

Genotoxische activiteit in bronnen en zuivering van drinkwater meten met bioassays

Astrid Reus (KWR), Yvonne van Oorschot, Eric Penders (Het Waterlaboratorium), Jochen Kuckelkorn (Umweltbundesamt), Corine Houtman (Het Waterlaboratorium, Vrije Universiteit Amsterdam)

Verslechterende oppervlaktewaterkwaliteit stelt de watersector voor grote uitdagingen. De drinkwaterbedrijven die oppervlaktewater als bron gebruiken werken daarom doorlopend aan het verbeteren van zuivering. Bioassays zijn een effectief instrument voor het beoordelen van de chemische kwaliteit van waterbronnen en de effectiviteit van waterzuiveringsprocessen. De combinatie van de Ames-fluctuatietest en de p53-CALUX (en eventueel aanvullend de micronucleustest) lijkt volgens dit onderzoek een goede basisset om genotoxische activiteit aan te tonen door de aanwezigheid van vervuilende stoffen die schade aan het DNA kunnen veroorzaken.

Oppervlaktewater is de bron van 40 procent van het drinkwater in Nederland. Het water kan vervuild zijn met allerlei verschillende stoffen, zoals geneesmiddelen en industriële stoffen, die negatieve effecten kunnen hebben op de menselijke gezondheid en het milieu. Drinkwaterbedrijven combineren verschillende zuiveringsprocessen om zulke stoffen te verwijderen, bijvoorbeeld door het te behandelen met actieve kool, oeverfiltratie, membraanfiltratie en oxidatie. Zo verlagen de drinkwaterbedrijven de concentraties van deze stoffen tot veilige niveaus. In afbraakprocessen, zoals geavanceerde oxidatie, kunnen stoffen worden omgezet tot afbraak- of transformatieproducten. De identiteit en gezondheidskundige relevantie van dergelijke afbraak- of transformatieproducten is vaak onbekend, maar uit eerdere studies is bekend dat deze toxische effecten kunnen hebben [1]. Dan is een volgende zuiveringsstap noodzakelijk.

De drinkwaterbedrijven werken doorlopend aan het verbeteren van zuiveringsstappen die een barrière voor verontreinigingen vormen. Om de vijf jaar wordt de robuustheid van vier drinkwaterzuiveringsprocessen getest voor nieuwe, opkomende vervuilende stoffen (organische microverontreinigingen). Momenteel loopt de vierde vijfjarencyclus. Vanuit het voorzorgsprincipe willen de drinkwaterbedrijven graag weten hoe goed organische microverontreinigingen worden verwijderd. De geselecteerde microverontreinigingen worden getest in proefopstellingen bij de drinkwaterbedrijven, om te zien hoe robuust de bestaande zuivering hiertegen werkt en of er eventueel aanpassingen nodig zijn.

Bioassays voor genotoxische activiteit

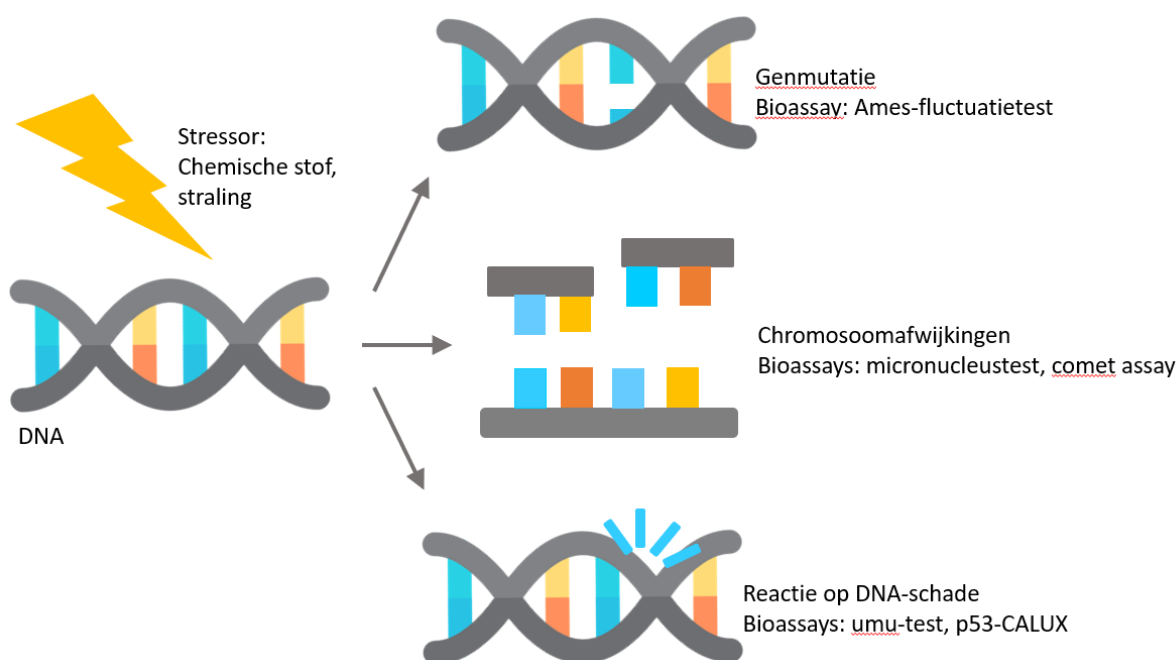
Effectgericht testen met bioassays geeft inzicht in de aanwezigheid van biologisch actieve stoffen in de bronnen en in de effectiviteit van waterzuiveringsprocessen. Om de verschillende effecten van (redelijkerwijs te verwachten) aanwezige stoffen zo goed mogelijk te ondervangen, zet een aantal drinkwaterbedrijven daarbij in hun monitoringsprogramma's bioassays in voor het meten van voor menselijke gezondheid relevante effecten.

Inzicht in de mogelijkheid dat een stof DNA-schade veroorzaakt (genotoxiciteit), is van belang voor de bescherming van de gezondheid, aangezien DNA-schade een van de triggers voor tumorvorming is. Het ontstaan van tumoren kan leiden tot kanker. Overheidsbeleid is erop gericht dat het totale

maximaal toelaatbare risiconiveau van (genotoxische) stoffen niet wordt overschreden [2]. In dit kader stelt het Drinkwaterbesluit een norm voor genotoxische stoffen als dimethylnitrosamine (NDMA) en benz(a)pyreen. Het is voor de drinkwaterbedrijven van belang om de aanwezigheid van genotoxische stoffen in hun bronnen en het gedrag van deze stoffen in hun zuiveringen goed te kunnen volgen. Hiervoor worden doelstofanalyses ingezet voor bekende genotoxische stoffen, aangevuld met bioassays die genotoxische activiteit in water kunnen aantonen.

In de huidige monitoringsprogramma's van de drinkwaterbedrijven wordt genotoxiciteit alleen gevolgd met de bioassay p53-CALUX en in het Robuustheidsonderzoek dat in DPWE (gezamenlijk onderzoeksprogramma van de drinkwaterbedrijven Dunea, PWN, Waternet en Evides) wordt uitgevoerd [3] met de Ames-fluctuatietest. In een eerder artikel is beschreven hoe een selectie van bioassays voor het meten van genotoxische activiteit in alternatieve bronnen kan worden ingezet [4]. In het hier gepresenteerde onderzoek wordt een basisset samengesteld van verschillende bioassays om genotoxische activiteit te meten in oppervlaktewaterbronnen en drinkwaterzuivering.

Er zijn tientallen verschillende bioassays om DNA-schade te meten, die grofweg zijn onder te verdelen in drie verschillende typen: mutaties, chromosomale afwijkingen en de activatie van DNA-reparatiesystemen (afbeelding 1). Voor de toelating van stoffen worden deze verschillende mechanismen onderzocht met een set bioassays die verplicht tenminste de Amestest en micronucleustest omvat [5], [6], [7]. Met deze twee bioassays kunnen stoffen die het DNA beschadigen en mogelijk kankerverwekkend zijn voldoende betrouwbaar aangetoond worden [8].



Afbeelding 1. Schematisch overzicht van verschillende mechanismen van DNA-schade met de bioassays die op basis van dat mechanisme werken

Keuze van bioassays

Er zijn vijf bioassays geselecteerd die gebruik maken van cellen of bacteriën en die momenteel in Nederland voorhanden zijn voor waterkwaliteitsbeoordeling. Van deze bioassays is bekend dat ze verschillende werkingsmechanismen van genotoxiciteit meten (afbeelding 1). De Ames-fluctuatietest

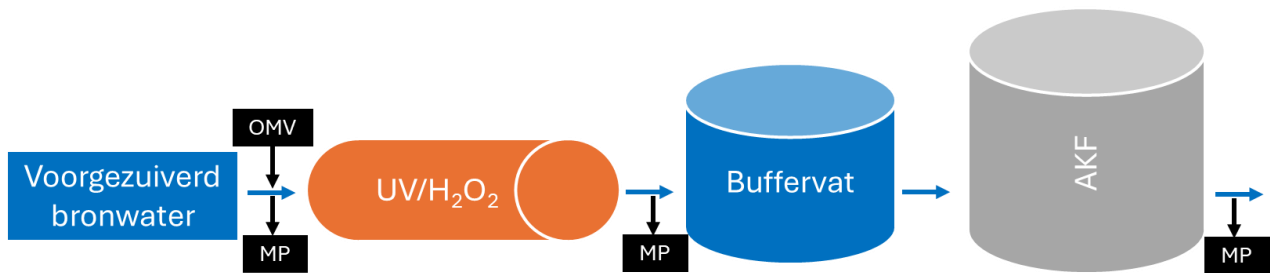
[9] en de p53-CALUX [10] zijn assays die al regelmatig in de drinkwatersector worden toegepast. De Ames-fluctuatietest is opgenomen in de bioassaysbasisset van de Sleutelfactor Toxiciteit 2.0 [11] en de p53-CALUX [10] in de handreiking voor het uitvoeren van biologische effectmonitoring bij geavanceerde zuivering van RWZI-effluenten bij toepassing van oxidatieve technieken [12]. De micronucleustest [13] wordt in Nederland niet routinematig uitgevoerd voor waterkwaliteitsbeoordeling, maar is toegevoegd omdat deze specifiek is voor het meten van afwijkingen aan chromosomen. De umu-test [14] meet net als de p53-CALUX de activatie van DNA-reparatiemechanismen en is net als de micronucleustest onderdeel van een teststrategie die het Federaal Milieugentschap in Duitsland heeft ontwikkeld [15]. De comet assay, ten slotte, meet voornamelijk chromosoomafwijkingen. De comet assay is echter een indicatorstest omdat het gemeten effect door DNA-reparatiemechanismen kan worden hersteld [16].

Tabel 1. Eigenschappen van de gekozen bioassays voor het experimentele onderzoek binnen het DPWE-programma

	Ames-fluctuatietest	Micronucleus-test	Comet assay	Umu-test	p53-CALUX
Biologisch effect	Genmutaties	Chromosoomafwijkingen		Activatie van DNA-reparatiemechanisme	
Teststelsel	Bacteriën	Menselijke cellen	Menselijke cellen	Bacteriën	Menselijke cellen

Onderzochte watermonsters

Van elk van de vier drinkwaterbedrijven in het DPWE-programma is een bron (oppervlaktewater) geselecteerd voor het onderzoek en daarnaast van één drinkwaterbedrijf een zuiveringsproces. De gekozen zuivering voor het genotoxiciteitsonderzoek is een proces met geavanceerde oxidatie (middendruk UV/H₂O₂) gevolgd door actieve koolfiltratie (AKF) (afbeelding 2). Dit proces is voor dit onderzoek relevant vanwege de mogelijke vorming van genotoxische transformatieproducten bij UV-processen [1]. De bemonstering vond gelijktijdig plaats met DPWE-Robuustheidsonderzoek [17], waarin een doseeroplossing van ruim dertig organische microverontreinigingen (OMV) werd gedoseerd aan de voorgezuiverde bron. Voor de selectie van de stoffen werden verschillende aspecten meegenomen, waaronder het aantreffen in bronnen gedurende de afgelopen vijf jaar, toxiciteit, verwachte zuiveringsefficiëntie, overlap met eerder DPWE-Robuustheidsonderzoek en mogelijkheid voor doelstofanalyses. De dosering aan het UV/H₂O₂-AKF-proces was een korteduurtest (tenminste drie keer de verblijftijd van het systeem) en is in tweevoud uitgevoerd (onafhankelijke experimenten). De nabehandeling van de UV/H₂O₂-AKF-experimenten vond plaats door het opvangen water te recirculeren over de UV/H₂O₂-installatie en verse actieve kool [17].

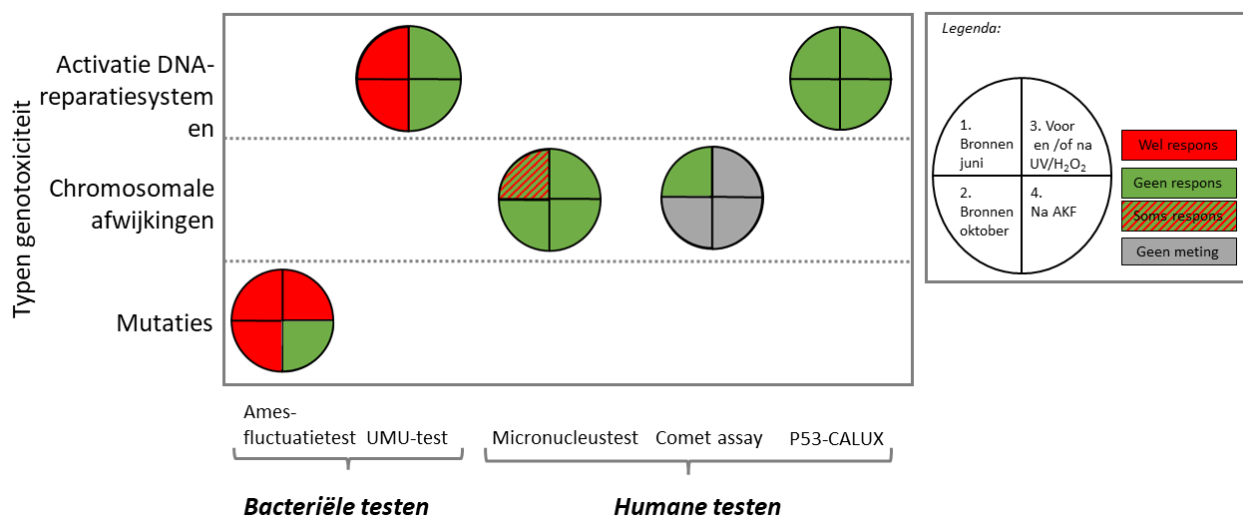


Afbeelding 2. Schematisch overzicht van proefinstallatieopzet die is gebruikt voor het onderzoek. AKF: actieve koolfilter, MP: monsterpunt, OMV: doseeroplossing met organische microverontreinigingen, UV/H₂O₂: behandeling met ultraviolette straling en waterstofperoxide

Van de bronnen zijn op twee verschillende momenten enkelvoudige steekmonsters genomen. Van het zuiveringsproces zijn drievoudige steekmonsters genomen op vier verschillende punten in het proces (zie afbeelding 2). Vóór de toepassing van bioassays zijn deze watermonsters eerst behandeld met vastefase-extractie om de aanwezige organische microverontreinigingen te concentreren en storende bestanddelen te verwijderen.

Resultaten

De aan- of afwezigheid van een effect voor de watermonsters in de gekozen bioassays is weergegeven in afbeelding 3.



Afbeelding 3. Samenvatting van de aan- of afwezigheid van een effect voor de watermonsters in de gekozen bioassays. Genotoxiciteit werd vastgesteld als ten minste één conditie positief was. Van de bronnen is op twee momenten een monster genomen. De resultaten hiervan zijn aangegeven in het eerste en tweede kwadrant. In het zuiveringsproces zijn monsters in drievoud genomen, waarvan de resultaten in het derde (voor en na UV/H₂O₂) en vierde kwadrant (na AKF) zijn samengevat. Rood: respons voor genotoxiciteit, groen: geen respons voor genotoxiciteit, rood/groen: soms een respons voor genotoxiciteit, grijs: geen meting. UV/H₂O₂: behandeling met ultraviolette straling en waterstofperoxide, AKF: actieve koolfiltratie

Bovenstaande resultaten laten zien dat niet elke bioassay hetzelfde resultaat geeft voor een bepaald watermonster. Alle bronnen gaven op beide bemonsteringsmomenten een respons op de Ames-fluctuatietest en in bijna alle gevallen ook op de umu-test. Op de micronucleustest gaven echter slechts enkele metingen van de bronnen een respons. Voor geen van de bronnen werd respons gezien in de

comet assay (alleen in enkelvoud toegepast op de bronnen) en in de p53-CALUX. Dat bij blootstelling aan hetzelfde monster de ene genotoxiciteitsassay wel reageert en een andere niet, is te verklaren door verschillen in werkingsmechanisme en hoe goed de bioassay de aan- of afwezigheid van het effect waarop getest wordt juist aantoonst (zgn. gevoeligheid en specificiteit). Afwezigheid van een respons in een bioassay kan er dus op wijzen dat er geen stoffen met het voor de bioassay specifieke werkingsmechanisme aanwezig waren, of dat de concentraties van deze stoffen in het concentraat te laag waren.

De waargenomen responsen in monsters uit oppervlaktewaterbronnen in de Ames-fluctuatietest en umu-test en voor enkele bronnen in de micronucleustest, zijn in lijn met eerder onderzoek met deze assays in oppervlaktewateren. Ze duiden op de aanwezigheid van mutagene stoffen [18], [19], [20]. Met de p53-CALUX wordt, net als in deze studie, in de monitoring van de bronnen van deze drinkwaterbedrijven vrijwel nooit genotoxische activiteit waargenomen.

Voor het onderzochte zuiveringsproces werden enkel effecten in de Ames-fluctuatietest gevonden, voornamelijk na UV/H₂O₂-behandeling en gedeeltelijk in het voorgezuiverde bronwater (voor UV/H₂O₂). Dit is lijn met het gegeven dat er tijdens UV-processen mutagene transformatieproducten kunnen ontstaan [1]. Door het actieve koolfilter na de UV/H₂O₂-behandeling verdwijnt de genotoxische activiteit weer. Ook dit is in lijn met voorgaand onderzoek [21].

Aangezien het (voorgezuiverde) bronwater (dus vóór UV/H₂O₂-behandeling) ook effecten liet zien in de Ames-fluctuatietest, is niet duidelijk of er transformatieproducten worden gevormd, of dat stoffen niet (volledig) worden verwijderd. Hiervoor is nader onderzoek nodig waarin de waargenomen effecten worden gekoppeld aan specifieke stoffen om de oorzaak van de waargenomen toxiciteit te bevestigen. Dit is mogelijk door het combineren van de bioassayresultaten met (brede) chemische analyse, *effect-directed analysis* (EDA), beschikbare toxiciteitsgegevens en/of toxiciteitvoorspellingen met behulp van computermodellen [22].

Hoewel in dit onderzoek de umu-test is uitgevoerd met relatief hoge concentraties van de extracten van de watermonsters en er in de bronnen effecten zijn gevonden, werden er voor het onderzochte zuiveringsproces in deze bioassay geen effecten gevonden. Ook in de p53-CALUX en micronucleustest werden voor het onderzochte zuiveringproces ook geen effecten gevonden.

Uitgangspunten voor de inzet van bioassays

Het huidige onderzoek brengt de verschillen tussen de uitkomsten van vijf bioassays toegepast op bronnen en een zuiveringstap van de drinkwaterbedrijven in beeld. Het geeft een eerste inzicht in de responsen van de verschillende bioassays voor verschillende watermonsters. Op basis van de huidige resultaten is het nog niet mogelijk een definitieve selectie van assays te maken voor een basisset voor genotoxiciteit, maar het geeft wel een richting aan.

Opvallend is dat er voor alle drie onderzochte typen genotoxiciteit in één of meerdere onderzochte watermonsters activiteit is gevonden. Er waren dus niet alleen veroorzakers van maar één vorm van genotoxiciteit aanwezig. Dit onderstreept het belang van onderzoek naar meerdere vormen van genotoxiciteit.

Door meer verschillende watermonsters uit verschillende omstandigheden in deze set bioassays te bemeten kan een beter onderbouwde uitspraak worden gedaan over de voorspellende waarde van de verschillende testen en hun toegevoegde waarde in een testbatterij. Ook als de chemische samenstelling van een monster (deels) bekend is, is het niet altijd mogelijk vast te stellen welke stof of

stoffen zorgen voor het effect in een bioassay, omdat niet voor elke stof genotoxiciteitsgegevens beschikbaar zijn. Het testen van bekende mengsels met waterrelevante concentraties van stoffen waarvan wel genotoxiciteitsgegevens beschikbaar zijn, kan hierbij helpen. De voorspellende waarde van bioassays voor een bepaald effect binnen waterkwaliteitsmonitoring en wat betreft een risico voor de mens kan verder worden onderzocht aan de hand van onderzoek naar individuele stoffen in water. Hierbij worden de gevonden effecten vergeleken met gegevens van effecten in de mens (of in dieren). Voor de meeste bioassays zijn dergelijke gegevens beschikbaar. Vaak zijn echter niet dezelfde stoffen gemeten, waardoor sensitiviteit en specificiteit tussen bioassays niet goed te vergelijken zijn. Een dergelijk onderzoek zou goed passen naast lopende initiatieven in het NORMAN-netwerk [23] en het Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals (PARC) [24].

Dit onderzoek was gericht op de detectie van genotoxische activiteit met bioassays. Het spreekt vanzelf dat er in water ook andere activiteiten van stoffen voor kunnen komen die relevant zijn voor de bereiding van gezond en veilig drinkwater. Hierbij valt te denken aan hormoonverstoring, verstoring van de omzetting van lichaamsvreemde stoffen en oxidatieve stress. Voor deze mechanismen zijn ook specifieke bioassays beschikbaar die worden toegepast in DPWE-monitoringsprogramma's en robuustheidsonderzoek. Voor een integrale beoordeling van water zijn daarom ook bioassays voor andere eindpunten dan genotoxiciteit nodig.

Conclusie

Voor een betrouwbaar beeld van genotoxische activiteit in water zijn meerdere bioassays nodig, die verschillende vormen van genotoxiciteit kunnen aantonen. De combinatie van de Ames-fluctuatietest (in dit onderzoek de assay die de meeste respons gaf), de p53-CALUX en eventueel aanvullend de micronucleustest (beide met een hogere relevantie voor menselijke gezondheid op basis van het gebruik van menselijke cellen), lijkt volgens dit onderzoek een goede basisset voor onderzoek naar zuiveringsprocessen. Als watermonsters op beide assays geen respons geven, zoals in dit onderzoek na de laatste zuiveringsstap met actieve kool, kan het risico van genotoxiciteit als laag worden beschouwd.

Dankwoord

Dit onderzoek is gefinancierd vanuit het gezamenlijke onderzoeksprogramma van de drinkwaterbedrijven Dunea, PWN, Waternet en Evides (DPWE).

Met bijdragen van Danny Harmsen, Bas Wols, Leonie Veldhuizen-Pap, René van Doorn, Milou Dingemans (KWR), Martin Spruijt, Marco Aalders (PWN), Laila Kuipers, Raymond Pieters (Hogeschool Utrecht), Andrea Sehr (Umweltbundesamt, DE).

Referenties

1. Baken K. et al. (2015). 'Ontstaan en opsporing van nevenproducten bij UV-processen'. *H2O-online*, 30 november 2015. <https://edepot.wur.nl/368105>
2. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (2024). *Risico's van stoffen. Oppervlaktewater*. <https://rvs.rivm.nl/onderwerpen/normen/milieu/oppervlaktewater>, geraadpleegd op 29 maart 2024.
3. Bertelkamp, C. et al. (2019). *DPWE Robuustheid uitvoering doseerproeven 2017-2018. Resultaten van doelstofanalyses, non-target screening en bioassays*. Herziene versie 2020. KWR rapport 2019.040. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, mei 2020.

4. Reus, A., Houtman, C., Pieters, R., Hendriks, G. Kuckelhorn, J. (2024). 'Gebruik van bioassays om genotoxische activiteit te meten in alternatieve bronnen'. *H2O-Online*, 1 juli 2024. <https://www.h2owaternetwerk.nl/vakartikelen/gebruik-van-bioassays-om-genotoxische-activiteit-te-meten-in-alternatieve-bronnen>
5. European Chemicals Agency (2017). *ECHA Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment*, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, Version 6.0, Chapter R7.7. Mutagenicity and carcinogenicity, juli 2017.
6. European Food Safety Authority (2011). 'EFSA Scientific Committee; Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applied to food and feed safety assessment'. *EFSA Journal* 9(9): 2379,.
7. European Medicines Agency (2008). *EMA ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use*, EMA/CHMP/ICH/126642/2008, juni 2012.
8. Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., Vanparys, P. (2011). 'A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins'. *Mutation Research*. 18;721(1):27-73.
9. Reifferscheid, G. et al. (2012). 'International round-robin study on the Ames fluctuation test'. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 53(3), 185-97.
10. Linden, S.C. van der et al. (2014). 'Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress'. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 760, 23-32.
11. Baat, M. de, Berg, S. van den, Pronk, T. (2022). *Het toepassen van bioassays binnen Nederland*. Deltafact, versie 1.0, 20 december 2022.
12. Ecofide (2023). *Handreiking voor het uitvoeren van biologische effectmonitoring bij vergaande zuivering van RWZI-effluenten*. Versie 0.8, 8 juni 2023.
- 13 Reifferscheid, G. et al. (2008). 'Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test: results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO'. *Mutation Research*. 649(1-2), 15-27.
14. Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H. (1985). 'Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens'. *Mutation Research*. 147(5), 219-29.
15. Grummt et al. (2020). *Tox-Box Guideline - Hazard-based risk management of anthropogenic trace substances in drinking water to secure a long-term drinking water supply*. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/5620/dokumente/2020-04-23_leitfaden_toxbox_engl.pdf, geraadpleegd op 11 september 2024
16. Cordelli, E., Bignami, M., Pacchierotti, F. (2021). 'Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing'. *Toxicological Research (Camb)*. 10(1), 68-78.
17. Wols et al. (2021). *Robuustheid zuivering DPWE 2021-2024: stofselectie en proefopzet*. KWR rapport 2019.095. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, november 2021.
18. 'Nog veel te vaak overschrijden gewasbeschermingsmiddelen kwaliteitsnorm in oppervlaktewater'. *H2O actueel*, 3 maart 2023.
19. 'Onderzoek: medicijnresten bedreigen kwaliteit oppervlaktewater'. *H2O actueel*, 12 oktober 2020.
20. 'Onderzoek: twee psychofarmaca in te hoge concentraties in oppervlaktewater'. *H2O actueel*, 30 januari 2023.

21. Heringa, M.B. et al. (2011). 'Formation and removal of genotoxic activity during UV/H(2)O(2)-GAC treatment of drinking water'. *Water Research* 45(1), 366-74.
22. Reus, A. et. al. (2022). 'QSAR en read-across modellen voor waterkwaliteit'. *H2O-online*, 18 maart 2022.
23. NORMAN. *Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances*. <https://www.norman-network.net/>
24. PARC. *Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals*. <https://www.eu-parc.eu/>