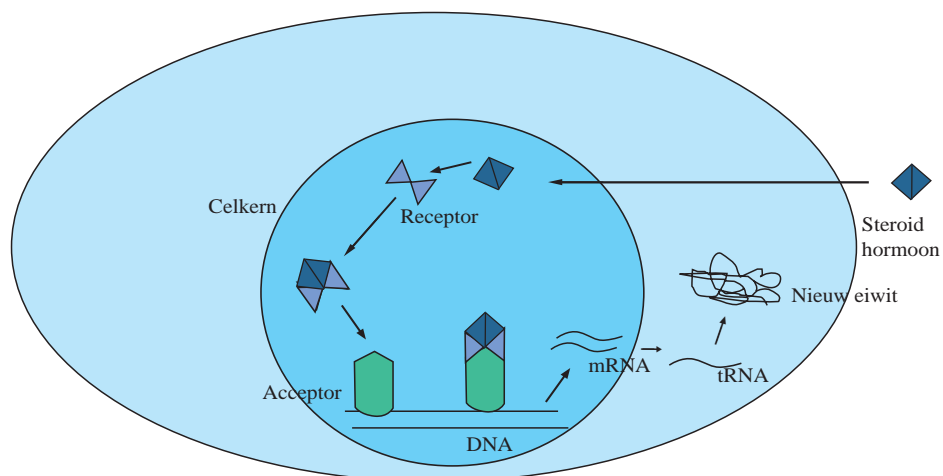


Oestrogene activiteit in oppervlaktewater van de Rijn

RIWA
Rijnwaterbedrijven

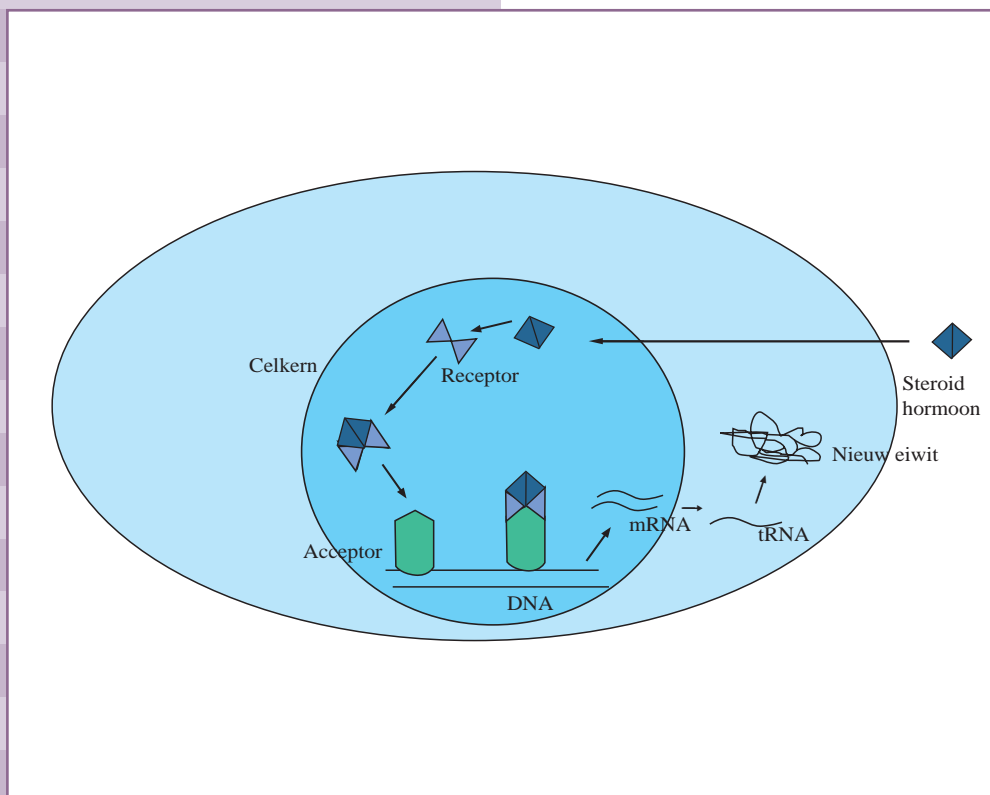


L.M. Puijker

Maart 2007

Vereniging van Rivierwaterbedrijven

Oestrogene activiteit in oppervlaktewater van de Rijn



L.M. Puijker

Inhoudsopgave

1 Samenvatting	3
2 Inleiding	4
3 Opzet van het onderzoek	6
4 Oestrogene activiteit in oppervlaktewate	7
5 Conclusie en aanbevelingen	10
6 Literatuur	11
6.1 Bijlage I: Uitvoering meting oestrogene activiteit	12
7 Colofon	14

1

Samenvatting

In de jaren 2000-2004 is door drinkwaterbedrijven in Nederland onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen, gedrag en risico van hormoonverstoorders (Endocrine Disrupting Compounds, EDCs) in de drinkwaterketen, van bron tot tap. Het onderzoek was aanvankelijk vooral gericht op oestrogene stoffen. In de afgelopen jaren is daarnaast ook onderzoek door RIWA uitgevoerd naar de aanwezigheid en betekenis van thyroid hormoon activiteit veroorzaakt door stoffen in oppervlaktewater van de Rijn.

In opdracht van RIWA-Rijn is in 2004 en 2005 een screening van de oestrogene activiteit in oppervlaktewater in het stroomgebied van de Rijn uitgevoerd. Hiervoor is een bioassay, de ER-CALUX methode, toegepast waarmee de totale potentiële oestrogene activiteit gemeten wordt.

De screening is maandelijks uitgevoerd in watermonsters van de Rijn (Lobith), het Lekkanaal (Nieuwegein), het IJsselmeer (Andijk) en in enkele watermonsters van het Twentekanaal (Enschede). De watermonsters zijn voorbehandeld door een filtratie, waarna met een vloeistof/vloeistofextractie de oestrogene stoffen uit het water zijn geëxtraheerd. In het geconcentreerde extract is met de ER-CALUX bioassay de totale oestrogene activiteit gemeten.

Uit de resultaten blijkt dat in de Rijn bij Lobith de hoogste oestrogene activiteit wordt gemeten met een maximale waarde van 0,5 ng/l EEQ (17 β -estradiol equivalenten). Opvallend is dat er geen directe relatie met de afvoer bestaat. Op de innamepunten in Nieuwegein en Andijk bedraagt de oestrogene activiteit maximaal 0,2 ng/l EEQ. De aangetroffen oestrogene activiteit in oppervlaktewater van de Rijn is significant lager dan eerder gerapporteerde waarden voor oppervlaktewater afkomstig uit de Maas. Op grond van de gemeten concentraties van minder dan 1 ng/l EEQ en de verdere verlaging van de oestrogene activiteit tijdens de zuivering wordt aangenomen dat de risico's voor consumenten van drinkwater verwaarloosbaar zijn.

Op grond van de metingen in de periode mei 2004 tot december 2005 lijkt voortzetting van een regelmatige screening van de oestrogene activiteit niet noodzakelijk. Alleen wanneer er aanwijzingen zijn dat de belasting van het oppervlaktewater met oestrogene stoffen sterk toeneemt wordt aanbevolen aanvullende metingen te verrichten. Deze belasting kan toenemen als gevolg van hogere effluentlozingen van rioolwaterzuiveringsinstallaties bij een gelijke of lagere afvoer van de Rijn.

Inleiding

2

In het bedrijfstakonderzoek van de drinkwaterbedrijven in Nederland is in de jaren 2002-2004 onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen, gedrag en risico van hormoonverstoorders (Endocrine Disrupting Compounds, EDCs) in de drinkwaterketen, van bron tot tap.

Natuurlijke en synthetische hormonen en EDCs komen wereldwijd voor in oppervlaktewater, rioolwater en effluënten van afvalwaterzuiverings-installaties. Dit geldt ook voor een groot aantal antropogene stoffen die een hormoonverstorende werking bezitten.

Het betreft onder meer de volgende groepen stoffen: natuurlijke en synthetische hormonen, fyto-oestrogenen, een aantal bestrijdingsmiddelen, industriële chemicaliën (bisfenol A), alkylfenoethoxylaten, ftalaten, organohalogeenverbindingen zoals PCBs en PBBs, organotinverbindingen, PAKs en enkele zware metalen.

Het onderzoek was aanvankelijk vooral gericht op oestrogene stoffen. In de afgelopen jaren is daarnaast ook onderzoek door RIWA-Rijn uitgevoerd naar de thyroid hormoon activiteit van stoffen aanwezig in oppervlaktewater van de Rijn en de betekenis daarvan, (Meulenberg, 2006).

Ook in de Rijn en de Maas komt oestrogene activiteit voor. Dat bleek ook bij de inzet van de ER-CALUX 'in vitro' bio-assay [Legler et al., 1999] bij onderzoek naar de oestrogene activiteit in de Rijn en de Maas in oktober 2003. De gemeten oestrogene activiteit op het innamepunt van de WRK in Nieuwegein en in het Maaswater bij Hedel was toen zelfs aanzienlijk hoger dan eerdere waarden gemeten in 2000 in het LOES onderzoek [Vethaak et al., 2002] en door RIWA gerapporteerde waarden voor onder andere hetzelfde innamepunt van Waternet te Nieuwegein en de Maas te Keizersveer [Ghijssen en Hoogenboezem, 2000].

Een zeer waarschijnlijke verklaring hiervoor is de toegepaste, veel efficiëntere isolatiemethode voor hormoonverstorende stoffen uit water, voorafgaand aan de uiteindelijke meting. Daarnaast was de lage afvoer van de Maas ten tijde van het onderzoek ook een oorzaak voor de relatief hoge waarden in het Maaswater [Puijker et al., 2004]. In dezelfde periode in 2003 werd in oppervlaktewater van het Lekkanaal (Nieuwegein) een maximale oestrogene activiteit van 0,4 ng/l EEQ (17 β -estradiol equivalenten).

De verhoogde oestrogene activiteit in de Maas ging gepaard met een verhoogde vitellogenine productie in mannetjes vissen, gemeten via 'in vivo' experimenten (Fathead Minnow). Daarbij bleek een goed verband tussen de uitkomsten van de ER-CALUX en de experimenten met vissen [Bogers et al., 2004]. De ER-CALUX in combinatie met een extractiemethode met ethylacetaat is een zeer geschikte screeningsmethode voor oestrogene activiteit in water omdat op deze wijze een breed scala aan potentiële oestrogene stoffen bepaald worden.

In drinkwater worden incidenteel enkele hormoonverstorende stoffen in zeer lage concentraties aangetroffen. Het betreft met name enkele nonylfenoethoxylaten, bestrijdingsmiddelen en ftalaten. Met de ER-CALUX in vitro bio-assay is in drinkwater geen oestrogene activiteit aangetroffen. Op grond van de zeer lage concentraties van de aangetroffen individuele stoffen en de gemeten oestrogene activiteit van minder dan 0,015 ng EEQ/l (uitgedrukt in ng 17 β -oestradiol) in drinkwater wordt aangenomen dat de risico's voor consumenten van drinkwater verwaarloosbaar zijn [Mennes, 2004].

Oestrogene stoffen lijken daarmee geen probleem te vormen voor de kwaliteit van het drinkwater: de bestaande zuiveringen vormen in de praktijk een goede barrière voor natuurlijke hormonen en de meeste EDCs, met uitzondering van Amitrol (Siegers, 2003) en de gemeten oestrogene activiteit in oppervlaktewater. Op grond van een toxicologische evaluatie is een 'trigger-value' vastgesteld voor de screening van oppervlaktewater met de ER-CALUX methode: boven deze waarde van 7 ng EEQ/l wordt aanbevolen nader onderzoek te doen naar de aard van de stoffen en de verwijdering bij de drinkwaterbereiding. Deze waarde is afgeleid van de laagste gemeten concentraties van natuurlijke hormonen in het bloed van mensen, (Mennes, 2004).

De robuustheid van de huidige barrières tegen EDCs is bevestigd in de praktijk (Puijker et al., 2004), via literatuuronderzoek (Siegers, 2002) en bij onderzoek uitgevoerd met laboratoriumtesten waarbij de effecten van coagulatie, oxidatie, adsorptie aan kool en membraanfiltratie zijn onderzocht. Goede verwijdering werd voor de meeste onderzochte stoffen vastgesteld. Dit geldt onder meer voor membraanfiltratie en toepassing van UV, ozon en actieve kool, alleen coagulatie/sedimentatie presteert matig [Siegers, 2003].

Om de belasting van het oppervlaktewater met oestrogene stoffen te onderzoeken is een screening van de totale oestrogene activiteit in oppervlaktewater over een langere periode uitgevoerd.

Opzet van het onderzoek

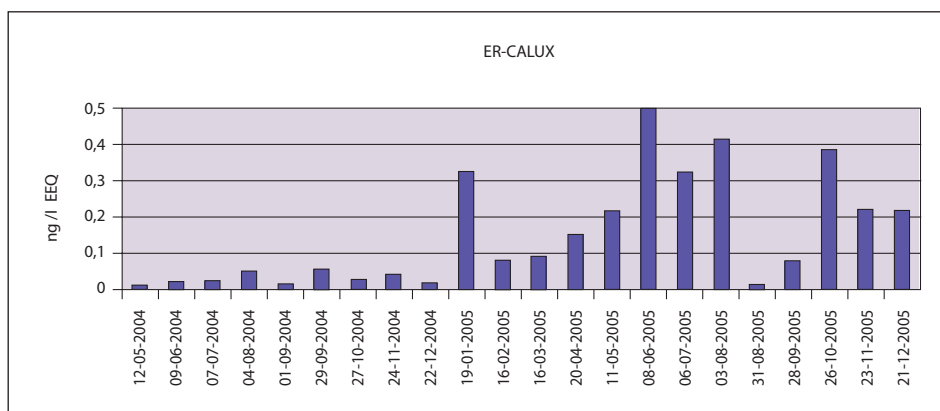
Het onderzoek naar oestrogene activiteit is op een viertal locaties uitgevoerd: in de Rijn (Lobith), het Lekkanaal (Nieuwegein), het IJsselmeer (Andijk) en het Twentekanaal (Enschede). Op de eerste 3 locaties is het oppervlaktewater vanaf mei 2004 tot eind 2005 4-wekelijks bemonsterd volgens het schema van het RIWA meetnet. In het oppervlaktewater van het Twentekanaal (Enschede) zijn in 2004 een beperkt aantal metingen uitgevoerd.

De voorbereiding en de isolatie van hormoonverstorende stoffen uit het water middels een vloeistof-vloeistof extractie met ethylacetaat is uitgevoerd door Kiwa Water Research. Er zijn dubbele hoeveelheden monster in bewerking genomen zodat het extract gesplitst kon worden voor de bepaling van de oestrogene activiteit door BioDetection Systems en de thyroïd hormoon activiteit door het RIKILT van de Landbouw Universiteit van Wageningen. De methoden voor de isolatie van oestrogene stoffen uit water en de bepaling van de oestrogene activiteit zijn beschreven in bijlage I.

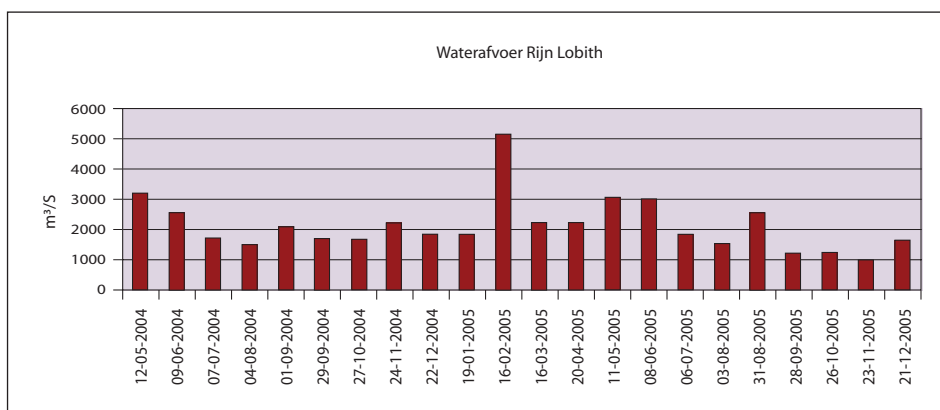
Activiteit

Oestrogene activiteit in oppervlaktewater

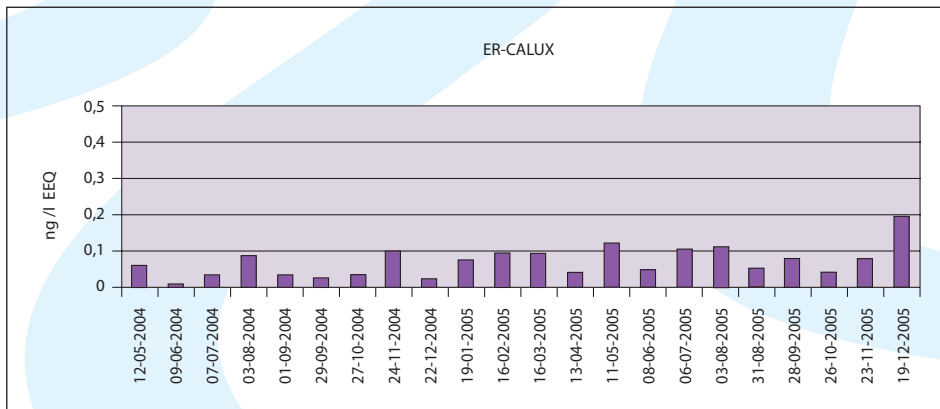
De resultaten van het onderzoek naar de oestrogene activiteit in 2004 en 2005 in oppervlaktewater van de Rijn bij Lobith en de bijbehorende gemeten gemiddelde dag afvoer zijn weergegeven in de figuren 1 en 2. De gemeten oestrogene activiteit in het Lekkanaal (Nieuwegein), het IJsselmeer (Andijk) en het Twentekanaal (Enschede) zijn weergegeven in de figuren 3, 4 en 5.



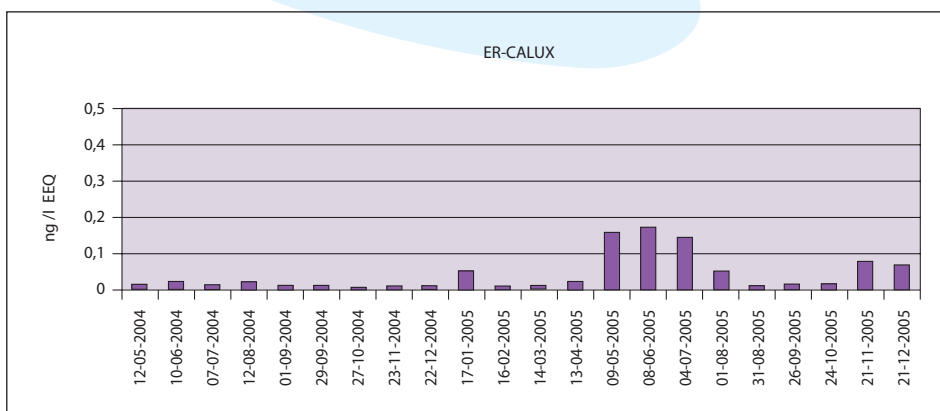
Figuur 1: Oestrogene activiteit in ng/l 17β-oestradiol equivalenten gemeten met de ER-CALUX bioassay in de Rijn bij Lobith in de periode mei 2004 tot december 2005.



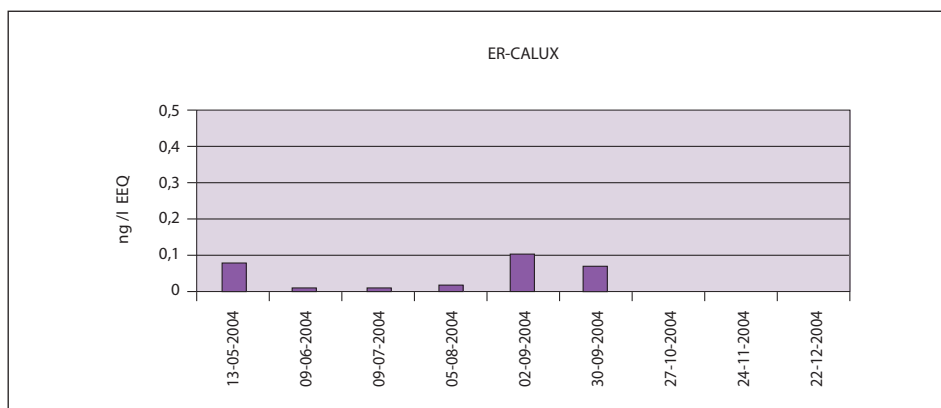
Figuur 2: Gemiddelde dagafvoer ten tijde van de bemonstering van de Rijn bij Lobith in de periode mei 2004 – december 2005.



Figuur 3: Oestrogene activiteit in ng/l 17β-oestradiol equivalenten gemeten met de ER-CALUX bioassay in het Lekkanaal (Nieuwegein) in de periode mei 2004 – december 2005.



Figuur 4: Oestrogene activiteit in ng/l 17β-oestradiol equivalenten gemeten met de ER-CALUX bioassay in het IJsselmeer (Andijk) in de periode mei 2004 – december 2005.



Figuur 5: Oestrogene activiteit in ng/l 17 β -oestradiol equivalenten gemeten met de ER-CALUX bioassay in het Twentekanaal (Enschede) in de periode mei 2004 – oktober 2004.

Uit de resultaten blijkt dat in de Rijn bij Lobtith de hoogste gehalten aan oestrogene activiteit gemeten worden, tot maximaal 0,5 ng/l 17 β -oestradiol equivalenten. Daarbij kon geen relatie met de afvoer worden vastgesteld. Op de innamepunten in Nieuwegein en Andijk zijn de gemeten concentraties lager, tot maximaal 0,2 ng/l 17 β -oestradiol equivalenten. Een mogelijke verklaring voor deze lagere gehalten kan de verdere afbraak van met name natuurlijke hormonen in het oppervlaktewater zijn.

Conclusie en aanbevelingen

5

Op grond van de gemeten oestrogene activiteit in oppervlaktewater, de nog optredende verwijdering in de zuivering en de risicobeoordeling kan geconcludeerd worden dat de gemeten oestrogene activiteit in het oppervlaktewater van de Rijn geen bedreiging voor de kwaliteit van het drinkwater vormt.

Op grond van de metingen in de periode mei 2004 tot december 2005 lijkt voortzetting van een regelmatige screening van de oestrogene activiteit niet noodzakelijk. Alleen wanneer er aanwijzingen zijn dat de belasting van het oppervlaktewater met oestrogene stoffen sterk toeneemt wordt aanbevolen aanvullende metingen te verrichten. Deze belasting kan toenemen als gevolg van hogere effluentlozingen van rioolwaterzuiveringsinstallaties bij een gelijke of lagere afvoer van de Rijn. Deze lozingen worden als een belangrijke bron voor oestrogene activiteit in oppervlaktewater beschouwd.

Literatuur

Bogers, M. (2004): Fathead Minnow, non spawning male fish assay with surface water and 17 α -ethynylestradiol. NOTOX-report, NOTOX/Kiwa, Nieuwegein.

Ghijssen, R.T. en W. Hoogenboezem (2000): Endocrine Disrupting Compounds in the Rhine and Meuse basin. Occurrence in surface water, process and drinking water. RIWA-report, RIWA, Amsterdam.

Legler, J., C.E. van den Brink, A. Brouwer, A.J. Murk, P.T. van der Saag, A.D. Vethaak, and B. van den Burg (1999): Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. Toxic. Sci. 48: 55-66.

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

Meulenberg, E.P. and G. Marchesini (2006): Thyroid hormone-like activity, Biosensor screening of surface water. RIWA-report ISBN-10: 90-6683-119-7, RIWA, Nieuwegein.

Meulenberg, E.P. (2006): Relevance of the assessment of thyroidal activity in the (water) environment: a deskresearch. RIWA-report ISBN-10: 90-6683-120-0, RIWA, Nieuwegein.

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

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

Siegers, W. (2002): Removal of Endocrine Disrupting Compounds during drinking water treatment: literature research. Kiwa report nr. BTO 2002.142 (c), Kiwa, Nieuwegein.

Siegers, W. en E. Beerendonk (2003): Removal of EDCs during drinking water treatment, Laboratory-scale study. Kiwa report nr. BTO 2002.149, Kiwa, Nieuwegein.

Vethaak, A.D., G.B.J. Rijs, S.M. Schrap, H. Ruiter, A. Gerritsen en J. Lahr (2002): Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands, occurrence, potency and biological effects. RIZA/RIKZ-report no. 2002.001, RIZA, Lelystad.

Bijlage 1

Bijlage 1: Uitvoering meting oestrogene activiteit

Monsterneming:

De bemonsteringen zijn op identieke wijze uitgevoerd door RIWA als onderdeel van de 4-wekelijkse bemonstering voor het RIWA -meetnet. Voor de bemonstering zijn speciaal gereinigde glazen flessen met een inhoud van 1 liter geleverd door Kiwa Water Research. Transport van de monsters naar Kiwa is eveneens verzorgd door RIWA-Rijn. Tijdens transport werden monsters niet gekoeld, na aankomst op het laboratorium zijn de monsters bij 4 °C bewaard gedurende maximaal 5 dagen tot de verdere opwerking.

Isolatie van oestrogene stoffen:

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

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

De extractie van 1 liter van het watermonster is achtereenvolgens uitgevoerd met 1 x 400 en 2 x 100 ml ethylacetaat. Het gecombineerde extract is via indampen geconcentreerd en kwantitatief overgebracht in 80 µl DMSO (dimethylsulfoxide) in op gewicht gekalibreerde puntbuisjes. De helft daarvan is overgebracht in een puntbuisje voor bepaling van thyroid hormoon activiteit bij het RIKILT van de Landbouw Universiteit Wageningen.

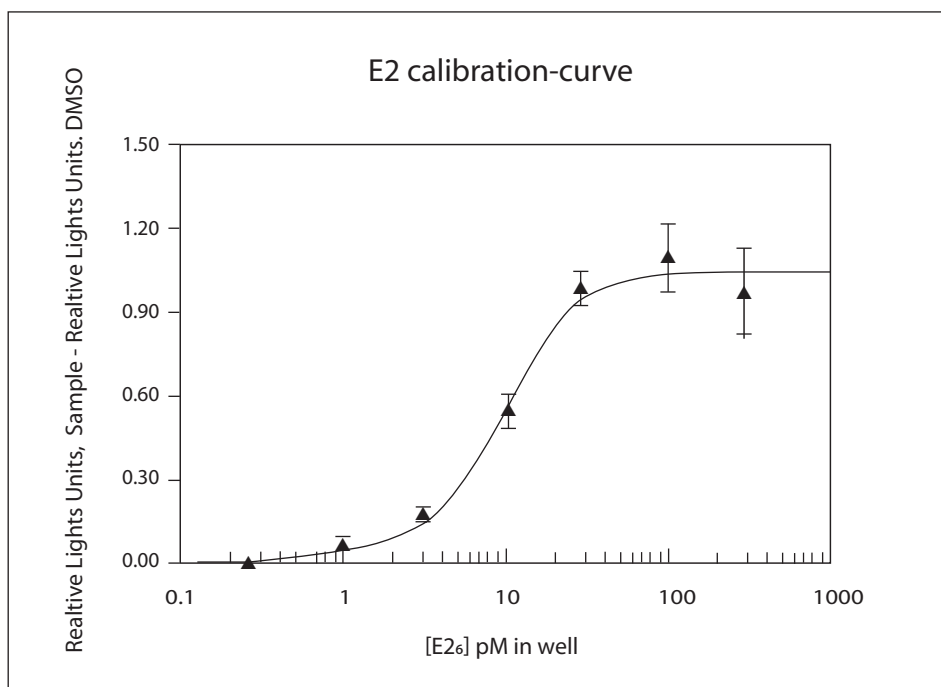
Meting van oestrogene activiteit:

De bepaling van de oestrogene activiteit in de extracten van de watermonsters is uitgevoerd door BioDetection Systems B.V. (BDS) met behulp van de ER-CALUX® methode. Deze methode is binnen het BTO in samenwerking tussen BDS en Kiwa WR gevalideerd voor metingen in o.a. drinkwater. Daarvoor zijn in drievoud metingen uitgevoerd in het toegepaste extractiemiddel en oplosmiddel, ook na concentrering, in 'blanco' water en in 'blanco' water met addities van 0,3 en 3 ng/l 17β-oestradiol [Puijker, 2004].

De recovery was altijd meer dan 80 %. Meetwaarden voor blanco-bepalingen waren altijd (omgerekend) kleiner dan 0,02 ng/l.

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

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



Figuur 6: Calibratiecurve van ER-CALUX® bioassay voor 17β -oestradiol.

Colofon

Auteurs:	L.M. Puijker
Projectmanager:	C.J. de Hoogh
Kwaliteitsborger(s):	A.C. Hogenboom
Projectnummer:	(KIWA) 30.6188.040
Uitgever:	RIWA-Rijn Vereniging van Rivierwaterbedrijven
Ontwerp:	Meyson Communicatie, Amsterdam
Druk:	ATP Digitale Media
ISBN/EAN:	978-90-6683-123-0

7

Notities

Notities



Groenendael 6

3439 LV Nieuwegein

T +31 (0)30 600 90 30

F +31 (0)30 600 90 39

E riwa@riwa.org

W www.riwa.org