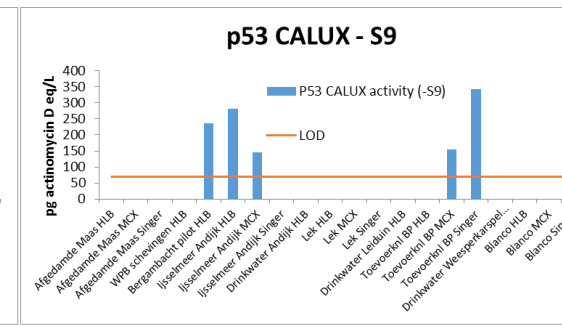
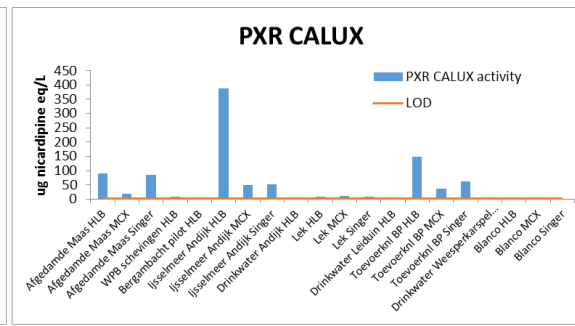
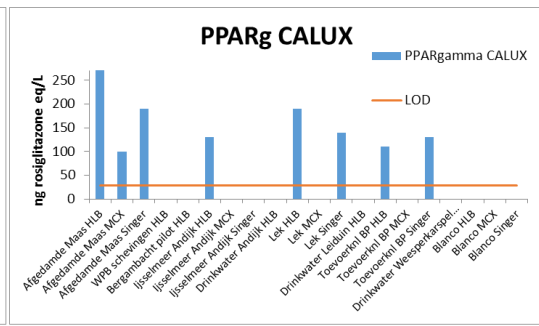
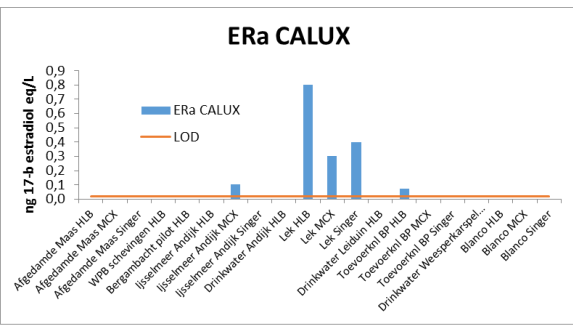
Van Wezel, A., Mons, M., van Delft, W. (2010). New methods to monitor emerging chemicals in the drinking water production chain. *Journal of environmental monitoring* 12, 80-89.

Weiss, J.M. et al., 2009. Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis. *Anal Bioanal Chem* 394, 1385-1397.

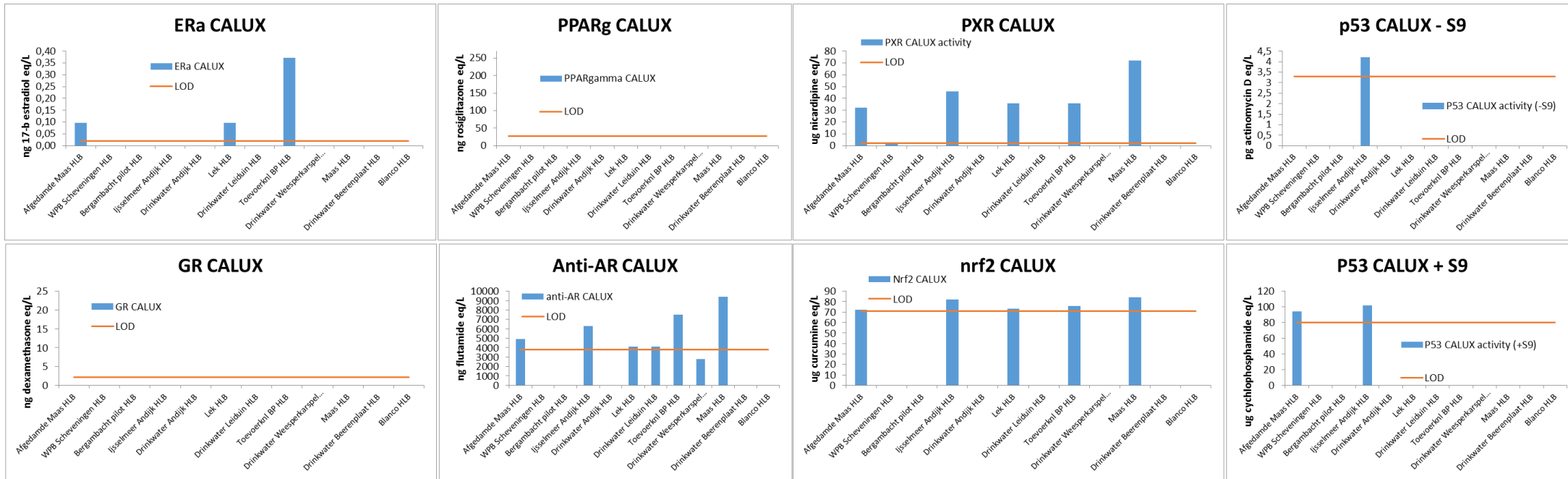
Bijlage II Aanvullende data bioassays



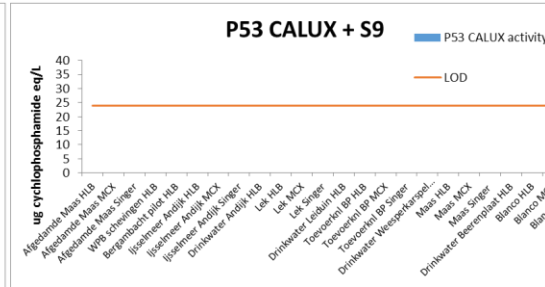
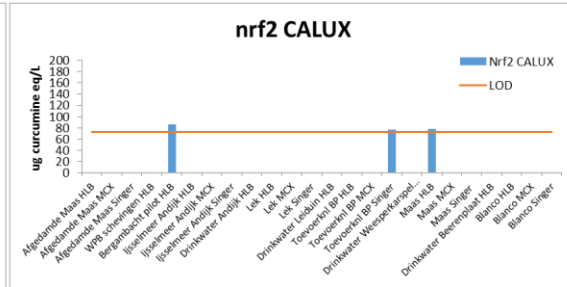
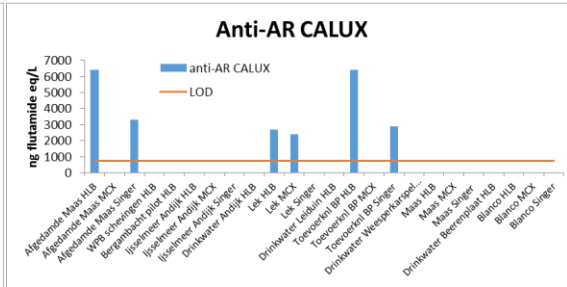
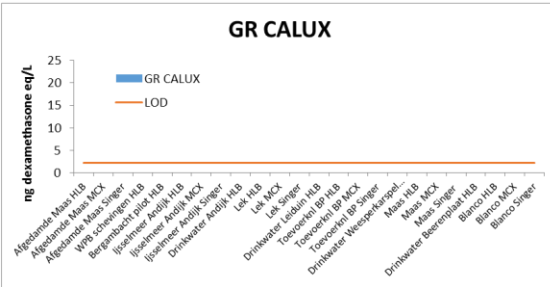
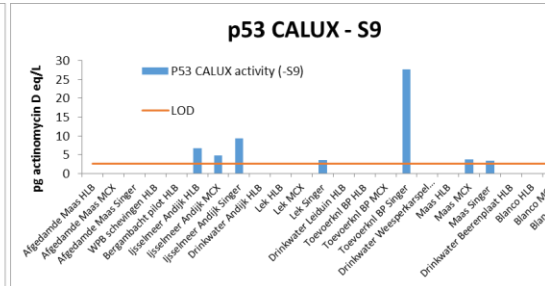
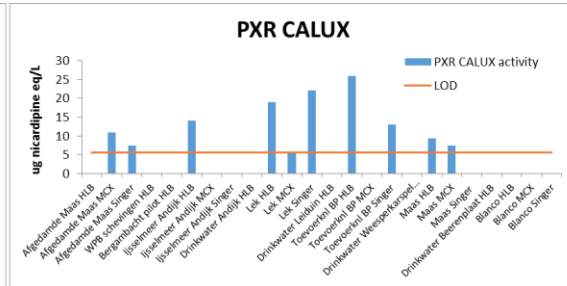
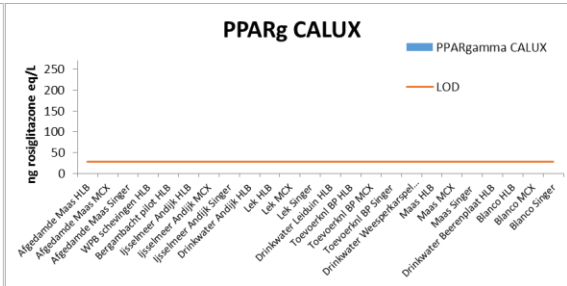
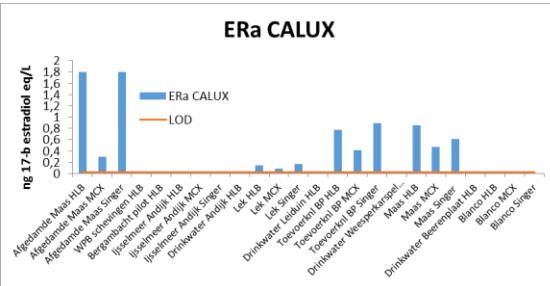
CALUX gegevens van augustus 2014



CALUX gegevens van september 2014



CALUX gegevens van oktober 2014



CALUX gegevens van november 2014

Bijlage III Totaaloverzicht van de chemische meetresultaten (gemiddelde somconcentraties van stoffen in een detectiemethode) per monsterlocatie.

Overzicht van de chemie (somconcentraties van stoffen in een detectiemethode) versus de monsterlocaties gemiddeld over **Augustus-November 2014**

	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>
µg/l										
CHLFENC-ZG			0.060						0.031	
COMPLVM	3.300		8.375	6.000			3.925			
DFC			0.183	0.015						
DIGLYBAM	0.158		0.129	0.015	0.088		0.218	0.020	0.048	
DIOXAAN-U						0.030	0.758	0.200		
DMS			0.070		0.075		0.043			
EMERGING-1	1.410						2.055		0.380	
GCMS-W-B	0.015		0.070		0.003		0.015		0.003	
GLYF			1.128				0.370			
LCMS	0.023		0.193		0.003		0.023	0.013	0.080	0.060
MULTI-1	0.022		0.096				0.042		0.039	
MULTI-2			0.000		0.010					

MULTI-3	0.073	0.028	0.103				0.068		0.198	
UROTROPINE			0.835	0.178						
VOV	0.090	0.085	0.200		0.190	0.095	2.083			0.240
XENO-OES			0.078		0.030		0.035			
ZOETSTOF	1.648	0.015	2.235	0.850	0.495	0.123	1.188	0.515	0.131	
ng/l										
BARB			9.500							
EMERGING-1	1241.750						2774.000			
HORMONEN	30.000	85.000	9.500				105.500			
METFORMINE			1430.000	2.750					15.410	
NDMA							0.500			
PERFLUOR	27.750		37.800	35.875	17.300	7.400	19.525	13.850		
PHARMACSPE	400.275	135.350	690.500	9.150	38.875		722.600	5.000	236.929	0.330
RONTGENCM	631.500		643.750	53.750			1028.000	52.250		
SOM ug/l stoffen	6.72	0.12	12.60	6.63	0.89	0.25	6.98	0.74		
SOM ng/l stoffen	2331.28	110.18	2811.55	101.53	47.53	0.00	3481.10	64.18		
totaalsom ug/l	9.05	0.23	15.41	6.73	0.94	0.25	10.46	0.80	3.01	1.06
	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>

Legenda

<Rapportagegrens of niet gemeten

Rapportagegrens <x<0.1 ug/l

0.1 <x<1 ug/l

>1 ug/l

Monsterpunten: zie Tabel 2

Overzicht van de chemie (somconcentraties van stoffen in een detectiemethode) versus de monsterlocaties voor **Augustus 2014**

	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>
µg/l										
CHLFENC-ZG	0.000	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
COMPLVM	2.900	0.000	10.000	6.800	0.000	0.000	3.400	0.000		
DFC	0.000	0.000	0.170	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000		
DIGLYBAM	0.165	0.000	0.132	0.000	0.071	0.000	0.214	0.021		
DIOXAAN-U	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030	0.630	0.490		
DMS	0.000	0.000	0.080	0.000	0.070	0.000	0.000	0.000		
EMERGING-1	1.540	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.300	0.000		
GCMS-W-B	0.020	0.000	0.150	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000		
GLYF	0.000	0.000	0.840	0.000	0.000	0.000	0.300	0.000		
LCMS	0.030	0.000	0.170	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000		
MULTI-1	0.020	0.000	0.149	0.000	0.000	0.000	0.046	0.000		
MULTI-2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
MULTI-3	0.140	0.110	0.170	0.000	0.000	0.000	0.110	0.000		
UROTROPINE	0.000	0.000	0.930	0.170	0.000	0.000	0.000	0.000		
VOV	0.100	0.130	0.230	0.000	0.380	0.095	0.000	0.000		
XENO-OES	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
ZOETSTOF	2.070	0.030	2.650	1.070	0.410	0.123	0.900	0.540		
ng/l										
BARB	0.000	0.000	12.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
EMERGING-1	1839.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3041.000	0.000		

HORMONEN	0.000	0.000	19.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
METFORMINE	0.000	0.000	1420.000	11.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
NDMA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
PERFLUOR	24.800	0.000	46.500	47.300	22.000	3.700	17.700	17.200		
PHARMACSPE	521.700	170.300	887.600	15.900	63.600	0.000	663.200	0.000		
RONTGENCM	689.000	0.000	658.000	64.000	0.000	0.000	786.000	58.000		
SOM ug/l stoffen	6.99	0.27	15.83	8.07	0.93	0.25	6.940	1.05		
SOM ng/l stoffen	3074.5	170.3	3043.1	138.2	85.6	3.70	4507.9	75.20		
totaalsom ug/l	10.06	0.44	18.87	8.21	1.02	0.25	11.448	1.13		
	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>

Legenda

<Rapportagegrens of niet gemeten

Rapportagegrens <x<0.1 ug/l

0.1 <x<1 ug/l

>1 ug/l

Monsterpunten: zie Tabel 2

Overzicht van de chemie (somconcentraties van stoffen in een detectiemethode) versus de monsterlocaties voor **September 2014**

	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>
µg/l										
CHLFENC-ZG	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
COMPLVM	3.400	0.000	6.200	6.000	0.000	0.000	2.500	0.000		

DFC	0.000	0.000	0.180	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
DIGLYBAM	0.149	0.000	0.133	0.023	0.106	0.000	0.163	0.000		
DIOXAAN-U	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.890	0.000		
DMS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.070	0.000	0.060	0.000		
EMERGING-1	1.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.630	0.000		
GCMS-W-B	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
GLYF	0.000	0.000	0.910	0.000	0.000	0.000	0.370	0.000		
LCMS	0.030	0.000	0.440	0.000	0.010	0.000	0.010	0.050		
MULTI-1	0.023	0.000	0.066	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000		
MULTI-2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000		
MULTI-3	0.000	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
UROTOPINE	0.000	0.000	0.860	0.180	0.000	0.000	0.000	0.000		
VOV	0.120	0.110	0.340	0.000	0.200	0.080	0.190	0.000		
XENO-OES	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
ZOETSTOF	1.630	0.000	0.000	0.000	0.550	0.120	1.140	0.630		
ng/l	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
BARB	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
EMERGING-1	1179.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2121.000	0.000		
HORMONEN	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
METFORMINE	0.000	0.000	1090.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
NDMA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
PERFLUOR	47.000	0.000	43.500	47.000	0.000	0.000	23.100	0.000		
PHARMACSPE	348.700	0.000	557.800	4.500	10.100	0.000	398.000	7.000		
RONTGENCM	667.000	0.000	616.000	55.000	0.000	0.000	939.000	58.000		

SOM ug/l stoffen	6.682	0.110	9.239	6.203	0.956	0.200	6.98	0.680		
SOM ng/l stoffen	2241.700	0.000	2307.300	106.500	10.100	0.000	3481.10	65.000		
totaalsom ug/l	8.924	0.110	11.546	6.310	0.966	0.200	10.46	0.745		
	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>

Legenda

<Rapportagegrens of niet gemeten

Rapportagegrens <x<0.1 ug/l

0.1 <x<1 ug/l

>1 ug/l

Monsterpunten: zie Tabel 2

Overzicht van de chemie (somconcentraties van stoffen in een detectiemethode) versus de monsterlocaties voor **Oktober 2014**

Row Labels	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>
µg/l										
CHLFENC-ZG	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
COMPLVM	4.100	0.000	8.700	6.400	0.000	0.000	4.500	0.000		
DFC	0.000	0.000	0.190	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
DIGLYBAM	0.149	0.000	0.109	0.000	0.083	0.000	0.282	0.000		
DIOXAAN-U	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.820	0.000		
DMS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.090	0.000	0.050	0.000		
EMERGING-1	1.460	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.400	0.000		
GCMS-W-B	0.010	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.040	0.000		

GLYF	0.000	0.000	0.780	0.000	0.000	0.000	0.440	0.000		
LCMS	0.000	0.000	0.070	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000	0.080	0.060
MULTI-1	0.000	0.000	0.086	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000		
MULTI-2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
MULTI-3	0.070	0.000	0.120	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000		
UROTROPINE	0.000	0.000	0.780	0.220	0.000	0.000	0.000	0.000		
VOV	0.060	0.040	0.080	0.000	0.000	0.100	8.140	0.000	0.000	0.160
XENO-OES	0.000	0.000	0.210	0.000	0.120	0.000	0.000	0.000		
ZOETSTOF	1.480	0.000	0.000	0.000	0.520	0.130	1.500	0.560		
ng/l	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
BARB	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
EMERGING-1	866.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2255.000	0.000		
HORMONEN	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	422.000	0.000		
METFORMINE	0.000	0.000	1460.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
NDMA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
PERFLUOR	19.300	0.000	31.800	25.100	0.000	0.000	17.500	0.000		
PHARMACSPE	323.400	0.000	561.600	4.300	39.400	0.000	775.100	0.000	0.280	33.000
RONTGENCM	591.000	0.000	623.000	41.000	0.000	0.000	1032.000	51.000		
SOM ug/l stoffen	7.329	0.040	11.145	6.620	0.823	0.230	18.327	0.560		
SOM ng/l stoffen	1799.700	0.000	2676.400	70.400	39.400	0.000	4501.600	51.000		
totaalsom ug/l	9.129	0.040	13.821	6.690	0.862	0.230	22.829	0.611	3.80	1.46
	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>

Legenda

<Rapportagegrens of niet gemeten

Rapportagegrens <math>x < 0.1 \text{ ug/l}</math>

 $0.1 < x < 1 \text{ ug/l}$ $> 1 \text{ ug/l}$

Monsterpunten: zie Tabel 2

Overzicht van de chemie (somconcentraties van stoffen in een detectiemethode) versus de monsterlocaties voor **November 2014**

Row Labels	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>
$\mu\text{g/l}$										
CHLFENC-ZG	0.000	0.000	0.110	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000
COMPLVM	2.800	0.000	8.600	4.800	0.000	0.000	5.300	0.000		
DFC	0.000	0.000	0.190	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000		
DIGLYBAM	0.170	0.000	0.141	0.036	0.092	0.000	0.211	0.019	0.048	0.000
DIOXAAN-U	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.120	0.690	0.310		0.000
DMS	0.000	0.000	0.060	0.000	0.070	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000
EMERGING-1	1.330	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.890	0.000	0.380	
GCMS-W-B	0.010	0.000	0.130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
GLYF	0.000	0.000	1.980	0.000	0.000	0.000	0.370	0.000	0.000	0.000
LCMS	0.010	0.000	0.090	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000	0.080	0.000
MULTI-1	0.000	0.000	0.082	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.039	0.000
MULTI-2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MULTI-3	0.080	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000	0.060	0.000	0.198	
UROTROPINE	0.000	0.000	0.770	0.140	0.000	0.000	0.000	0.000		

VOV	0.080	0.060	0.150	0.000	0.180	0.120	0.000	0.000	0.000	0.240
XENO-OES	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.140	0.000	0.000	0.000
ZOETSTOF	1.410	0.000	1.820	0.630	0.500	0.110	1.210	0.330	0.131	
ng/l	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
BARB	0.000	0.000	7.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
EMERGING-1	1083.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3679.000	0.000	0.000	0.000
HORMONEN	120.000	170.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
METFORMINE	0.000	0.000	1750.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	15.410	
NDMA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.000	0.000		
PERFLUOR	19.900	0.000	29.400	24.100	12.600	7.900	19.800	10.500		
PHARMAC SPE	407.300	100.400	755.000	11.900	42.400	0.000	1054.100	13.000	236.929	
RONTGENCM	579.000	0.000	678.000	55.000	0.000	0.000	1355.000	42.000		
SOM ug/l stoffen	5.890	0.060	14.183	5.636	0.862	0.350	10.821	0.659		
SOM ng/l stoffen	2209.200	270.400	3219.400	91.000	55.000	7.900	6109.900	65.500		
totaalsom ug/l	8.099	0.330	17.402	5.727	0.917	0.358	16.931	0.725	2.21	0.65
	<IJM>	<AND>	<AFG M>	<SCH>	<BET P>	<WPK>	<LEK>	<LEI>	<KEIZ>	<BEER>

Legenda

<Rapportagegrens of niet gemeten

Rapportagegrens <x<0.1 ug/l

0.1 <x<1 ug/l

>1 ug/l

Monsterpunten: zie Tabel 2