



Vereniging van
Rijnwaterbedrijven

Evaluatie van hormonale activiteit gemeten in de Rijn bij Lobith (2010-2011)



Ir. Tineke Slootweg
Dr. Corine J. Houtman



Vereniging van
Rijnwaterbedrijven

Evaluatie van hormonale activiteit gemeten in de Rijn bij Lobith (2010-2011)



Ir. Tineke Slootweg
Dr. Corine J. Houtman

Samenvatting

Om een integraal beeld te krijgen van de kwaliteit van het oppervlaktewater, kunnen naast chemische screening ook effectgerichte bioassays ingezet worden. Met behulp van deze assays is het mogelijk om effecten te meten van de complexe mengsels aan verontreinigende stoffen die aanwezig zijn in het water. In deze studie zijn bioassays ingezet, waarmee twee eindpunten gemeten zijn die relevant zijn voor de humane gezondheid: oestrogene activiteit gemeten met de ER-CALUX en glucocorticoïde activiteit gemeten met de GR-CALUX. Glucocorticoïden worden in geneesmiddelen gebruikt en spelen onder andere een rol bij het onderdrukken van het afweersysteem. De studie is uitgevoerd in 2010 en 2011.

Uit de resultaten blijkt dat de oestrogene activiteit in de Rijn bij Lobith laag was met waarden onder de 0,2 ng estradiol-equivalenten per liter (E2-eq/L). Uitzonderingen hierop zijn twee piekconcentraties van 0,4 en 0,8 ng E2-eq/L in de zomer van 2010. Alle waarden liggen onder de toxicologische trigger value voor humane consumptie van drinkwater van 7 ng E2-eq/L.

Op basis van de ER-CALUX resultaten van de periode van 2004 tot en met 2011 kon geen seizoens-trend worden vastgesteld. Omdat hormonen via menselijke uitscheiding via rioolwaterzuiveringen in het oppervlaktewater terecht kunnen komen is gekeken of er een verband was tussen de gemeten oestrogene activiteit en de aanwezigheid van zoetstoffen als indicator voor emissie van rioolwaterzuiveringsinstallaties. Ook is bekeken of bij grote hoeveelheden neerslag hogere oestrogene activiteit gevonden zou worden als mogelijk gevolg van riooloverstorten. Voor beide parameters kon niet vastgesteld worden dat ze invloed hadden op de oestrogene activiteit.

Vervolgens is in de GC-MS screeningsresultaten van Lobith van dezelfde meetdagen gezocht naar verbindingen die op die dagen in hogere concentraties voorkwamen dan op andere meetdagen, maar er werden geen specifieke stoffen gevonden worden die duidelijk de verhoogde oestrogene activiteit in de zomer van 2010 verklaren. Wel zijn drie verbindingen aangetroffen op het tijdstip dat de oestrogene activiteit hoog was die mogelijk een oestrogene werking hebben, namelijk oxindool, bisfenol A en dimethylftalaat. De concentraties zijn echter zo laag, dat ze gebaseerd op de individuele respons in de ER-CALUX minder dan 0,1% van de gemeten activiteit verklaren. Het is wel mogelijk dat, in overeenstemming met eerdere studies, lage concentraties natuurlijke en/of synthetische steroïdhormonen de gemeten activiteit geheel of gedeeltelijk veroorzaakt hebben.

De glucocorticoïde activiteit lag slechts in 23% van de monsters boven de detectielimiet van 1,5 ng DEX-eq/L. Maximale waarden lagen rond de 12 ng DEX-eq/L. Het gezondheidsrisico voor chronische blootstelling aan een lage dosis glucocorticoïden is onbekend. Wel is voor dexamethason een acceptabele dagelijkse inname (ADI) vastgesteld die met 1 µg DEX/persoon/dag ruim boven de waarde van 24 ng/persoon/dag ligt die een mens binnen zou krijgen via de inname van 2 liter ongezuiverd oppervlaktewater. Een gezondheidsrisico valt dus niet te verwachten. Het was niet mogelijk om stoffen te identificeren die verantwoordelijk zijn voor de gevonden glucocorticoïde respons. Op basis van de GR-CALUX resultaten van de periode van 2007 tot en met 2011 lijken de waarden in de zomerperiode lager te liggen dan in de overige seizoenen, maar door de grote variatie zijn de verschillen niet significant en kon een seizoenstrend niet worden bevestigd.



Figuur 1. De Nederrijn vanaf de Grebbeberg in Rhenen.

Summary

In order to obtain an integral picture of the quality of the surface water, effect-oriented bioassays can be used in addition to chemical screening. With the help of these assays, it is possible to measure the effects of the complex mixtures of pollutants that are present in the water. In this study bioassays were used, in which two endpoints were measured that are relevant for human health: estrogenic activity measured with the ER-CALUX and glucocorticoid activity measured with the GR-CALUX. Glucocorticoids are used in medicines and, among others, play a role in suppressing the immune system. The study was conducted in 2010 and 2011.

The results show that the estrogenic activity in the Rhine at Lobith was low, with values below 0.2 ng oestradiol-equivalents per litre (E₂-eq/L). Exceptions were two peak concentrations of 0.4 and 0.8 ng E₂-eq/L found in the summer of 2010. All values are under the toxicological trigger value of 7 ng E₂-eq/L for the human consumption of drinking water.

Based on the ER-CALUX results for the period running from 2004 to the end of 2011, no seasonal trend could be established. Because hormones can enter the surface water through human excretion via treated sewage water, it was investigated whether there was a relationship between the measured estrogenic activity and the presence of sweeteners, which are used as an indicator for the emission of sewage water by treatment plants. It was also investigated whether, higher estrogenic activity could be found during high rainfall as a possible result of sewage overflow. For both parameters, an influence on the estrogenic activity could not be found.

Subsequently, the GC-MS screening results of Lobith for the same measurement days were reviewed to search for compounds that, on those days, showed up in higher concentrations than they did on other measurement days. However, no specific substances were found that could clearly explain the increased estrogenic activity in the summer of 2010. Three compounds were found at the time when the estrogenic activity was high that possibly have an estrogenic effect, namely oxindole, bisphenol A and dimethyl phthalate. But the concentrations were so low that, based on the individual response in the ER-CALUX, they explain less than 0.1% of the measured activity. It is possible that, in conformity with earlier studies, low concentrations of natural and/or synthetic steroid hormones entirely or partially caused the measured activity.

In only 23% of the samples, the glucocorticoid activity was found to be above the detection limit of 1.5 ng DEX-eq/L. Maximum values were around 12 ng DEX-eq/L. The health risk presented by chronic exposure to a low dose of glucocorticoids is unknown. For dexamethasone, an acceptable daily intake (ADI) has been established that, at 1 µg DEX/person/day, is well above the value of 24 ng/person/day that a person would take in by consuming 2 litres of untreated surface water. Therefore, a risk to health is not expected. It was not possible to identify substances that are responsible for the measured glucocorticoid response.

Based on the GR-CALUX results for the period running from 2007 to the end of 2011, the values seem to be lower in the summer than they are in the other seasons. But, due to the large variation, the differences are not significant and a seasonal trend could not be confirmed.

Inhoudsopgave

Samenvatting	2
Summary	4
Inhoudsopgave	5
1. Inleiding	6
2. Werkwijze	7
2.1 Monsterlocatie	7
2.2 Bioassays	8
3. Resultaten en discussie	9
3.1 Oestrogene activiteit	9
3.2 Glucocorticoïde activiteit	14
4. Conclusies	17
5. Referenties	18
6. Bijlage I Ruwe meetgegevens	20

Inleiding

1

Via emissies vanuit industrieën, afvalwaterzuiveringsinstallaties en landbouw komt een groot aantal stoffen in het rivierwater terecht. Een beoordeling van het humane gezondheidsrisico van deze stoffen wordt door verschillende aspecten bemoeilijkt: ten eerste is van lang niet alle verbindingen de identiteit bekend en ten tweede is er sprake van complexe mengsels van stoffen met verschillende of juist gelijke werkingsmechanismen.

Met behulp van bioassays is het mogelijk om te meten of een diffuus mengsel van stoffen in een watermonster een effectrespons geeft. Bioassays kunnen daarom goed ingezet worden om een bijdrage te leveren aan de bepaling van de waterkwaliteit. De afgelopen jaren is er veel aandacht voor stoffen die de hormoonhuishouding bij mensen en dieren kunnen verstoren. Van oestrogene stoffen, zoals ethinylestradiol dat vooral gebruikt wordt in de anticonceptiepillen, is bekend dat zij al bij zeer lage concentraties invloed kunnen hebben op de voortplanting en seksuele ontwikkeling van organismen: een bekend voorbeeld is de inductie van interseks dat geconstateerd is bij vissen en slakken in het aquatisch milieu (Oehlmann et al. 2000; Vajda et al. 2008; Baynes 2009). Effecten bij vissen zijn al waargenomen bij een concentratie van 1 ng/L (e.g. Jobling et al. 2009).

Omdat er aanwijzingen waren dat hormoonverstorende stoffen aanwezig waren in het aquatische milieu, maar goede meetmethoden voor individuele hormoon(achtige) verbindingen ontbraken, is RIWA-Rijn in 2004 gestart met een onderzoek naar de aanwezigheid van oestrogene activiteit in het oppervlaktewater van de Rijn gemeten met de ER-CALUX (Puijker 2007). Vanaf 2007 is naast de oestrogene activiteit ook de activatie en/of remming onderzocht van androgeen-, progesteron-, thyroïd-, en glucocorticoïdreceptoren die alle een rol spelen bij de hormoonhuishouding van de mens (Schriks et al. 2009). Uit dit onderzoek bleek dat het niveau van androgene en progestagene activiteit in de Rijn laag was en dat thyroïde activiteit geheel afwezig was. Wel werd oestrogene activiteit waargenomen en ook glucocorticoïde activiteit. Deze laatstgenoemde was nog niet eerder gemeten in het oppervlaktewater van de Rijn. Het is wel een relevante bevinding omdat glucocorticoïden een rol spelen bij het onderdrukken van het afweersysteem. Om die reden worden ze ook gebruikt in medicijnen om auto-immuun ziektes en allergieën te behandelen (Rhen en Cidlowski 2005).

Op verzoek van de RIWA-Rijn is het onderzoek naar oestrogene en glucocorticoïde effecten in de Rijn voortgezet in 2010 en 2011. De uitkomsten van de effectgerichte testen worden in dit rapport beschreven. Mede gebaseerd op eerdere meetgegevens van de ER-CALUX bij Lobith van 2004 tot en met 2008 is gekeken of er jaar- en/of seizoentrends waarneembaar zijn in het voorkomen van hormonale activiteit, zoals die ook gevonden zijn voor sommige geneesmiddelen (Sacher et al. 2008; Ter Laak et al. 2010). Ook is gekeken of er verschillen zijn tussen de hormonale activiteit in het oppervlaktewater van de Rijn en van de Maas.

Tot slot zijn de gevonden activiteiten naast de resultaten van een parallel voor RIWA-RIJN uitgevoerde brede chemische non-target GC-MS screening gelegd die uitgevoerd is met monsters die op gelijke tijdpunten genomen zijn bij Lobith (Slootweg en Houtman, 2012) om te zien of de gevonden activiteit eventueel verklaard zou kunnen worden aan de hand van verbindingen gevonden in de watermonsters.

2.1 Monsterlocatie

In 2010 en 2011 zijn vierwekelijks watermonsters genomen in de Rijn bij Lobith (Figuur 2). Gelijktijdig zijn ook watermonsters genomen op de locaties waar de drinkwaterbedrijven Dunea en Waternet ruw oppervlaktewater innemen voor de drinkwaterproductie. Het gaat om de Lek bij Nieuwegein, het Amsterdam Rijnkanaal bij Nieuwersluis (Waternet) en de Maas bij Keizersveer (Dunea). De locaties zijn weergegeven in Figuur 3.

De monsters zijn geëxtraheerd met behulp van Oasis HLB solid-phase extractie kolommen en opgelost in dimethylsulfoxide (DMSO) zoals beschreven in Schriks et al. (2009)



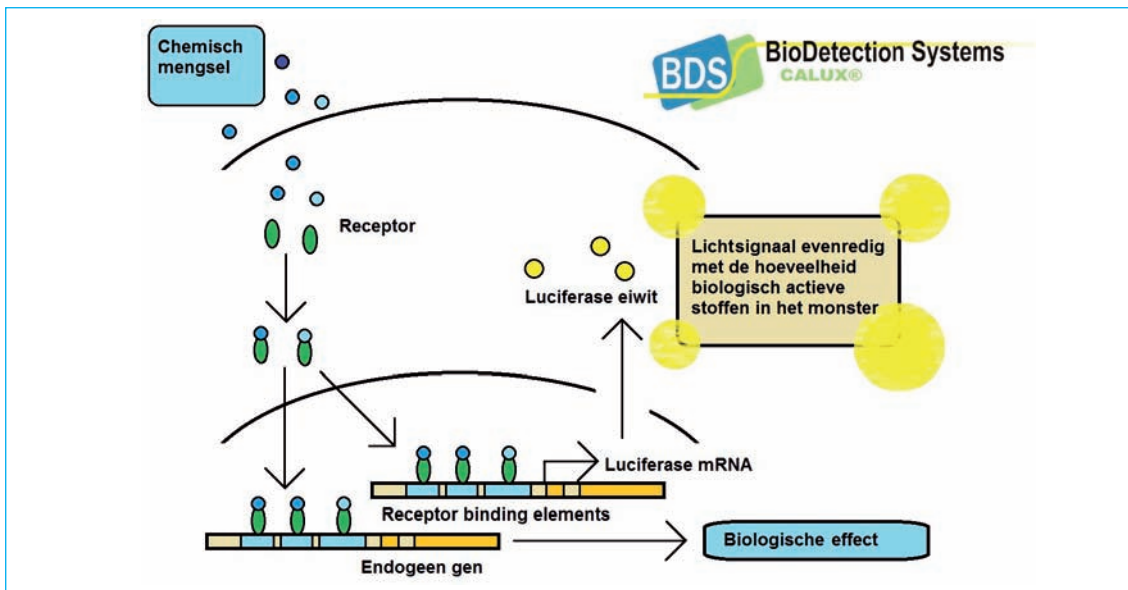
Figuur 2. Monsternamepunt bij Lobith.



Figuur 3. Kaart van Nederland met de monsterlocaties aan de Rijn (Lobith), Lek (Nieuwegein), Amsterdam Rijnkanaal (Nieuwersluis) en de Maas (Keizersveer).

2.2 Bioassays

Voor het meten van oestrogene en glucocorticoïde activiteit is gebruikt gemaakt van ER- en GR-CALUX¹ assays.

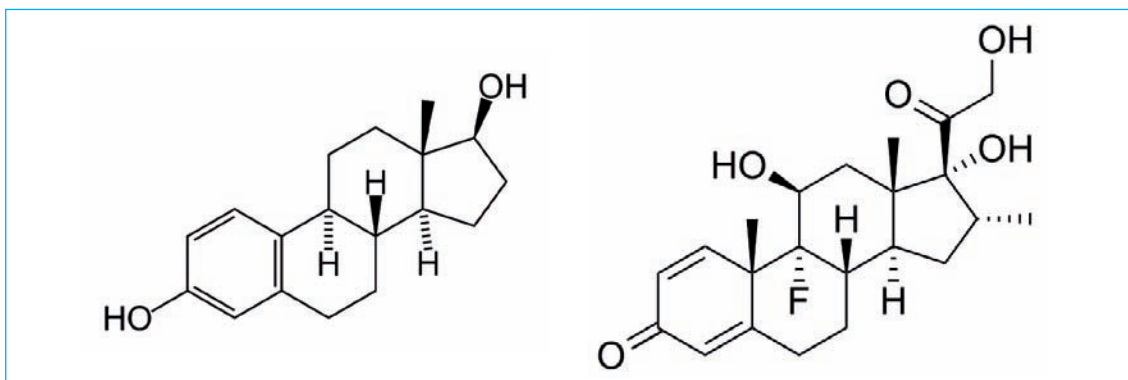


Figuur 4. Schematisch overzicht van de CALUX methode.

Het principe en de methoden van deze assays wordt uitgebreid beschreven in Van der Linden et al. (2008) en Schriks et al. (2009). Een illustratie van de methode is weergegeven in Figuur 4. De testen zijn uitgevoerd door BDS Biodetection Systems, Amsterdam.

Hormonen of hormoonachtige stoffen komen de cel binnen en binden aan hormoonspecifieke receptoren waarna het complex zich verplaatst naar de celkern. In de kern bindt het complex aan zogenaamde "receptor binding elements" in het DNA waarmee de transcriptie van deze genen geïnduceerd wordt. Dit resulteert uiteindelijk in de productie van de eiwitten waar de genen voor coderen. In de CALUX-assays bindt het hormoonreceptorcomplex aan speciaal ontworpen HRE-Luc-genen die coderen voor luciferase-eiwitten. Luciferaseproductie is meetbaar door het toevoegen van het substraat luciferine waarbij een lichtreactie ontstaat.

De gevonden hormoonactiviteit wordt uitgedrukt in concentraties van een referentiestof per liter water. Voor oestrogene activiteit wordt 17 β -estradiol (E2) als referentie gebruikt en voor glucocorticoïde activiteit wordt dexamethason (DEX) gebruikt (Figuur 5).

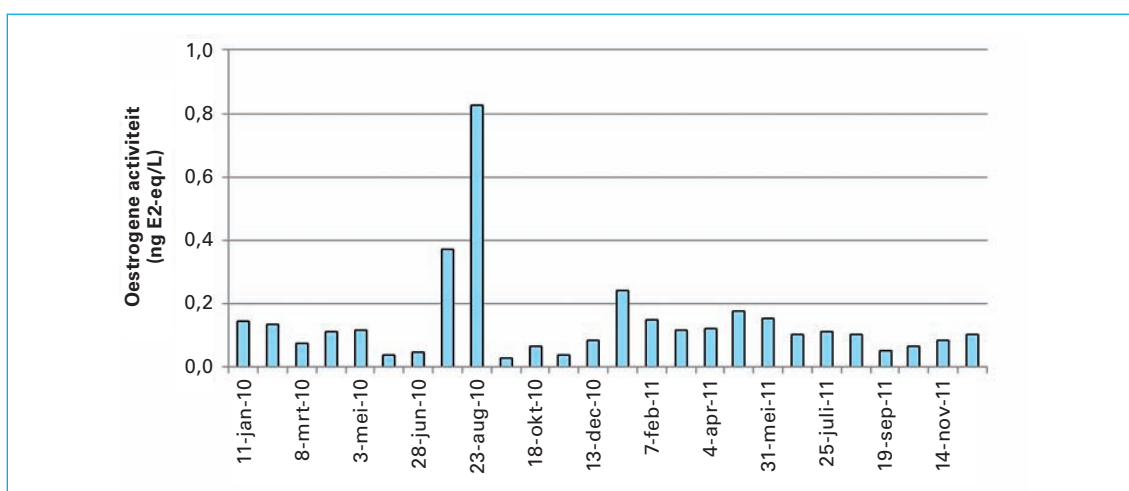


Figuur 5. Structuurformule 17 β -estradiol (links) en dexamethason (rechts).

¹Estrogenic Responsive/ Glucocorticoid Responsive - Chemically Activated LUCiferase gene eXpression

3.1. Oestrogene activiteit

In Figuur 6 is de oestrogene activiteit gemeten in het oppervlaktewater van de Rijn bij monsterpunt Lobith weergegeven. De activiteit wordt uitgedrukt in 17β -estradiolequivalenten (E2-eq). Over het algemeen liggen de waarden onder de 0,2 ng E2-eq/L, met uitzondering van twee piekconcentraties rond de 0,4 en 0,8 ng E2-eq in de zomer van 2010. Vergeleken met voorgaande jaren 2005, 2007 en 2008 waarin Puijker (2007) en Schriks et al. (2009) waarden gemeten hebben bij Lobith tussen de 0,01 en 0,73 ng E2-eq/L, blijft de oestrogene activiteit op een gelijk niveau.



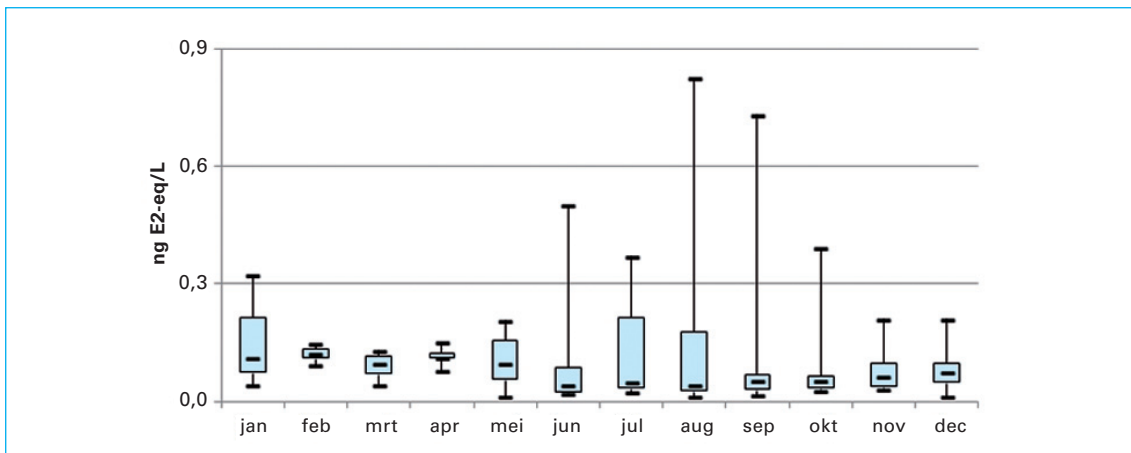
Figuur 6. Oestrogene activiteit uitgedrukt in concentraties van 17β -estradiol-equivalenten. De detectielimiet is 6,8 pg E2-eq/L.

Op grond van een toxicologische evaluatie is een ‘trigger-value’ vastgesteld voor de screening van oppervlaktewater met de ER-CALUX methode: boven de waarde van 7 ng E2-eq/L wordt aanbevolen nader onderzoek te doen naar de aard van de stoffen en de verwijdering bij de drinkwaterbereiding (Mennes 2004). Deze waarde is afgeleid van de laagste gemeten concentraties van natuurlijke hormonen in het bloed van mensen. Deze waarde is in 2010 en 2011 nooit overschreden en er zijn dus geen gezondheidseffecten te verwachten met betrekking tot oestrogene activiteit wanneer de Rijn gebruikt wordt als bron voor drinkwater. Bij vissen zijn echter al effecten waargenomen bij een concentratie van 1 ng EE₂/L (e.g. Jobling et al. 2009). In een recente publicatie hebben Caldwell et al. (2012) een ‘predicted no effect concentration’ (PNEC) van 2 ng E₂/L berekend voor aquatische organismen gebaseerd op alle beschikbare lange termijn-toxiciteitsgegevens voor aquatische organismen. De E₂-equivalenten overschrijden deze PNEC niet, maar de gemeten piekconcentratie van 0,8 ng/L ligt niet ver af van de concentratie waarbij effecten bij vis zouden kunnen optreden.

Seizoenstrend 2004-2011

De gemeten responsen in de ER-CALUX in de perioden van mei 2004 t/m december 2005 (Puijker 2007); augustus 2007 t/m juli 2008 (Schriks et al. 2009) en januari 2010 t/m december 2011 (deze studie) zijn in Figuur 7 in boxplot weergegeven per maand om te zien of er een seizoenstrend zichtbaar is. Door de grote variatie per maand is geen statistisch significant verschil tussen de verschillende maanden

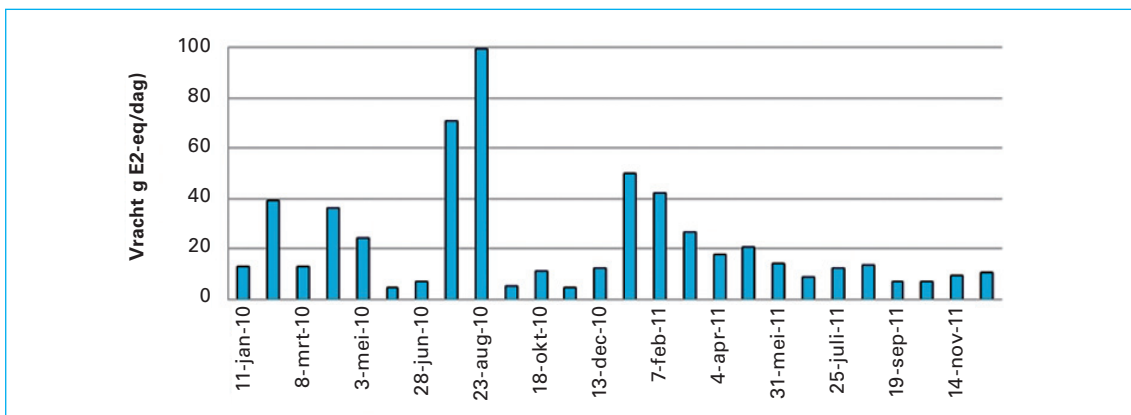
of seizoenen aangetoond (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Wel valt op dat de piekwaarden vooral gevonden worden in de periode tussen juni en oktober. Tegelijkertijd liggen de mediane concentraties in die periode lager.



Figuur 7. Alle ER-CALUX responswaarden die tussen 2004 en 2011 gemeten zijn, zijn per maand weergegeven in een box-plot waarin het minimum, de mediaan en het maximum zijn weergegeven met de zwarte streepjes. Het 1^e en 3^e kwartiel worden weergegeven door de onderste en bovenste lijn van de staven ($n = 5$ tot 8).

Vrachten

Wanneer de stoffen die de oestrogene activiteit verklaren constant over het jaar in de Rijn terecht zou komen, zou je een correlatie verwachten tussen de oestrogene activiteit en het debiet van de rivier. Door de oestrogene activiteit in ng E2-eq/L te vermenigvuldigen met het debiet in m³/s is het mogelijk om de vracht aan oestrogene activiteit die dagelijks door de Rijn stroomt te berekenen². Zoals blijkt uit Figuur 8 varieert de oestrogene vracht over het jaar en liggen de waarden tussen de 4 en 100 g E2-eq per dag.



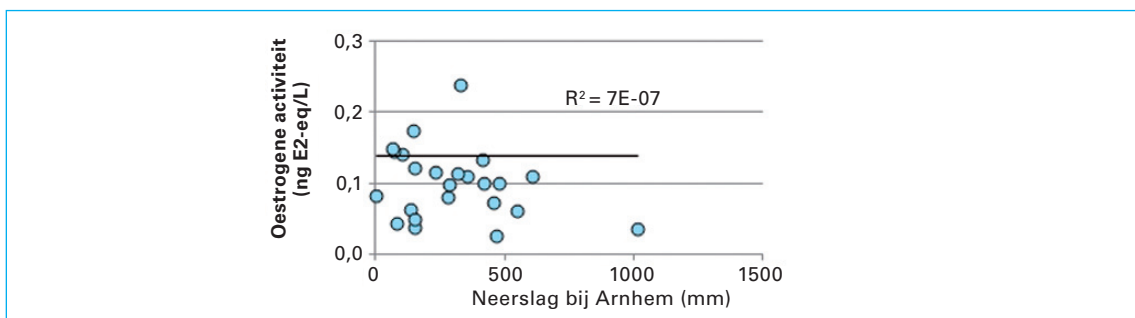
Figuur 8. Oestrogene activiteit uitgedrukt in dagelijkse vracht aan 17 β -estradiol-equivalenten in monsters van de Rijn bij Lobith in 2010 en 2011.

Naast hormonen die van nature door mens en dier worden uitgescheiden, worden hormoonachtige stoffen ook gebruikt in geneesmiddelen (bijvoorbeeld de anticonceptiepil). Ook deze stoffen kunnen via rioolwaterzuiveringsinstallaties in het oppervlaktewater terecht komen. Hormonen die door vee uitgescheiden worden gaan vaak niet via RWZI's. Een mogelijke verklaring voor de variatie in de oestrogene respons is dat overstort van riolen bij hevige regenval zou kunnen resulteren in hogere concentraties in het oppervlaktewater. Om dit nader te onderzoeken is bekeken of er een correlatie

² Voor de berekening van de dagelijkse oestrogene vrachten is het gemiddelde debiet genomen van een periode van twee weken voor de monsternamen. De debietgegevens zijn verkregen via de Waterdatabase van Rijkswaterstaat: http://www.rijkswaterstaat.nl/water/scheepvaartberichten_waterdata/historische_waterdata/waterbase/index.aspx

is tussen de gevonden oestrogene activiteit en de dagelijkse neerslag in de omgeving van Lobith (bij Arnhem)³. Uit Figuur 9 blijkt dat er geen verband gevonden is. Overstort kan echter ook eerder in het stroomgebied (Zwitserland/Duitsland) opgetreden zijn. In dat geval zit het effect van de hevige neerslag verwerkt in de debieten, maar hier was ook geen correlatie waarneembaar (Figuur 10).

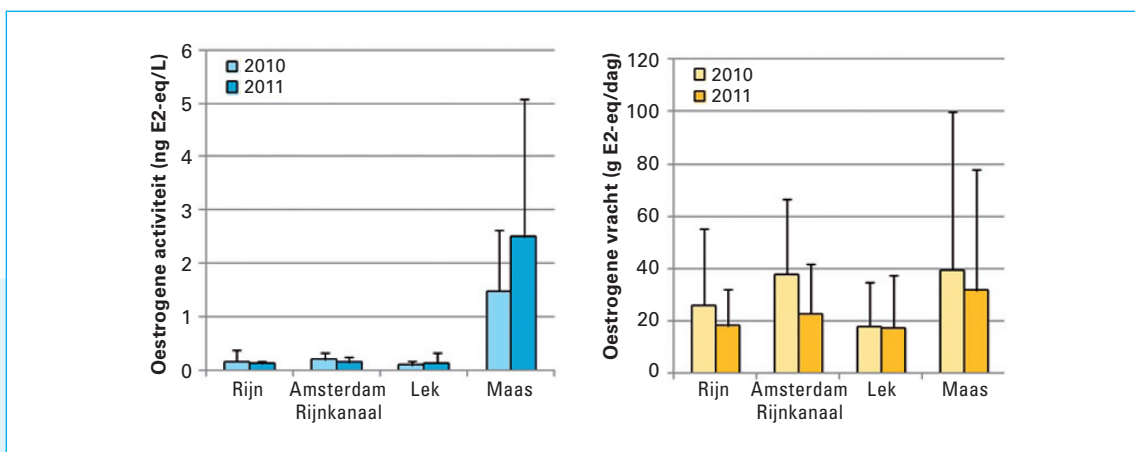
Een andere manier om te onderzoeken of er een relatie is tussen de overstort van riolen en oestrogene activiteit is om te kijken of er een verband is tussen indicatorstoffen (stoffen die aanwezig zijn in afvalwater en die persistent zijn tegen afbraak) en oestrogene activiteit. Hogere concentraties van deze indicatorstoffen kunnen duiden op grotere emissies uit rioolwaterzuiveringsinstallaties of overstorten. In dit geval zijn zoetstoffen en röntgencontrastmiddelen gekozen als indicatorstof omdat hiervan maandelijkse gegevens beschikbaar zijn voor Lobith. Voor geen van beide stofgroepen kon echter een correlatie gevonden worden met de oestrogene activiteit. Dit kan ermee te maken hebben dat oestrogene stoffen ook in oppervlaktewater terecht kunnen komen langs andere routes dan RWZI-effluent (bijvoorbeeld van vee op het land of uitgereden mest). Wanneer het aandeel hiervan groot is ten opzichte van de emissie via RWZI's, zal de correlatie tussen rioolwaterzuiveringsemissies en de gemeten activiteit minder duidelijk aanwezig zijn.



Figuur 9. Oestrogene activiteit bij Lobith gecorreleerd met de gemiddelde neerslag in Arnhem in de periode van twee weken voor monstername.

Vergelijking oestrogene activiteit in de Rijn bij Lobith met andere oppervlaktewateren

De gemiddelde oestrogene activiteit in het oppervlaktewater van de Rijn bij Lobith is vergeleken met die bij twee andere monsterpunten verder stroomafwaarts, namelijk het Amsterdam-Rijnkanaal bij Nieuwersluis en de Lek bij Nieuwegein. Ook is een vergelijking gemaakt met de oestrogene activiteit in de Maas bij Keizersveer (Figuur 3). Zowel de oestrogene activiteit als de oestrogene vrachten zijn vergeleken (Figuur 10).



Figuur 10. A) Gemiddelde oestrogene activiteit plus standaardafwijking en B) gemiddelde oestrogene vracht in 2010 en 2011 in verschillende oppervlaktewater-monsters genomen in de Rijn bij Lobith, de Lek bij Nieuwegein, het Amsterdam-Rijnkanaal bij Nieuwersluis en de Maas bij Keizersveer.

³ Gegevensbron: Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instituut (KNMI): <http://www.knmi.nl>

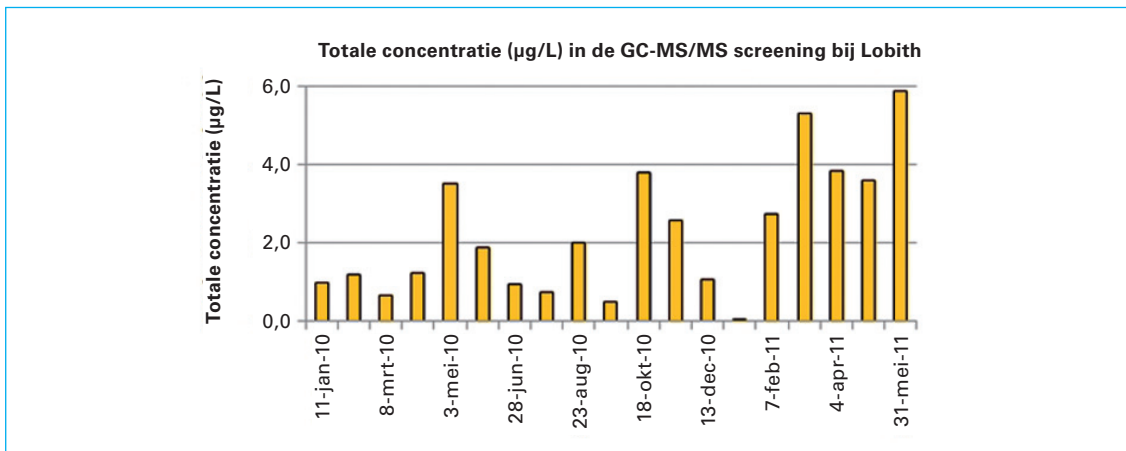
Wat opvalt, is dat de gemiddelde oestrogene activiteit in de Maas een stuk hoger ligt dan in de Rijn ($p < 0,001$, Wilcoxon toets, XLStat). De oestrogene activiteit op de monsterpunten in de Rijn en zijn vertakkingen ligt in hetzelfde bereik. Dat de hogere waarden in de Maas niet verklaard worden door hogere emissies van oestrogene verbindingen in de Maas blijkt uit de gemiddelde vrachten die weergegeven zijn in Figuur 10B. Deze liggen zowel in de Rijn als in de Maas tussen 20 en 40 g E₂-eq per dag. De hogere activiteit wordt vooral verklaard doordat het debiet van de Maas een stuk lager ligt dan het debiet van de Rijn.

De gemiddelde oestrogene vracht in 2011 ligt iets lager dan in 2010, maar dit verschil is niet significant door de variatie in de vrachten door het jaar heen.

Link met brede GC-MS screening

Gelijktijdig met de bemonstering van het oppervlaktewater van de Rijn voor de uitvoering van de ER-CALUX zijn ook watermonsters genomen waarmee een brede GC-MS screening is uitgevoerd om een beeld te krijgen van de aanwezigheid van organische verbindingen in de Rijn (Slootweg en Houtman, 2012). De resultaten van de CALUX-effectmeting en de brede GC-MS screening zijn naast elkaar gelegd om te zien of verbindingen aangetroffen zijn die de oestrogene activiteit kunnen verklaren.

De responsen die over de maanden heen gevonden zijn in de ER-CALUX assay vertonen geen correlatie met de totale concentratie stoffen die gemeten zijn in de brede GC-MS screening bij Lobith op gelijke monstertijdstippen. In de eerste helft van 2011 neemt de oestrogene vracht af, terwijl de totale concentratie stoffen juist toeneemt (vergelijk Figuur 6 en Figuur 11). Op zich is dit niet onverwacht, omdat de screening ook veel stoffen detecteert die niet bijdragen aan de gevonden oestrogene activiteit. Om die reden is ook bekeken of in de maanden juli en augustus van 2010, waarin de oestrogene activiteit hoger ligt dan in de overige maanden, bepaalde stoffen in de brede screening in hogere concentraties gemeten zijn dan in de overige maanden.



Figuur 11. Som van de concentraties van de individuele verbindingen in het water van de Rijn bij Lobith in 2010 en 2011.

Uit de screeningsresultaten blijkt dat in juli de verbinding oxindool (1,3-dihydro-indol-2-on) is aangetroffen in een relatief hoge indicatieve concentratie van 0,22 µg/L (omdat in de screening kwantificatie plaatsvindt op basis van de respons van de interne standaard naftaleen, liggen de concentraties van verbindingen met een hogere molmassa dan naftaleen - zoals oxindool - in werkelijkheid vaak hoger). Een gelijksoortige verbinding, namelijk 5-chloor-1,3-dihydro-2H-indol-2-on, wordt genoemd op de niet-limitatieve lijst van voor de voortplanting giftige stoffen die bijgehouden wordt door het Ministerie van Sociale Zaken en Werkgelegenheid. De verbinding heeft de status “mogelijk gevaar voor verminderde vruchtbaarheid of mogelijk gevaar voor de beschadiging van het ongeboren kind” (Staatscourant 2009). Omdat niet bekend is wat de hoogte van de respons van de individuele verbinding is in de ER-CALUX, is het niet mogelijk om in te schatten of en in welke mate deze stof werkelijk

een bijdrage levert aan de verhoging van de oestrogene activiteit in juli. In augustus is de verbinding niet aangetroffen.

In augustus zijn geen verbindingen aangetroffen boven de 0,1 µg/L, die niet of in mindere mate op andere tijdstippen in 2010 of 2011 zijn gemeten in het oppervlaktewater bij Lobith. Wel zijn lage concentraties van de verbindingen bisfenol-A en dimethylftalaat aangetroffen die beide bekend staan als xeno-oestrogene stof. Deze stoffen zijn in geen van de andere maanden gemeten. Beide stoffen zijn als individuele stof getest in de ER-CALUX en de equivalentiefactor vergeleken met E2 (EEF) was daarbij $1,13 \times 10^{-5}$ voor bisfenol A (Houtman et al. 2006), wat betekent dat bisfenol A ruim 100.000 keer minder potent is dan E2. De concentratie van 7 ng bisfenol A/L die is aangetroffen bij Lobith komt dan overeen met 0,08 pg E2/L, wat slechts 0,01% van de gevonden oestrogene activiteit in de ER-CALUX verklaart. Voor dimethylftalaat kon geen EEF berekend worden omdat de geteste concentraties tot 0,1 mg/L geen respons in de ER-CALUX gaf (Legler et al. 2002).

De stof estradiol zelf, die als meest potente verbinding bekend staat, kan alleen gemeten worden met de GC-MS methode als het extract eerst wordt gederivatiseerd, dus met de GC-screening zoals die nu is uitgevoerd (zonder derivatisatiestap) is estradiol niet aantoonbaar. In de meerderheid van onderzoeken naar de identiteit van oestrogene activiteit in het aquatisch milieu kwamen natuurlijke en synthetische oestrogene hormonen (estradiol, estron, ethynylestradiol) als verantwoordelijke verbindingen uit de bus (Houtman et al. 2011). Het is mogelijk dat dat hier ook zo is, maar om dat aan te tonen volstaat de brede GC-MS screening niet. Het Waterlaboratorium (HWL) ontwikkelt op het moment een doelstoffenanalyse voor de gevoelige identificatie van steroidhormonen in watermonsters waarmee de bijdrage van steroidhormonen aan de gemeten CALUX-activiteit onderzocht kan worden (Houtman et al. 2012).

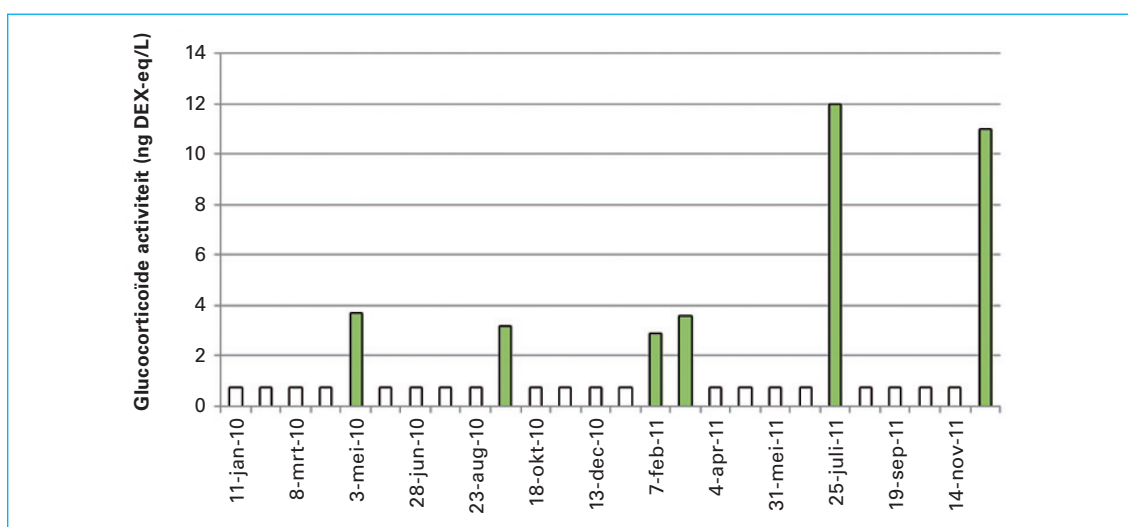


Figuur 12. Analist Richard Kerkhoff van het Waterlaboratorium aan het werk met de GC-MS voor de brede screening van stoffen in oppervlaktewater.

3.2 Glucocorticoïde activiteit

In Figuur 13 is de glucocorticoïde activiteit gemeten in het oppervlaktewater van de Rijn bij monsterpunt Lobith weergegeven. De activiteit wordt uitgedrukt in dexamethasonequivalenten (DEX-eq). In 2010 en 2011 zijn in 6 monsters waarden gemeten boven de detectielimiet van 1,5 ng DEX-eq/L. In juli en december 2011 zijn piekwaarden van 12 en 11 ng DEX-eq/L gemeten. In 2007 en 2008 lagen de waarden tussen de <LOD en 2,7 ng DEX-eq/L bij Lobith (Schriks et al. 2009). Vergeleken met voorgaande jaren liggen de waarden in 2010 en 2011 minder vaak boven de 1,5 ng/L (44% in 2007/2008 tegenover 23% in 2010/2011) (Schriks et al. 2009).

Het gezondheidsrisico voor chronische blootstelling aan een lage dosis glucocorticoïden is onbekend. De JECFA heeft een acceptabele dagelijkse innamedosis (ADI) vastgesteld op 1 µg DEX/persoon/dag (JECFA 1998). De inname van 2 liter ongezuiverd oppervlaktewater met de maximale DEX-eq concentratie die gemeten is van 12 ng DEX-eq/L zou resulteren in een dagelijkse inname van 24 ng/persoon/dag, wat ruim beneden de ADI is. Een echte risicobeoordeling is echter pas mogelijk wanneer bekend is welke verbindingen precies de respons in de GR-CALUX veroorzaken.

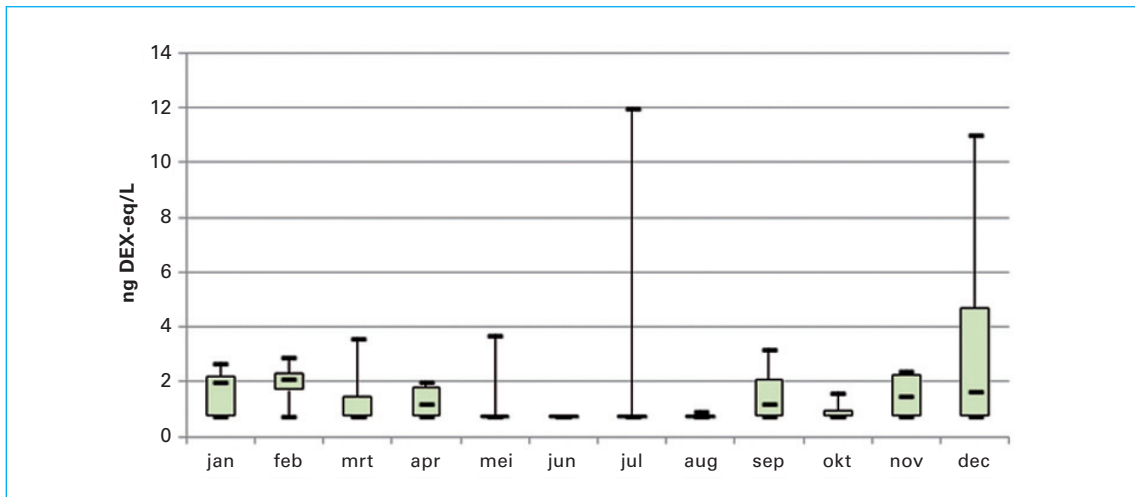


Figuur 13. Glucocorticoïde activiteit uitgedrukt in concentraties dexamethason-equivalenten (DEX-eq). De detectielimiet is 1,5 ng DEX-eq/L. Wanneer waarden onder de detectielimiet gemeten zijn, is een lege balk weergegeven.

Seizoenstrend 2007-2011

De gemeten responsen in de GR-CALUX in de perioden van augustus 2007 t/m juli 2008 (Schriks et al. 2009) en januari 2010 t/m december 2011 (deze studie) zijn in Figuur 14 per maand weergegeven in boxplots om te zien of er een seizoenstrend zichtbaar is. Doordat in alle maanden metingen zijn geweest met waarden onder de LOD, is er een grote variatie en zijn de verschillen tussen de maanden of seizoenen niet significant (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

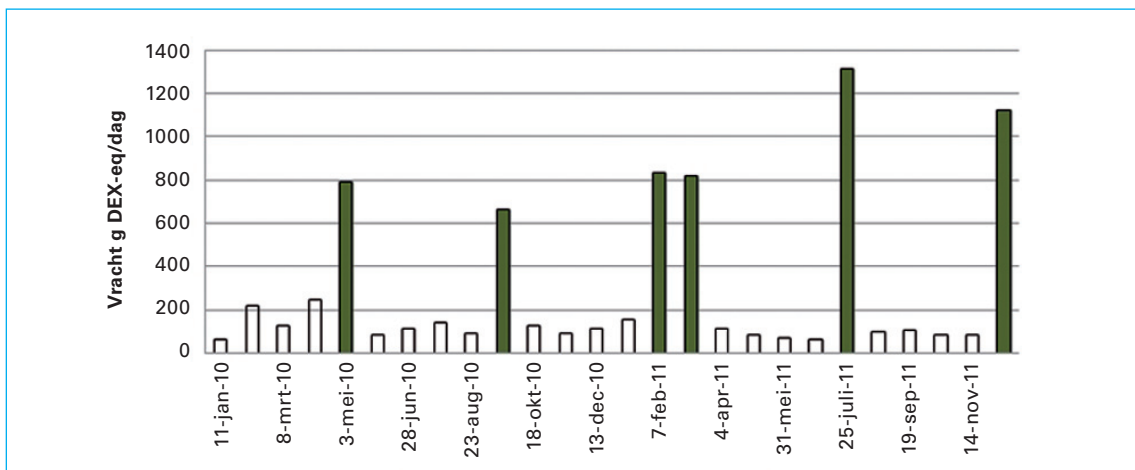
In Figuur 14 is wel zichtbaar dat vooral in de zomermaanden mei tot en met augustus, minder dan driekwart van de waarden boven de LOD liggen. De waarde van 25 juli 2011 ligt met 12 ng DEX-eq/L juist uitzonderlijk hoog.



Figuur 14. Alle GR-CALUX responswaarden die tussen 2007 en 2011 gemeten zijn, zijn per maand weergegeven in een boxplot waarin het minimum, de mediaan en het maximum zijn weergegeven met de zwarte streepjes. Het 1^e en 3^e kwartiel worden weergegeven door de onderste en bovenste lijn van de staven (n = 4 tot 6). Wanneer de meetwaarde lager is dan de LOD, is de helft van de LOD genomen (=0,75 ng/L).

Vrachten

De debiet- en neerslaggegevens zijn niet opvallend hoog of laag in juli en december 2011. De glucocorticoïde activiteit in ng DEX-eq/L is vermenigvuldigd met het debiet in m³/s om de dagelijkse glucocorticoïde vracht die door de Rijn stroomt te berekenen zoals ook gedaan is voor oestrogene activiteit⁴. De detectielimiet van de vracht (LOD van 1,5 ng/L*debiet in m³/s) ligt op ongeveer 200 g DEX-eq per dag, maar varieert door schommelingen in het debiet. De detectielimiet is weergegeven met de lege balken in Figuur 15. De maximale vracht ligt rond de 1300 g DEX-eq per dag.



Figuur 15. Glucocorticoïde activiteit uitgedrukt in dagelijkse vracht dexamethason-equivalenten in monsters van de Rijn bij Lobith in 2010 en 2011.

Natuurlijke glucocorticoïden zoals cortisol en cortison komen in het milieu terecht via natuurlijke uitscheiding door mens en dier. Daarnaast worden glucocorticoïden veel toegepast als geneesmiddelen, zowel voor mensen (voor verschillende ziektebeelden, zoals allergieën, huidproblemen, astma en artritis) en dieren (groei-promotors) (Chan et al. 2007). Door hun toepassing kunnen ze onder andere in de rivier terechtkomen via rioolwaterzuiveringsinstallaties of ze kunnen direct in het oppervlaktewater terechtkomen door uitspoeling van veegronden na hevige regenval. Chan et al. (2007) hebben concentraties rond de 0,3 tot 0,5 ng/L van zowel natuurlijke als synthetische glucocorticoïden aangetoond in

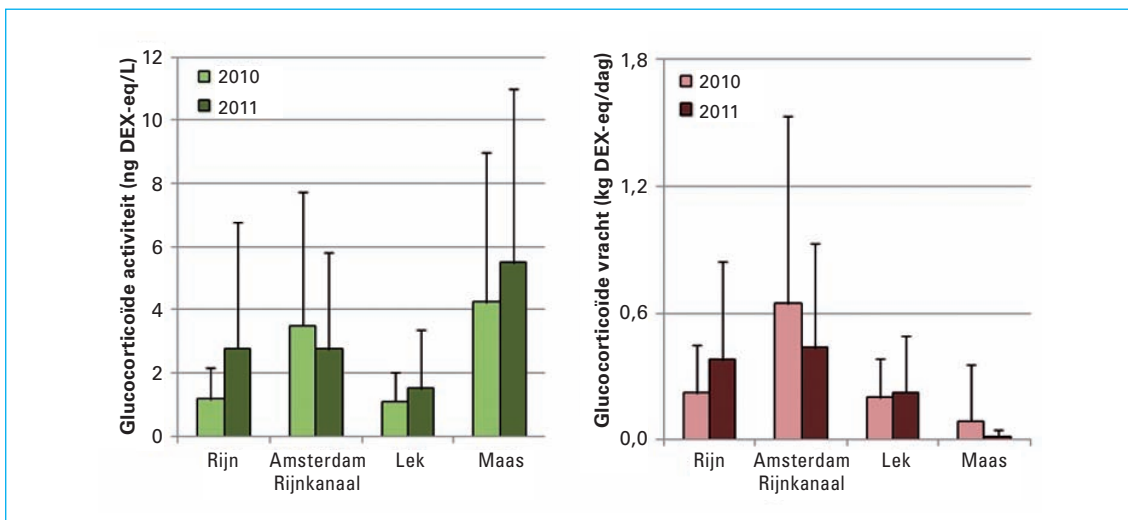
⁴ Voor de berekening van de dagelijkse oestrogene vrachten is het gemiddelde debiet genomen van een periode van twee weken voor de monsternamen. De debietgegevens zijn verkregen via de Waterdatabase van Rijkswaterstaat: http://www.rijkswaterstaat.nl/water/scheepvaartberichten_waterdata/historische_waterdata/waterbase/index.aspx

het effluent van RWZI's in China. Houtman et al. (2012) hebben in het oppervlaktewater van de Rijn de glucocorticoïde triamcinolon aangetroffen, en prednisolon in het oppervlaktewater van de Maas. Schriks et al. (2010) hebben onderzocht of het mogelijk was om de stoffen te identificeren die verantwoordelijk waren voor de GR-CALUX respons die ze hadden waargenomen in afvalwatermonsters van ziekenhuizen. Met behulp van een LC-MS/MS analyse konden verschillende glucocorticoïde stoffen geïdentificeerd worden waarvan cortisol, cortison, prednison, prednisolon en triamcinolon acetonide in de hoogste concentraties werden aangetroffen (13-1900 ng/L). Gebaseerd op de potentie van deze individuele stoffen om een respons te veroorzaken in de GR-CALUX kon vastgesteld worden dat de totale glucocorticoïde activiteit van de afvalmonsters voor een aanzienlijk deel verklaard kon worden op basis van de gevonden stofconcentraties. De grootste bijdrage aan de glucocorticoïde activiteit kwam van triamcinolon acetonide, dexamethason en prednisolon (Schriks et al. 2010). Het is mogelijk dat deze verbindingen ook in het oppervlaktewater van de Rijn een bijdrage leveren aan de gemeten glucocorticoïde activiteit, maar omdat deze verbindingen niet via een GC-MS screeningsanalyse-methode gemeten worden zoals die is uitgevoerd bij Lobith, kan dat niet bevestigd worden. Zoals eerder vermeld wordt op dit moment om deze reden een doelstoffenanalyse ontwikkeld door HWL voor de identificatie van steroïdhormonen in watermonsters.

Vergelijking glucocorticoïde activiteit in de Rijn bij Lobith met andere oppervlaktewateren

De gemiddelde glucocorticoïde activiteit in het oppervlaktewater van de Rijn bij Lobith is vergeleken met monsterpunten in het Amsterdam-Rijnkanaal bij Nieuwersluis en in de Lek bij Nieuwegein. Ook is een vergelijking gemaakt met de oestrogene activiteit in de Maas bij Keizersveer (Figuur 4). Zowel de glucocorticoïde activiteit als de glucocorticoïde vrachten zijn vergeleken (Figuur 17). Voor het berekenen van de gemiddelde waarden is voor de waarden, waarbij de respons niet boven de detectielimiet uitkwam, de helft van de detectielimiet (0,75 ng DEX-eq/L) gebruikt.

In tegenstelling tot metingen in 2007/2008, neemt de gemiddelde glucocorticoïde activiteit niet af verder stroomafwaarts in de Rijn bij Nieuwegein of Nieuwersluis. De activiteit in de Maas ligt iets hoger dan in de Rijn, maar door het lagere debiet van de Maas ligt de gemiddelde vracht juist lager in de Maas in vergelijking met de Rijn. Een goede vergelijking tussen de gemiddelden is echter niet mogelijk doordat in een groot aantal monsters de activiteit onder de detectiegrens ligt wat een grote invloed heeft op de gemiddelde waarden. De standaardafwijkingen zijn ook zo hoog dat verschillen tussen de locaties niet significant zijn ($p = 0,26$, Kruskal-Wallis toets). De verschillen tussen 2010 en 2011 zijn relatief klein (Figuur 16).



Figuur 16 A) Gemiddelde glucocorticoïde activiteit plus standaardafwijking en B) gemiddelde glucocorticoïde vracht in 2010 en 2011 in verschillende oppervlaktewater-monsters genomen in de Rijn bij Lobith, de Lek bij Nieuwegein, het Amsterdam-Rijnkanaal bij Nieuwersluis en de Maas bij Keizersveer.

- De oestrogene activiteit in de Rijn bij Lobith ligt over het algemeen onder de 0,2 ng E2-eq/L, met uitzondering van twee piekconcentraties tot 0,8 ng E2-eq/L. Alle waarden liggen onder de trigger value van 7 ng E2-eq/L voor humane consumptie van drinkwater die is berekend op basis van een toxicologische evaluatie. De gemeten oestrogene activiteit in het oppervlaktewater van de Rijn vormt daarmee geen bedreiging voor de kwaliteit van het drinkwater.
- De vracht aan oestrogene stoffen in de Rijn is vergelijkbaar met de vrachten in de Lek, het Amsterdam-Rijnkanaal en de Maas. Omdat de Maas een lager debiet heeft, is de gemeten activiteit wel hoger in deze rivier.
- Uit de GC-MS screeningsresultaten komen geen duidelijke kandidaatstoffen naar voren die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de toename in oestrogene activiteit in de zomer van 2010. De verbinding oxindool is aangetroffen met een indicatieve concentratie van 0,22 µg/L, maar het is niet mogelijk om een uitspraak te doen over de bijdrage van deze stof aan de totale oestrogene activiteit. De stoffen bisfenol A en dimethylftalaat zijn aangetroffen op het tijdstip dat de oestrogene activiteit hoog was, maar de concentraties zijn zo laag, dat ze een verwaarloosbaar deel van de gemeten activiteit zouden verklaren.
- Het is wel mogelijk dat, in overeenstemming met eerdere studies, lage concentraties natuurlijke en/of synthetische steroïdhormonen de gemeten activiteit geheel of gedeeltelijk veroorzaakt hebben.
- In 2010 en 2011 lag de gemeten glucocorticoïde activiteit in 23% van de monsters boven de detectielimiet van 1,5 ng DEX-eq/L. Maximale waarden lagen rond de 12 ng DEX-eq/L. Het gezondheidsrisico voor chronische blootstelling aan een lage dosis glucocorticoïden is onbekend. Wel is voor dexamethason een acceptabele dagelijkse innamedosis (ADI) vastgesteld die met 1 µg DEX/persoon/dag ruim boven de waarde van 24 ng/persoon/dag ligt die een mens binnen zou krijgen via de inname van 2 liter ongezuiverd oppervlaktewater. Een gezondheidsrisico valt dus niet te verwachten.

Referenties

Baynes AL (2009) Reproductive effects in two species of native freshwater gastropod mollusc exposed to 17 β -oestradiol or an environmentally relevant mixture of oestrogenic chemicals in outdoor mesocosms. PhD Thesis. Brunel University Institute for the Environment

Caldwell DJ, Mastrocco F, Anderson PD, Länge R, Sumpter JP (2012) Predicted no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol and 17 β -ethinylestradiol. *Environ Toxicol Chem* 31 (6): 1396-1406

Chan H, Hu J, Shao B (2007) Occurrence of Natural and Synthetic Glucocorticoids in Sewage Treatment Plants and Receiving River Waters. *Environ Sci Technol* 41: 3462-3468

Houtman CJ, Van Houten Y, Leonards PG, Brouwer A, Lamoree M, Legler J (2006) Biological Validation of a Sample Preparation Method for ER-CALUX Bioanalysis of Estrogenic Activity in Sediment Using Mixtures of Xeno-Estrogens. *Environ Sci Technol* 40: 2455-2461

Houtman CJ, Legler J, Thomas KV (2011). "Effect-Directed Analysis of Endocrine Disruptors in Aquatic Ecosystems." Bookchapter in *Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination*. Ed. W Brack. The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 2011. 237-66.

Houtman CJ, Ten Broek R, Kroesbergen J, Slootweg T (2012) A multi-component UPLC-tQ-MS/MS method to identify steroid hormones in CALUX positive surface waters. Poster presentation – SETAC World in Berlin, Germany, 20-24 May 2012

JECFA risk assessment dexamethasone (1998). WHO Food Additives Series 33.

Jobling S, Burn RW, Thorpe K, Williams R, Tyler C (2009) Statistical Modeling Suggests that Antiandrogens in Effluents from Wastewater Treatment Works Contribute to Widespread Sexual Disruption in Fish Living in English Rivers *Environmental Health Perspectives* 117 (5): 797-802

Legler J, Dennekamp M, Vethaak AD, Brouwer A, Koeman JH, Van der Burg B, Murk AJ (2002) Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *The Science of the Total Environment* 293: 69-83

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

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000) Effects of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part I: Bisphenol A and Octylphenol as Xeno-Estrogens. *Ecotoxicology* 9: 383-397

Puijker LM (2007) Oestrogene activiteit in oppervlaktewater van de Rijn. ISBN: 978-90-6683-123-0. RIWA-Rijn Vereniging van Rivierwaterbedrijven

Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory Action of Glucocorticoids – New Mechanisms for Old Drugs. *Engl J Med* 353:1711-1723

Schriks M, Heringa MB, Van der Linden SC (2009) Temporal variation in multiple hormonal activities of surface water in the Dutch part of the Rhine basin. ISBN: 978-90-6683-135-3. Association of Rhine Waterworks – RIWA.

Schriks M, Van Leerdam JA, Van der Linden SC, Van der Burg B, Van Wezel AP, de Voogt P (2010) High-Resolution Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glucocorticoid Compounds in Various Wastewaters in The Netherlands. *Environ Sci Technol* 44 (12): 4766–4774

Slootweg T, Houtman CJ (2012) Evaluatie van de brede screening van stoffen in de Rijn bij Lobith (2010-2011). Rapport EP11R1001 in opdracht van de RIWA Rijn – Vereniging van Rivierwaterbedrijven

Sacher F, Ehmann M, Gabriel S, Graf C, Brach H-J (2008) Pharmaceutical residues in the river Rhine- results of a one-decade monitoring programme. *J Environ Monit* 10: 664–670

Staatscourant (2009) Actualisering Lijst kankerverwekkende stoffen, Lijst mutagene stoffen, en niet-limitatieve lijst van voor de voortplanting giftige stoffen. Staatscourant Nr. 660 - Officiële uitgave van het Koninkrijk der Nederlanden sinds 1814. 15 januari 2009.

Ter Laak TL, Van der Aa, M, Houtman CJ, Stoks PG, Van Wezel AP (2010) Relating environmental concentrations of pharmaceuticals to consumption: A mass balance approach for the river Rhine *Environment International* 36: 403–409

Vajda AM, Barber LB, Gray JL, Lopez EM, Woodling JD, Norris DO (2008) Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environ Sci Technol* 42 (9): 3407–3414

Van der Linden SC, Heringa, MB, Man, HY, Sonneveld E, Puijker LM, Brouwer A, Van der Burg B (2008). Detection of multiple hormonal activities in waster water effluents and surface water,using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol* 42: 5814-5820.

Bijlage I Ruwe meetgegevens

Ruwe meetgegevens van de ER-CALUX en GR-CALUX bioassays in equivalenten van respectievelijk estradiol (E2) en dexamethason (DEX). De testen zijn uitgevoerd met oppervlaktewater van de Rijn (locatie Lobith) en de Maas (locatie Keizersveer)

Rijn - Lobith

	Oestrogene activiteit		Glucocorticoïde activiteit	
	pg E2-eq/L	g E2-eq/dag	ng DEX-eq/L	g DEX-eq/dag
11-jan-10	142	13	<LOD	<LOD
8-feb-10	134	39	<LOD	<LOD
8-mrt-10	73	13	<LOD	<LOD
6-apr-10	110	36	<LOD	<LOD
3-mei-10	114	24	3,7	790
31-mei-10	37	4	<LOD	<LOD
28-jun-10	43	7	<LOD	<LOD
26-jul-10	369	71	<LOD	<LOD
23-aug-10	824	100	<LOD	<LOD
20-sep-10	26	5	3,2	663
18-okt-10	64	11	<LOD	<LOD
15-nov-10	35	4	<LOD	<LOD
13-dec-10	81	12	<LOD	<LOD
10-jan-11	238	50	<LOD	<LOD
7-feb-11	146	42	2,9	832
7-mrt-11	116	26	3,6	822
4-apr-11	121	18	<LOD	<LOD
2-mei-11	175	20	<LOD	<LOD
31-mei-11	150	14	<LOD	<LOD
27-jun-11	99	9	<LOD	<LOD
25-jul-11	110	12	12,0	1313
22-aug-11	100	14	<LOD	<LOD
19-sep-11	50	7	<LOD	<LOD
17-okt-11	62	7	<LOD	<LOD
14-nov-11	82	9	<LOD	<LOD
12-dec-11	101	10	11,0	1121

Maas - Keizersveer

	Oestrogene activiteit		Glucocorticoïde activiteit	
	pg E2-eq/L	g E2-eq/dag	ng DEX-eq/L	g DEX-eq/dag
11-jan-10	geen meting		geen meting	
8-feb-10	290	12	<LOD	<LOD
8-mrt-10	3200	221	<LOD	<LOD
6-apr-10	1600	61	6	225
3-mei-10	3627	53	4	60
31-mei-10	273	3	<LOD	<LOD
28-jun-10	232	1	<LOD	<LOD
26-jul-10	1223	6	<LOD	<LOD
23-aug-10	998	13	<LOD	<LOD
20-sep-10	2469	30	15	180
18-okt-10	1878	19	11	111
15-nov-10	1220	37	3	91
13-dec-10	808	20	7	179
10-jan-11	364	23	2	94
7-feb-11	3740	179	4	191
7-mrt-11	703	21	4	120
4-apr-11	1003	14	<LOD	<LOD
2-mei-11	1057	8	3	22
31-mei-11	852	3	5	17
27-jun-11	2971	18	<LOD	<LOD
25-jul-11	9615	53	5	27
22-aug-11	1048	10	<LOD	<LOD
19-sep-11	1190	8	18	117
17-okt-11	2655	18	14	96
14-nov-11	5303	25	5	22
12-dec-11	2020	35	11	190

Colofon

Auteurs	Ir. Tineke Slootweg Dr. Corine J. Houtman  HET WATERLABORATORIUM
Uitgever	RIWA-Rijn, Vereniging van Rivierwaterbedrijven
Vormgeving	Meyson Communicatie, Amsterdam
Foto cover	Guillaume Doucet, http://guillaume.doucet.free.fr
Druk	KDR Marcom, Zaandam
ISBN/EAN	978-90-6683-151-3



**Vereniging van
Rijnwaterbedrijven**

RIWA-Rijn
Groenendael 6
3439 LV Nieuwegein
T +31306009030
F +31306009039
E riwa@riwa.org
W www.riwa.org