



# **LITERATUURONDERZOEK NITRATEN EN NITRIETEN**

**Door**

**De Bont, R., Van Larebeke, N.**

**2003**

Luik 1: Beleidsondersteuning

## NITRAAT EN NITRIET

### Inleiding:

De voornaamste bronnen van nitraten in onze voeding zijn groenten, fruit, drinkwater, bereide vleeswaren en kazen. Omdat de meeste van deze voedingsmiddelen een belangrijke bijdrage leveren tot een gezond voedingspatroon, zijn een analyse van het gezondheidsrisico van nitraten op hun plaats.

Nitraat ( $\text{NO}_3^-$ ) is op zich niet schadelijk en wordt voor een groot deel via de nieren uitgescheiden. Het wordt eveneens uitgescheiden via het zweet en ook borstmelk bevat nitraat. De gemiddelde concentratie nitraat in zweet is 2.5 mg/l (Weller *et al.*, 1996), wat overeenkomt met een verlies van ongeveer 2.5 mg/dag. In borstmelk is de hoeveelheid nitraat na de vijfde dag na de bevalling 1.4 mg/l (Green *et al.*, 1982) of volgens Dusduker *et al.* (1996) 4.9 mg/l. Door borstvoeding verliest een moeder dus ongeveer 1-3.6 mg/dag. Slechts een klein percentage nitraat wordt in de mondholte door bacteriën omgezet in het schadelijke nitriet. Bovendien wordt nitriet toegevoegd als bewaarmiddel aan vlees en vis en om de groei van de sporenvormende bacterie *Clostridium botulinum*, die dodelijk is, te voorkomen. Er wordt geschat dat voor volwassenen 25% van het ingeslikte nitraat kan worden teruggevonden in het speeksel na de absorptie ervan ter hoogte van de bovenste dunne darm en het transport ervan in het plasma. 20% van dit nitraat wordt in de mond gereduceerd tot nitriet dus uiteindelijk wordt er ongeveer 5% van het nitraat dat werd opgenomen door voedsel gevonden in de vorm van nitriet in het speeksel (Spiegelhalter, 1995). Bij zuigelingen en personen met een maagaandoening kan dit percentage hoger zijn. Een deel van het nitriet wordt in de zure maag afgebroken tot NO. Het kan er ook reageren met amines en nitrosamines vormen. Deze zijn sterk carcinogeen.

### Bronnen:

Nitraat komt voor in water, bereid vlees, kaas en in verschillende soorten groenten en vruchten. Water met nitraatconcentraties onder de standaard is maar verantwoordelijk voor een te verwaarlozen percentage van nitraatopname. 80 tot 90% van het nitraat dat door mensen geconsumeerd wordt is afkomstig van groenten. Vleesproducten voorzien in minder dan 10% van het nitraat in het dieet maar wel in 60 tot 90% van het geconsumeerde nitriet. Dit komt doordat nitriet aan vlees en vis wordt toegevoegd als voedseladditief.

Nitraten komen als natuurlijke bestanddelen voor in groenten en fruit waar zij een belangrijke rol spelen in de stikstofcyclus. Planten gebruiken nitraten uit de bodem als minerale stikstofbron om eiwitten aan te maken die nodig zijn voor hun groei. De volgende planten bevatten veel nitraat: andijvie, bleekselderij, Chinese kool, koolrabi, paksoi, postelein, raapstelen en rode bieten. Groenten die weinig nitraat bevatten zijn: asperges, aubergine, bloemkool, boerenkool, broccoli, courgette, doperwten, knolselderij, komkommer, paprika, prei, rodekool, savooikool, schorseneren, snijbonen, sperziebonen, spruiten, tomaten, tuinbonen, uien, witloof, witte kool en wortelen. Verschillende factoren bepalen het nitraatgehalte in groenten:

- De bemesting: als gevolg van een te intensieve bemesting nemen planten meer nitraat op dan ze in eiwitten kunnen omzetten en stijgt hun nitraatgehalte. Bovendien blijft een deel van het nitraat achter in de bodem waar het verder doordringt tot in het grondwater, afspoelt naar het oppervlaktewater of ter beschikking blijft van een volgende teelt.
- De lichtintensiteit: planten zetten nitraat om in eiwitten onder invloed van licht. Dit heeft tot gevolg dat het nitraatgehalte sterk kan variëren naargelang het seizoen. Omdat er in de winter minder licht is, bevatten wintergroenten meer nitraat dan zomergroenten.
- De groente- of fruitsoort: bepaalde groenten, in het bijzonder bladgroenten, slaan meer nitraat op in het eetbare gedeelte dan andere. Sommige groenten bevatten meer dan 3000 mg nitraat/kg terwijl ander minder dan 100 mg nitraat/kg bevatten.

- De variëteit: binnen een bepaalde groente- of fruitsoort kunnen verschillende variëteiten sterk uiteenlopende waarden vertonen. Zo bevat bijvoorbeeld Romeinse sla een veel lager nitraatgehalte dan kropsla.

Nitraat komt ook voor in vlees en vis als voedseladditief en in leidingwater als gevolg van een contaminatie van de watervoorraden. Vooral op zandgronden en in gebieden met intensieve veehouderij wordt vaak veel meer mest op de bodem gebracht dan landbouwkundig vereist. Daardoor is er meer nitraat in de bodem aanwezig dan door de gewassen kan opgenomen worden. Nitraat in grondwater is ook een indicator voor ander contaminanten zoals bacteriën en pesticiden.

Stikstofbestanddelen worden in de lucht gevormd door bliksem of worden erin vrijgesteld door industriële processen, motorvoertuigen en intensieve landbouw. Nitraat is in de lucht aanwezig in de vorm van nitreerzuur, anorganische aërosolen, nitraatradicalen en organische gassen of aërosolen. Ze worden verwijderd door natte en droge depositie (WHO, 1998a).

Nitraat wordt ook endogeen gevormd. In ongeveer alle cellen van het lichaam treedt oxidatie van het aminozuur L-arginine op. Deze oxidatie zet arginine om in L-citrulline en stelt een molecule stikstofoxide (NO)vrij. Dit NO geeft aanleiding tot nitraat en nitriet. De oxidatiereactie wordt gekatalyseerd door een enzyme namelijk het NO-synthase of NOS (l'Hirondel J & l'Hirondel JL, 2001).

### **Nitraat in lichaamsvloeistoffen:**

---

Nitraat is terug te vinden in alle lichaamsvloeistoffen. De productie van stikstofoxide speelt er immers een belangrijke rol in verschillende fysiologische processen:

- Een toename van de vorming van stikstofoxide kan bijdragen tot vasodilatatie gedurende fysieke inspanningen (Shen *et al.*, 1995).

- Bij mannen met normaal zaad zijn de nitraat- en nitriet- ( $\text{NO}_x$ )concentraties significant hoger in het zaad dan in het plasma. Dit impliceert een rol van stikstofoxide in spermafunctie (Battaglia *et al.*, 2000).
- Bij vrouwen worden er variaties in circulerende  $\text{NO}_x$ -concentraties waargenomen tijdens de menstruele cyclus en na de menopauze. Ze staan direct in correlatie met de serum-oestradiolconcentratie. De concentraties  $\text{NO}_x$  stijgen met de ontwikkeling van de eikel en dalen binnen de 12 uur na de ovulatie terug naar zijn normaal niveau (Cicineli *et al.*, 1996). De concentraties zijn laag in de post-menopauzale periode (Rosselli *et al.*, 1995).
- De concentratie nitraat in borstmelk is de eerste 5 dagen na de geboorte hoger dan die van het plasma. Het is waarschijnlijk dat stikstofoxide in de borst zelf wordt gesynthetiseerd. Het kan lactatie trigeren of het kan betrokken zijn bij het aanpassen van de borst aan borstvoeding (Iizuka *et al.*, 1997, 1998, 1999).

Vele pathologische omstandigheden zijn geassocieerd met een toename van de concentratie van nitraat in plasma. Deze toename blijft behouden gedurende heel het ziekteverloop: van enkele dagen bij bijvoorbeeld gastroenteritis tot enkele jaren bij ernstigere aandoeningen. De concentratie nitraat in plasma van mensen met maagkanker blijkt hoger te zijn dan bij gezonde mensen (Bakan *et al.*, 2002). Ook bij kinderen met infectueuze diarree bleek de nitraatconcentratie in het plasma verhoogd te zijn (Charmandari *et al.*, 2001) alsook bij mensen die lijden aan gastroenteritis (Dykhuisen *et al.*, 1995), pulmonaire hypertensie (Ikemoto *et al.*, 2002), hepatitis C (Sakai *et al.*, ) en zelfs depressie (Suzuki *et al.*, 2001).

### **Dagelijks aanvaardbare inname en normen:**

---

De hoeveelheid nitraat wordt op 2 manieren uitgedrukt. Ten eerste als de concentratie nitraat in mg/l en ten tweede als de concentratie stikstof in mg/l. 50 mg nitraat komt overeen met 11,3 mg stikstof en 10 mg stikstof komt overeen met 44.3 mg nitraat.

#### 1.1 Aanvaardbare dagelijkse inname (ADI):

De FAO/WHO hebben een 'Joint Expert Committee on Food Additives' (JECFA) dat aanvaardbare dagelijkse innames adviseert. De EU heeft een 'Scientific Committee for Food (SCF) dat ook ADI's vastlegt en in de USA berekent de EPA de zogenaamde referentiedosis die overeenkomt met de ADI.

De huidige ADI voor nitraat bij mensen is volgens zowel de JEFCA als de SCF 3.7 mg/kg lichaamsgewicht/dag. In 1990 stelde de EPA een referentiedosis (RfD) vast voor nitraat en dit op basis van het risico op methaemoglobinemia bij kinderen. Deze RfD is twee maal zo groot als de FAO/WHO en de EU ADI voor nitraat nl. 7.1 mg/kg lichaamsgewicht/dag. De gemiddelde dagelijkse inname van volwassenen wordt geschat op 110 mg NO<sub>3</sub>/dag of 1.83 mg NO<sub>3</sub>/kg lichaamsgewicht/dag (RIVM, 1989).

Door de FAO/WHO werd ook een ADI bepaald voor nitriet: 0.06 mg/kg lichaamsgewicht/dag. De gemiddelde dagelijkse menselijke inname van nitriet wordt geschat op 2.3 mg NO<sub>2</sub>/dag of 0.038 mg/kg lichaamsgewicht/dag (RIVM, 1989).

### **1. Maximum nitraatconcentratie in drinkwater:**

Europa hanteert voor drinkwater een grenswaarde van 50 mg/l. In 15 Europese landen wordt tussen 0.5 en 10% van de bevolking blootgesteld aan nitraatconcentraties groter dan 50 mg/l (WHO, 1985, ECETOC, 1988). Dit komt overeen met ongeveer 10 miljoen mensen. Vooral waterputten voor individueel gebruik zijn de boosdoeners. In Amerika is de federale standaard voor nitraat in water 10 mg stikstof/l en 45 mg/l nitraat als ook het zuurstof wordt gemeten.

Voor nitriet is de richtwaarde bepaald op 3 mg/l (WHO, 1998b). Nitriet concentraties in Nederland liggen meestal onder 0.1 mg/l. In 1993 werd een maximum van 0.21 mg/l gedetecteerd (RIVM, 1993).

### **2. Maximum nitraatconcentraties in voedsel:**

- Groenten:

De EU heeft maximum nitraatconcentraties in spinazie en sla vastgelegd: ngl. het geval en het seizoen tussen 2000 en 4500 mg nitraat/kg.

Het valt op dat de normen voor bepaalde groenten in de zomer strenger zijn dan in de winter. De reden hiervoor ligt in het feit dat het nitraatgehalte in zomergroenten lager is dan in wintergroenten.

- **Vlees en vis:**

Het voordeel van de toevoeging van nitraat en nitriet is dat nitriet microbiële proliferatie en bederf voorkomt. Nitriet beschermt vooral tegen de bacterie *Clostridium botulinum*. Deze bacterie produceert een virulent toxine en kan leiden tot de dood. De EU (EU, 1995a) standaardiseerde het gebruik van nitraat als voedseladditief: afhankelijk van het voedingsmiddel tussen 36 en 182 mg/kg.

### **3. Letale dosis:**

De acute orale toxiciteit van nitraat voor laboratoriumdieren is laag tot gemiddeld. LD50-waarden van 1600-9000 mg natriumnitraat per kg lichaamsgewicht werden teruggevonden bij muizen, ratten en konijnen (WHO, 1998a). Herkauwers zijn gevoeliger voor de effecten van nitraat als resultaat van de nitraatreductie in het rumen (pensmaag); de LD50 voor koeien was 450 mg natriumnitraat per kg lichaamsgewicht. Nitriet is toxischer dan nitraat: LD50-waarden van 85-220 mg natriumnitraat per kg lichaamsgewicht werden gerapporteerd bij muizen en ratten (WHO, 1996).

De orale letale dosis voor mensen ligt tussen 33 en 250 mg nitriet per kg lichaamsgewicht. De laagste dosissen zijn van toepassing voor kinderen en ouderen. Toxische dosissen die aanleiding geven tot methemoglobinemia gaan van 0.4 tot 200 mg/kg lichaamsgewicht (WHO, 1996).

### **Biologische- en gezondheidseffecten:**

---

Het gebruik van nitraat heeft zowel positieve als negatieve effecten. In sommige gevallen hebben nitraat en nitriet een positieve werking. Ze worden aan bepaalde voedingsmiddelen toegevoegd als additief. Nitraat (E251 en E252) en nitriet (E249 en E250) worden gebruikt in bereide vleeswaren en in halfharde en harde kaassoorten ter

preventie van de ontwikkeling van de bacterie *Clostridium botulinum*. Deze bacterie is verantwoordelijk voor botulisme, een vergiftiging die dodelijk kan zijn. Het gebruik van deze additieven is in bovengenoemde gevallen aanvaardbaar, op voorwaarde dat de maximaal toegestane dosis wordt gerespecteerd en ze niet louter wordt toegediend met de bedoeling de kleur of de smaak van deze voedingsproducten te beïnvloeden. Nitraat zou ook nuttig zijn in het voorkomen en bestrijden van infecties en het bestrijden van hoge bloeddruk en andere cardiovasculaire aandoeningen. Daarentegen staat dat meerdere belangrijke potentieel gevaarlijke biologische effecten alsook gezondheidsschadende effecten beschreven werden (dosissen staan aangegeven in de tabellen).

De twee belangrijkste grieven tegen nitraat in het voedsel zijn:

- Het risico op methemoglobinemia bij kinderen.
- Het bevorderen van de endogene vorming van carcinogene verbindingen.

Verder onderzocht men een reeks andere mogelijk nadelige effecten:

- Groei-inhibitie
- Effecten op de reproductie.
- Genotoxiciteit.
- Mutageniciteit.
- Een tendens tot vergroting van de schildklier.
- Een toegenomen incidentie van diabetes bij kinderen.

### 1. **Anti-infectueuze effecten:**

- De effecten in de mond en het spijsverteringsstelsel:

Het anti-infectueuze effect van nitraat in het voedsel in de mond en het spijsverteringsstelsel is te wijten aan de secretie van nitraat door de speekselkieren in het speeksel en de omzetting ervan in nitriet. Het is alom geweten dat nitriet in zure omstandigheden bacteriën doodt. Zure omstandigheden worden teruggevonden in de mond en in de maag. Nitriet doet het microbiocidale effect van zure omstandigheden toenemen. Het precieze moleculaire mechanisme hiervoor is echter niet gekend. Nitriet is onstabiel in zure omstandigheden en wordt omgezet tot stikstofdioxide dat een mogelijk desinfecterend agens is (Duncan *et al.*, 1995; Benjamin & McKnight, 1999).

De reactie van stikstofdioxide met superoxide geeft aanleiding tot peroxynitriet (ONOO<sup>-</sup>) (Beckman & Koppenol, 1996; Muijsers *et al.*, 1997). Peroxynitriet is een potent microbiocidaal bestanddeel, toxisch in vitro voor *E. coli* (Brunelli *et al.*, 1995)

\_ Antifungaal effect:

De schimmel *Candida albicans* behoudt zijn levensvatbaarheid wanneer het gedurende een uur geïncubeerd wordt in zuur bij pH3 maar wordt gedeeltelijk vernietigd wanneer 11.5 mg nitriet/l wordt toegevoegd (Benjamin *et al.*, 1994). Deze experimentele condities zijn vergelijkbaar met de fysiologische condities in de mond.

\_ Antibacterieel effect:

Het antibacteriële effect van nitriet in zuur milieu werd experimenteel nagegaan op 5 enterobacteria: *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* en *Escherichia coli*. In zuur medium alleen bleven de bacteriën groeien terwijl de additie van nitriet de bacteriën doodde (Dykhuisen *et al.*, 1996).

- Anti-infectieuze effecten in andere organen:

\_ Het huidoppervlak:

Zweet bevat nitraat en nitriet bij gemiddelde concentraties van 2.5 mg nitraat/l en 0.15 mg nitriet/l. Commensalen van de huid zoals *Staphylococcus epidermidis* en *Staphylococcus aureus* bevatten nitraatreductase-enzymen die hun toelaten om nitraat te reduceren tot nitriet. De normale huidpH is licht zuur, tussen 5 en 6.5 (Weller *et al.*, 1996). De condities op de huid zijn dus geschikt voor het anti-infectieuze effect van nitriet. Dit effect werd gedemonstreerd in vitro op verschillende huidcommensalen en pathogenen (Archer DL, 2002). Of dit nu in vivo ook zo is vereist nog onderzoek (l'Hirondel & l'Hirondel, 2001).

\_ Het ademhalingsstelsel:

Bij gezonde mensen bevat secretie van de luchtwegen nitraat bij gemiddelde concentraties van 8.9 mg/l. Ontstekingen kunnen geassocieerd zijn met een lage pH (Robbins & Rennard, 1997). Het zou dus kunnen zijn dat nitraat in luchtwegsecretie kan bijdragen tot de preventie van luchtwegontstekingen.

## **2. Het risico op methemoglobinemia bij kinderen:**

Nitriet reageert met ijzer(II), wat ijzer(III) in hemoglobine oplevert. Hierdoor wordt methemoglobine gevormd. Als gevolg hiervan wordt het zuurstoftransport bemoeilijkt.

Kinderen zijn hier vatbaarder voor omdat:

- De oxidatie van hemoglobine tot methemoglobine gebeurt continu in de cel. Methemoglobine-reductase reduceert methemoglobine terug tot hemoglobine. Bij kinderen heeft de methemoglobine-reductase zijn volledige activiteit echter nog niet bereikt.
- Baby's hebben nog een grote proportie foetale hemoglobine in hun bloed. Deze foetale hemoglobine wordt gemakkelijker geoxideerd tot methemoglobine.

Methemoglobinemia kan ontstaan door opname van nitraat en/of nitriet via voedsel of drinkwater of als een gevolg van enteritis. Methemoglobinemia te wijten aan nitraat in putwater komt bijna niet meer voor in de VS en in West-Europa maar nog wel in Roemenië, Albanië, Hongarije en Slovakije (WHO, 2001). De hypothese als zou de aandoening te wijten zijn aan de hoge nitraatconcentraties in putwater, wat dan door de kinderen kan worden omgezet in nitriet, kan in twijfel worden getrokken. De echte boosdoeners zouden bacteriën zijn. Nitraat is een afbraakproduct van organisch afval en verhoogde nitraatconcentraties zijn dus geassocieerd met het aantal bacteriën in vervuild putwater. Deze kunnen nitraat omzetten in nitriet of ze kunnen enteritis veroorzaken, twee oorzaken voor het ontstaan van methemoglobinemia.

Zeman CL *et al.* (2002) voerden een case-control studie uit die de risicofactoren onderzocht op methemoglobinemia bij 71 Roemeense kinderen. Bij deze populatie bleek methemoglobinemia geassocieerd te zijn met nitraat/nitriet-blootstelling via de voeding ( $p=0.0318$ ). Borstvoeding bleek kinderen jonger dan 6 maanden bescherming te bieden ( $p=0.0244$ ).

Knobeloch L *et al.* (2000) onderzochten twee gevallen van methemoglobinemia. Beide kinderen werden ziek na het eten van babyvoeding, dat werd bereid met putwater. Waterstalen werden genomen en de nitraatconcentraties bedroegen 22.9 en 27.4 mg/l.

## **3. Het risico op kanker:**

### 3.1 Vorming van kankerverwekkende N-nitrosoverbindingen:

Nitriet dat via het speeksel in de maag terechtkomt, wordt reactief omwille van de zure condities die er daar heersen. Het kan afgebroken worden tot stikstofoxide, het kan reageren met vitamine C (ascorbic acid) tot stikstofoxide of het kan reageren met verschillende organische bestanddelen in voedsel en in uitscheidingsproducten van de maag om zo nitroso-compounds (NOc's) te vormen. Voorbeelden hiervan zijn aniline, 2-aminofluoreen, 1-aminoanthraceen en -aminopyreen (Kato *et al.*, 1991). Amines en amides komen voor in voedsel en in lichaamsmetabolieten. Wanneer ze reageren met nitriet vormen ze de carcinogene N-nitroso-compounds, nitrosamides en nitrosamines. Het is bekend dat carcinogene nitrosamines in het lichaam kunnen gevormd worden wanneer nitraat en amines samen worden toegediend (Vermeer *et al.*, 1998). De Nitrosamides worden gevormd onder zeer zure omstandigheden, ze zijn onstabiel en ze schaden alleen het orgaan waar ze gevormd worden nl. de maag (l'Hirondel & l'Hirondel, 2001). Nitrosamines vereisen metabolische activatie om onstabiel en reactief te worden. Het is deze vorm die DNA schaadt, mutaties veroorzaakt en kan leiden tot kanker. Deze vorming van N-nitroso-compounds wordt gekatalyseerd door thiocynaat (een bestanddeel van planten van de koolfamilie. Het is ook een lichaamsmetaboliet), terwijl vitamine C en E de reactie door competitie inhiberen. Endogene vorming van N-nitroso verbindingen gebeurt op verschillende plaatsen in het lichaam: nitrosatie in de mondholte en de maag, de reactie van stikstofoxide in de longen en reacties gemedieerd door bacteriën en macrofagen in geïnfecteerde of ontstoken organen, zoals de urineblaas. Tricker (1997) onderzocht het relatieve belang van exogene en endogene bronnen. Inname van NOc's is vooral te wijten aan voedingsmiddelen zoals gerookt vlees, gedroogde en gerookte vis, seafood en gerookte kaas. Ook tabaksproducten en beroepsmatige blootstelling dragen bij. Het bleek dat er veel meer N-nitrosamines worden uitgescheiden via de urine en de faeces dan dat er worden opgenomen en dus kwam Tricker tot de conclusie dat 45-75% van de NOc's endogeen gevormd worden.

### 3.2 N-nitrosoverbindingen en kanker:

N-nitrosocompounds spelen een rol in de etiologie van verschillende menselijke kankers. Fruit en groenten blijken een protectieve rol te spelen want vitamine C verlaagt de bodyburden van intragastrisch gevormde NOC's (Bartsch *et al.*, 1990). Verschillende N-nitrosocompounds, aanwezig in voedsel en drank of gevormd in de maag, zijn alkylerende agentia. Palli D *et al.* (2001) bepaalden de hoeveelheid O6-alkylguanines in maagweefsel (tumor en mucosa) van 24 patiënten met maagkanker. O6-propylguanidine en O6-methylguanidine waren de adducten die het frequentst werden gedetecteerd in mucosa en in tumorweefsel, respectievelijk. Gemiddelde nitraatname via het voedsel was significant hoger bij patiënten met detecteerbare niveaus van adducten in de tumorstalen ( $p = 0.03$ ). De geschatte inname van dimethylamine en N-nitrosodimethylamine bleek gecorreleerd met het totale aantal O6-alkylguanines in mucosa. Experimenten op dieren met nitrosamines indiceren dat hun carcinogene effecten orgaan-specifiek zijn. Een case-control studie van 746 patiënten met maagkanker en 2053 controls toonde een associatie tussen de inname van N-nitrosodimethylamine en maagkanker (La Vecchia *et al.*, 1995). Mirvish (1995) concludeerde in zijn review artikel dat NOC-blootstelling waarschijnlijk verantwoordelijk is voor een significant aantal kankers. Deze blootstelling zou gereduceerd moeten worden door de inname van NOC's te limiteren en door de in vivo nitrosatie te inhiberen.

### 3.3 Dierproeven:

Lange termijn experimenten met muizen en ratten die nitraat of nitriet in hun drinkwater of voedsel kregen toegediend gaven geen bewijs voor toegenomen kankerincidentie (WHO, 1996). Toch zijn er belangrijke waarnemingen die op een kankerrisico wijzen. Mirvish *et al.* (1980) diende Wistar ratten van beide sexen 3000 mg/l natriumnitraat toe in drinkwater: 5 dagen per week gedurende 1000 weken. In 8/45 van de behandelde ratten werden er papillomas van de voormaag waargenomen in vergelijking met 2/91 controle-ratten. Maekawa *et al.* (1982) voederden gedurende 2 jaar 300 ratten met een dieet dat 2.5% en 5% natriumnitraat bevatte, wat overeenkomt met een hoge dagelijkse dosis van 200 en 460 mg nitraat. Ze vonden geen significante toename van de incidentie van kanker.

### 3.4 Waarnemingen bij mensen:

Het grote aantal epidemiologische studies bij mensen konden geen link aantonen tussen nitraatopname en maagkankerincidentie of -mortaliteit (l'Hirondel J & l'Hirondel JH, 2001). Nitrietblootstelling bleek vaak wel geassocieerd met maagkanker (Van Loon *et al.*, 1998; Buiatti *et al.*, 1990). Deze studies zijn onder te verdelen in drie categorieën (een overzicht van deze studies is te vinden in tabellen 1, 2 en 3 in de bijlage):

- Geografische correlatiestudies:

Deze willen nagaan of er een statistische link bestaat tussen de incidentie van sterfte door maagkanker in een geografische zone, en de nitraatconcentratie in drinkwater, dieet, speeksel of urine. Over het algemeen konden ze geen connectie aantonen tussen nitraatopname en kanker.

- Cohortstudies:

Deze onderzoeken de incidentie van maagkanker bij mensen die werken met meststoffen vergeleken met de normale populatie. Geen van allen vond een toegenomen risico op maagkanker.

- Case-control studies:

Deze vergelijken nitraatblootstelling door drinkwater en voedsel bij een groot aantal patiënten die lijden aan maagkanker met die van controle individuen aangepast aan leeftijd, sexe en soms gebied van afkomst.

Een 30-tal andere epidemiologische studies evalueerden het effect van nitraatblootstelling op andere menselijke kankers (oesophageale kanker, kanker aan de urinewegen, leverkanker, colon/rectum kanker, hersenkanker, prostaatkanker, Non-Hodgkin's lymphoma, ...). Enkele ervan vonden een significant positieve associatie (Yang, 1980; Morales *et al.*, 1993, 1995; Preston-Martin, S. *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1996; Barrett *et al.*, 1998), enkele vonden een significant negatieve associatie (Rogers *et al.*, 1995) maar de overgrote meerderheid kwam tot het besluit dat er geen associatie bestaat tussen de nitraatblootstelling en kanker (Law *et al.*, 1999; Steindorf *et al.*, 1994; Zandjani *et al.*, 1994; Fandrem *et al.*, 1995; Boeing *et al.*, 1993; Leclerc *et al.*, 1991)(tabel 4 in bijlage).

De vele epidemiologische studies werden in Europa geëvolueerd door het ‘Scientific Committee of Food’ (EU, 1995b) en in de VS door het ‘Subcommittee on Nitrate and Nitrite in Drinking Water’ (NRC, 1995). Ze kwamen tot een vergelijkbare conclusie:

**Epidemiologische studies konden geen associatie aantonen tussen nitraatblootstelling en risico op kanker.**

Hoewel een verhoogde inname van nitraat aanleiding geeft tot een verhoogde inwendige blootstelling aan kankerverwekkende N-nitraatverbindingen, is het nog niet duidelijk in welke mate nitrosatie onder normale voedingsomstandigheden een risico voor de volksgezondheid vormt (WHO, 1996, p 282).

### 3.5 Nitraat in voedsel en maagkanker:

Van de epidemiologische studies bij mensen weergegeven in tabel 1 tot 3 zijn er 9 die een significant positieve associatie aangeven, 9 die een significant negatief effect aantonen en 18 die geen associatie vonden. Van die laatste 18 bleken er 4 een negatieve associatie aan te tonen en 3 een positieve. Epidemiologische studies konden dus geen duidelijke associatie aantonen tussen de blootstelling aan nitraten en de incidentie van maagkanker. Dit druist in tegen het feit dat nitraten via de vorming van nitrieten in de maag aanleiding kunnen geven tot de kankerverwekkende N-nitrosoverbindingen. Men zou kunnen aannemen dat er cofactoren bestaan die de omzetting van nitraat tot nitrosamines kunnen promoten of inhiberen. Groenten bijvoorbeeld, bevatten veel nitraat maar ze voorzien ook in ascorbinezuur, een inhibitor van endogene nitrosatie (Knight *et al.*, 1990).

Een ander aspect van nitriet en maagkanker is *H. pylori* infectie. De bacterie kan de gastrische zuursecretie op verschillende manieren beïnvloeden. Naargelang die invloed kunnen er zich verschillende klinische uitkomsten van de infectie voordoen. In patiënten waarbij de infectie verlaagde zuurproductie en dus hypochlorhydria tot gevolg heeft wordt er een toegenomen risico op maagkanker geobserveerd. De hypochlorhydria speelt waarschijnlijk een belangrijke rol in het carcinogene proces omdat hoge intragastrische pH de nitrietconcentratie in de maag doet stijgen (McColl *et al.*, 1997). Het is ook mogelijk dat nitraat naast een kankerverwekkend effect ook een protectief effect heeft in de maag. Zo blijkt dat stikstofoxide, dat kan gevormd worden uit nitraat in de zure

omstandigheden van de maag, de morfologie van *Helicobacter pylori* kan veranderen. Deze bacterie kan op lange termijn aanleiding geven tot maagkanker (Aruin, 1994; Shi *et al.*, 1997). Stikstofoxide kan *H. pylori* van de spirale vorm doen overgaan in de coccoïde vorm. De coccoïde vormen repliceren niet en kunnen in tegenstelling tot de spirale vorm geen interleukine-8-vrijstelling door de epitheelcellen van de maag induceren waardoor er geen inflammatoire respons optreedt (Cole *et al.*, 1999). Het is echter onduidelijk of dit dan een protectief effect heeft tegen maagkanker want deze minder schadelijke coccoïde vorm kan echter overleven in zware omstandigheden zoals een verhoogde pH en antibiotica en uit onderzoek is gebleken dat de mucosa aan de randen van adenocarcinome tumoren vooral coccoïde vormen bevatten (Chan *et al.*, 1994). De hypothese dat nitraat zou leiden tot maagkanker kan dus in twijfel worden getrokken. Er werd door de WHO (1985) een tekort genoteerd aan bewijs voor een positieve link tussen blootstelling aan exogeen nitraat en menselijke kankers.

#### **4. Andere nadelige effecten:**

##### 4.1 Groei:

Het enige geobserveerde effect van nitraat op ratten na orale toediening van gedurende 2 jaar was groei-inhibitie. Dit effect werd geobserveerd bij concentraties van 5% natriumnitraat en hoger. De NOEL (no observable effect level : de hoogste dosis waarbij geen observeerbaar effect optreedt) was 1%, wat overeenkomt met 370 mg nitraat per kg lichaamsgewicht per dag (WHO, 1996).

##### 4.2 Reproductie:

Een epidemiologische studie in Australië (Dorsch *et al.*, 1984 a, b) rapporteerde dat de incidentie van geboortedefecten groter was bij baby's van moeders die grondwater met nitraat consumeerden dan bij moeders die regenwater gebruikten. Deze studie is echter controversieel omdat de concentratie nitraat in het grondwater laag was (in meer dan 95% van de gevallen lager dan 15 mg/l) en omdat de additionele hoeveelheid nitraat opgenomen via het drinkwater te klein was in vergelijking met de hoeveelheid

geconsumeerd via andere voedselbronnen om het geobserveerde verschil in geboortedefecten te veroorzaken (Black, 1989).

In Canada vonden Arbuckle *et al.* (1988) geen significante link tussen de incidentie van geboortedefecten van het centrale zenuwstelsel en de concentratie nitraat in drinkwater. Aschengrau *et al.* (1989) beweert zelfs dat kleine hoeveelheden nitraat in het drinkwater de frequentie van spontane abortie's doet afnemen. De maximum hoeveelheid nitraat in deze studie overschreed echter de 5 mg/l niet.

Het reproductieve gedrag van cavia's werd enkel aangetast bij zeer hoge nitraatconcentraties (30000 mg kaliumnitraat per liter water dus 1130 mg KNO<sub>3</sub>/kg lichaamsgewicht/dag gedurende 143-204 dagen); de NOEL was 10000 mg/l (507 mg KNO<sub>3</sub>/kg lichaamsgewicht/dag) (WHO, 1996). Bij konijnen beïnvloeden dosissen van 250 of 500 mg nitraat per liter toegediend gedurende 22 weken het reproductieve succes niet. Bij schapen en vee werden geen abortie's waargenomen bij dosissen die geen ernstige methemoglobinemia veroorzaken (WHO, 1996).

De bewering dat nitraatinnname een risico inhoud voor congenitale malformaties lijkt dus onvoldoende gefundeerd.

#### 4.3 Genotoxiciteit en mutageniciteit:

Toevoeging van NaNO<sub>2</sub> aan drinkwater bij een concentratie van 1250 mg/l aan niet-zwangere en zwangere ratten induceerde chromosomale aberraties in het beenmerg van alle adulten en in de lever van transplacentaal blootgesteld embryo's (El Nahas *et al.*, 1984).

Luca *et al.* (1985) rapporteerden een significante toename van aberrante metafases in beenmergcellen van ratten behandeld met hoge dosissen natriumnitraat (tot 212 mg/kg). In 1987 vonden ze (Luca *et al.*, 1987) dat natriumnitriet in vivo een toename induceert van aberrante metafases in zowel muizen, ratten (dosissen: 1.72, 5.18, 15.55 en 46.66 mg/kg lichaamsgewicht, 2x toegediend) als konijnen (dezelfde dosissen in drinkwater gedurende 3 maanden). De in vitro experimenten toonden een significante toename aan van het percentage chromosomale aberraties (geen dosis-effect relatie).

Tsezou *et al.* (1996) vonden een significant hogere incidentie van chromatide/chromosoombreuken in de perifere bloedlymfocyten van kinderen tussen 12 en 15 jaar die leefden in een geografisch gebied waar de concentratie nitraat in het drinkwater 50 mg/l overschreed vergeleken met kinderen die leefden in een gebied met zeer lage concentraties in het drinkwater. Bij deze studie werd drinkwater echter als enige bron van nitraat beschouwd. Een aantal studies resulteerden in tegengestelde resultaten: Kleinjans *et al.* (1991) evalueerden chromosomale schade (SCE) aan perifere lymfocyten bij menselijke populaties blootgesteld aan lage, gemiddelde en hoge concentraties nitraat in het drinkwater (0.13; 32.0 en 113.5 mg/l). Ze vonden geen significant verschil tussen de 3 groepen. Rojas (1992) vond geen toename van chromosomale aberraties in lymfocyten van arbeiders blootgesteld aan meststoffen die stikstof bevatten.

Er werd aangetoond dat bij patiënten die een lange-termijn behandeling met nitraat hebben ondergaan een significant hogere frequentie micronuclei in de lymfocyten werd waargenomen (Andreassi *et al.*, 2001).

Alavanti *et al.* (1988) onderzochten de invloed van natriumnitraat en natriumnitriet op de spermacellen van muizen en ze kwamen tot de conclusie dat beide stoffen niet mutageen zijn in de geteste stages van spermacellen van muizen maar dat ze wel de fertiliteit reduceren.

Routledge *et al.* (1994) onderzochten de mutageniciteit van natriumnitriet bij drie pHs (7.4, 6.4 en 5.4) in menselijke Ad293-cellen. De mutatiefrequentie nam toe met toenemende nitrietconcentratie en afnemende pH. De meest voorkomende mutaties waren GC\_AT transities (44-56% van het totaal), gevolgd door GC\_TA transversies (24-30%). Bepaalde bestanddelen van de groene peper (*Capsicum spp.*) veroorzaken een antimutageen effect. Er wordt gesuggereerd dat dit komt door interferentie met het nitrosatieproces. Ramirez-Victoria *et al.* (2001) onderzochten dit bij *Drosophila melanogaster* waar methylurea en natriumnitriet samen met groene pepersap werd toegevoegd aan het voedsel. Ze kwamen tot de conclusie dat sommige componenten aanwezig in de groene peper een antimutageen effect induceren door te interfereren met

het nitrosatieproces. Andere inhibitoren van de mutageniciteit van nitriet zijn *p*-aminobenzoëzuur (PABA), glutathione (GSH) en thioproline (TPRO)(Kako *et al.*, 1992). Van Maanen *et al.* (1996) beschreven het gebruik van de HPRT-variant-frequentie-test in lymfocyten als een index voor het genetische risico bij menselijke populaties die blootgesteld worden aan nitraat in drinkwater. Verder onderzochten ze endogene nitrosatie als een consequentie van een toegenomen inname van nitraat door het monitoren van urinaire excretie van N-nitrosamines. Hogere nitraatinname via drinkwater resulteerde in een dosis-afhankelijke toename van urinaire nitraatuitscheiding en in toegenomen concentraties nitraat en nitriet in het speeksel. Bij hoge nitraatconcentraties werden een urinaire excretie van N-nitrosamines en een toename van de incidentie van HPRT VF in perifere lymfocyten bij drinkwater met hoge nitraatconcentraties waargenomen. Ze menen ook dat de inname van nitraat via drinkwater door de afwezigheid van beschermende factoren zoals vitamine C, een groter risico inhoudt dan de inname via groenten.

De mutageniciteit van nitriet werd getest via de Ames-test en viel positief uit (Ishidate *et al.*, 1984; Balimandawa *et al.*, 1994).

#### 1.4 Tendens tot toegenomen grootte van de schildklier:

Van Maanen *et al.* (1994) onderzochten de effecten van nitraatcontaminatie van het drinkwater op het volume en de functie van de schildklier bij menselijke populaties blootgesteld aan verschillende nitraatconcentraties in hun drinkwater. Vier populaties werden vergeleken: (1) blootgesteld aan leidingwater met lage nitraatconcentratie, (2) blootgesteld aan leidingwater met medium nitraatconcentratie, (3) blootgesteld aan putwater met medium nitraatconcentratie en (4) blootgesteld aan putwater met hoge nitraatconcentratie. Het drinken van nitraatgecontamineerd water bleek dosis-afhankelijk gerelateerd met de nitraatconcentratie in de urine en het speeksel. Er werd ook een dosis-afhankelijk effect geobserveerd tussen de lage en medium versus de hoge nitraat blootgestelde groepen, met toegenomen schildkliervolume bij een nitraatconcentratie boven 50 mg/l.

### 1.5 Toegenomen incidentie van diabetes bij kinderen:

Er werd reeds aangetoond dat toxische dosissen van sommige nitrosamines (vb. streptozotocine) bij ratten de insuline-producerende  $\beta$ -cellen van de pancreas kan schaden en dus diabetes kan veroorzaken (Kostraba *et al.*, 1992; Åkerblom & Knip, 1998; McKinney *et al.*, 1999).

Bij mensen toonde 2 geografische correlatiestudies (Parslow *et al.*, 1997; McKinney *et al.*, 1999) en 1 case-control studie (Virtanen *et al.*, 1994) een positieve link aan tussen nitraatconcentraties in drinkwater of voedsel en de incidentie van insuline-afhankelijke diabetes mellitus terwijl een andere studie (van Maanen *et al.*, 1999, 2000) geen associatie kon aantonen. In elk van deze studies was de concentratie nitraat in drinkwater laag. Het lijkt waarschijnlijk dat er een positieve associatie is tussen meer nitraat in drinkwater en toegenomen incidentie van diabetes.

### 1.6 Nitraat en cardiovasculaire ziektes:

De 'British Regional Heart Study' rapporteerden geografische variaties in cardiovasculaire mortaliteit en de rol van waterkwaliteit (Pocock *et al.*, 1980). Ze vonden een inverse relatie tussen mortaliteit en nitraatconcentraties in watervoorraden. Nitraat scheen te beschermen tegen cardiovasculaire ziektes.

Nitraat lijkt ook bloeddrukverlagend te werken. Haas *et al.* (1999) stellen dat een deel van het nitraat wordt omgezet tot nitriet wat een precursor is van NO. Stikstofoxide reduceert de bloeddruk. Een onderzoek op ratten toonde aan dat nitriet in het drinkwater de bloeddruk doet verlagen.

Een meer plausibel mechanisme voor voordelige effecten van nitraat op het cardiovasculaire systeem werd voorgesteld door McKnight *et al.* (1999): nitriet wordt in de maag afgebroken tot stikstofoxide wat kan bijdragen tot de vorming van S-nitrosothiolen. Deze bestanddelen zijn natuurlijke carriers van NO en zijn potente inhibitoren van de aggregatie van bloedplaatjes en dus van bloedklontervorming (Catani *et al.*, 1998). McKnight *et al.* (1999) toonden aan dat orale inname van nitraat (124 mg) inderdaad de bloedplaatjesaggregatie tegengaat. Verder toonde Bøckman *et al.* (1999)

aan in een experiment met 3 vrijwilligers dat 1 enkele dosis van nitraat (200 mg) snel de concentratie S-nitrosothiolen in het bloed doet stijgen. Het effect duurde de hele dag. De studies van McKnight *et al.* (1999) en Bøckman *et al.* (1999) zijn echter kleine pilootstudies. Er kunnen dus nog niet echt sluitende conclusies worden getrokken.

### **Maatregelen om de nitraatinname te beperken:**

---

De voordelen van het eten van groenten wegen nog altijd zwaarder dan de mogelijkheid dat ze bijdragen tot nitrietvorming in het lichaam. Toch kunnen we enkele maatregelen treffen.

1. Eet zo gevarieerd mogelijk en gebruik niet meer dan twee keer per week nitraatrijke groenten. Nitraatrijke groenten zijn andijvie, selder, alle soorten sla, spinazie, radijsjes, peterselie, chinese kool, koolrabi, postelein, rode biet en venkel.
2. Hou rekening met de seizoenen: eet bijvoorbeeld bij voorkeur in de zomer verse spinazie en sla, zij bevatten in de winterperiode beduidend meer nitraat. Kies in de winter bijvoorbeeld diepvriesspinazie die in de zomer geteeld werd.
3. Was alle groenten en fruit zorgvuldig, spoel ze bij voorkeur onder stromend water.
4. Verwijder zorgvuldig de steeltjes en nerven van spinazie en de buitenste bladeren en nerven van sla.
5. Koken doet het nitraatgehalte in groenten dalen omdat nitraat overgaat in het kookvocht. Gebruik om die reden nooit het kookvocht van nitraatrijke groenten om verder te verwerken in gerechten.
6. Bewaar nitraatrijke groenten in de koelkast en niet langer dan 2 dagen.
7. Warm restjes nitraatrijke groenten nooit opnieuw op, zeker niet voor kleine kinderen. Het relatief traag opwarmen en afkoelen bevordert de bacteriële omzetting van nitraat tot nitriet.
8. Vries kleine porties nitraatrijke groenten in. Hierdoor verloopt het invriesproces sneller en wordt de bacteriële omzetting tot nitriet beperkt. Tracht het ontdooiproces om dezelfde reden altijd zo kort mogelijk te houden. De omzetting van nitraat in

nitriet door bacteriën gebeurt vooral wanneer de gerechten zich langdurig in de gevaarlijke temperatuurszone bevinden, namelijk tussen 10 en 60°C.

9. Vooral voor vegetariërs, personen met maagstoornissen, visliefhebbers, zwangere vrouwen, baby's en kleine kinderen verdienen bovenstaande maatregelen bijzondere aandacht.

## **Besluit:**

---

Na omzetting tot nitriet heeft nitraat een anti-infectueus effect. Men heeft zich echter jaren zorgen gemaakt om de negatieve gezondheidseffecten van nitraat. De blootstelling aan deze stoffen is immers onvermijdelijk en talrijke nadelige effecten werden waargenomen. Deze nadelige effecten zijn vooral het gevolg van de omvorming van nitraat tot nitriet en zijn metabolieten, gevolgd door vorming van N-nitrosoverbindingen. Een eerste nadelig effect was een associatie tussen nitraatblootstelling en het voorkomen van methemoglobinemia, een ziekte die vooral bij kinderen voorkomt. Nitraat wordt omgezet in nitriet en dit kan reageren met ijzer(II), wat ijzer(III) in hemoglobine oplevert. Hierdoor wordt methemoglobine gevormd en het zuurstoftransport bemoeilijkt. In West-Europa en de VS komt deze ziekte echter bijna niet meer voor en dit zou eerder te wijten zijn aan het verdwijnen van onhygiënische waterputten dan aan de ingevoerde nitraatnormen.

Een ander effect is de associatie met kanker (vooral maagkanker). Blootstelling aan nitraat kan, middels de vorming van carcinogene N-nitroso-verbindingen, het risico op kanker doen stijgen. Epidemiologisch is er echter geen duidelijk verband tussen verhoogde inname van nitraat en gestegen risico op kanker. Er bestaan zelfs studies die een significant negatieve associatie aangeven tussen nitraatblootstelling en kanker.

Of nitraat nadelige effecten heeft op de reproductie is onzeker. Een hogere inname van nitraat zou beschermend kunnen werken op cardiovasculaire aandoeningen. Daarentegen lijkt het waarschijnlijk dat er een positieve associatie bestaat tussen blootstelling aan nitraat en toegenomen incidentie van diabetes.

Het is nog steeds onduidelijk in welke mate nitraat schadelijk is. Dat nitraat kan bijdragen tot de vorming van sterk kankerverwekkende N-nitroso verbindingen staat vast.

Epidemiologisch kon een gestegen kankerrisico echter niet bewezen worden. Dat een hogere blootstelling aan nitraat in epidemiologische studies niet duidelijk naar voor komt als een risicofactor voor kanker kan misschien verklaard worden door het feit dat groenten de belangrijkste bron van nitraat vormen. Groenten hebben echter een beschermend effect m.b.t. het ontstaan van kanker en zo is het dat er een associatie bestaat tussen een hogere inname van nitraat enerzijds en een hogere inname van bestanddelen die een anticarcinogeen effect hebben anderzijds. Studies waarbij groepen personen met kwalitatief en kwantitatief gelijkaardige consumptie van groenten maar met duidelijk verschillende innames van nitraat (groepen die groenten eten die sterk verschillen in nitraatgehalte) vergeleken worden kunnen wellicht uitwijzen in welke mate verhoogde concentraties nitraat in het milieu (en zo ook in drinkwater en voeding) gezondheidsschadend zijn. In ieder geval is voorzichtigheid geboden. Het voorkomen van nitraat in groenten is geen reden om deze, met het oog op het risico op kanker, te schrappen uit ons dieet. Groenten hebben immers duidelijk een anticarcinogeen effect. Onder andere Steinmetz & Potter (1991a,b) concludeerden dat de consumptie van meer groenten en fruit geassocieerd is met een gereduceerd risico op kanker. Mirvish (1995) kwam ook tot dit besluit. Vitamine C zou één van de beschermende factoren kunnen zijn (l'Hirondel J & l'Hirondel JL, 2001).

---

**Bibliografie:**

---

Åkerblom, H.K., Knip, M. (1998) Putative environmental factors in type I diabetes. *Diabetes/ Metabolism Reviews*, **14**, 31-67.

Alavantic, D., Sunjevaric, I., Cerovic, G., Bozin, D., Pecevski, J. (1988) In vivo genotoxicity of nitrates and nitrites in germ cells of male mice. II. Unscheduled DNA synthesis and sperm abnormality after treatment of spermatids. *Mutat Res*, **204(4)**, 697-701.

Al-Dabbagh, S., Forman, D., Brson, D., Stratton, R., Doll, R. (1986) Mortality of nitrate fertiliser workers. *British Journal of Industrial medicine*, **43**, 507-515.

Andreassi, M.G., Picano, E., Del Ry, S., Botto, N., Colombo, M.G., Giannessi, D., Lubrano, V., Vassalle, C., Biagini, A. (2001) Chronic long-term nitrate therapy: possible cytogenetic effect in humans? *Mutagenesis*, **16(6)**, 517-21.

Arbuckle, T.E., Sherman, G.J., Corey, P.N., Walters, D., Lo, B. (1988) Water nitrates and CNS birth defects: a population-based case-control study. *Archives of Environmental Health*, **43**, 162-167.

Archer, D.L. (2002) Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *J Food Prot*, **65(5)**, 872-5.

Armijo, R., Gonzalez, A., Orellana, M., Coulson, A.H., Sayre, J.W., Detels, R. (1981) Epidemiology of gastric cancer in Chile: II - Nitrate exposures and stomach cancer frequency. *Int J Epidemiol*, **10(1)**, 57-62.

Aruin, L.I. (1994) Helicobacter pylori and stomach cancer. *Arkh Patol*, **56(3)**, 3-5.

Aschengrau, A., Zierber, S., Cohen, A. (1989). Quality of community drinking water and the occurrence of spontaneous abortion. *Archives of Environmental Health*, **44**, 283-290.

Bakan, E., Taysi, S., Polat, M.F., Dalga, S., Umudum, Z., Bakan, N., Gumus, M. (2002) Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*, **32(5)**, 162-6.

Balimandawa, M., de Meester, C., Leonard, A. (1994) The mutagenicity of nitrite in the Salmonella/microsome test system. *Mutat Res*, **321(1-2)**, 7-11.

Barrett, J.H., Parslow, R.C., McKinney, P.A., Law, G.R., Forman, D. (1998). Nitrate in drinking water and the incidence of gastric, esophageal, and brain cancer in Yorkshire, England. *Cancer Causes Control*, **9**(2), 153-9.

Bartsch, H., Ohshima, H., Shuker, D.E.G., Pignatelli, B., Calmels, S. (1990) Exposure of humans to endogenous N-nitroso compounds: implications in cancer etiology. *Mutation Research*, **238**, 255-267.

Battaglia, C., Giulini, S., Regnani, G., Di Girolamo, R., Paganelli, S., Facchinetti, F., Volpe, A. (2000) Seminal plasma nitrite/nitrate and intratesticular Doppler flow in fertile and infertile subjects. *Human Reproduction*, **15**, 2554-2558.

Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American journal of Physiology* 271 (cell Physiology 40), C1424-C1437.

Benjamin, N., McKnight, G. (1999) Metabolism in nitrate in humans-implications for nitrate intake. In: Wilson WS, Ball AS, Hinton RH (eds). *Managing Risks of Nitrates to Human and the Environment*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp.281-288.

Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L., Golden, M., McKenzie, H. (1994) Stomach NO synthesis. *Nature*, **368**, 502.

Beresford, S.A. (1985) Is nitrate in the drinking water associated with the risk of cancer in the urban UK? *Int J Epidemiol*, **14**(1), 57-63.

Black, C.A. (1989) Reducing American Exposure to Nitrate, Nitrite, and Nitroso Compounds: the National Network to Prevent Birth Defects Proposal. Comments from CAST 1989-1. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, 14pp.

Bøckman, O.C., Mortensen, B., Strand, A., Leone, A. (1999) Ingestion of nitrate increase blood content of S-nitrosothiol. *Acta Physiologica Scandinavica*, **167 suppl 645**, 56, 138.

Boeing, H., Frentzel-Beyme, R., Berger, M., Berndt, V., Gores, W., Korner, M., Lohmeier, R., Menarcher, A., Mannl, H.F., Meinhardt, M., et al. (1993) Case-control study on stomach cancer in Germany. *Int J Cancer*, **47**(6), 858-64.

- Brunelli, L., Crow, J.P., Beckman, J.S. (1995) The comparative toxicity of nitric oxide and peroxy nitrite to *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **316**, 327-334.
- Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., Amadori, P., Avellini, C., Bianchi, S., Bonaguri, C., Cipriani, F., Cocco, P., Giacosa, A., Marubini, E., Minacci, C., Puntoni, R., Russo, A., Vindigni, C., Fraumentti, J.F., Blot, W.J. (1990) A case-control study of gastric cancer and diet in Italy: II Association with nutrients. *Int J Cancer*, **45**, 896-901.
- Catani, M.V., Bernasda, F., Rossi, A., Melino, G. (1998) Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **249**, 275-278.
- Chan, W.Y., Hui, P.K., Leung, K.M., Chow, J., Kwok, F., Ng, C.S. (1994) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol*, **102**, 503-7.
- Charmandari, E., Meadows, N., Patel, M., Johnston, A., Benjamin, N. (2001) Plasma nitrate concentrations in children with infectious and noninfectious diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **32(4)**, 423-7.
- Chen, J., Ohshima, H., Yang, H., Li, J., Campbell, T.C., Peto, R., Bartsch, H. (1987) A correlation study on urinary excretion of N-nitroso compounds and cancer mortality in China: interim results. *IARC Sci Publ*, **84**, 503-6.
- Cicinelli, E., Ignarro, L.J., Lograno, M., Galantino, P., Balzano, G., Schonauer, L.M. (1996) Circulating levels of nitric oxide in fertile women in relation to the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, **66**, 1036-1038.
- Cole, S.P., Kharitonov, V.F., Guiney, D.G. (1999) Effect of Nitric Oxide on *Helicobacter pylori* morphology. *J Infectious Diseases*, **180**, 1713-7.
- Cuello, C., Correa, P., Haenszel, W., Gordillo, G., Brown, C., Archer, M., Tannenbaum, S. (1976) Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect environmental agents. *J Natl Cancer Inst*, **57(5)**, 1015-20.
- Dorsch, M.M., Calder, I.C., Roder, D.M., Esterman, A.J. (1984a) Birth defects and the consumption of nitrates in food and water in the lower south-east of South Australia: an exploratory study. *Journal of Food and Nutrition*, **41**, 30-33.

Dorsch, M.M., Scragg, R.K.R., McMichael, A.J., Baghurst, P.A., Dyer, K.F.I. (1984b) Congenital malformations and maternal drinking water supply in rural South Australia: a case-control study. *American Journal of Epidemiology*, **119**, 473-486.

Duncan, C., Li, H., Dykhuizen, R., Frazer, R., Johnston, P., MacKnight, G., Smith, L., Golden, M., Benjamin, N. (1995) Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nature Medicine*, **1**, 546-551.

Dusdieker, L.B., Stumbo, P.J., Kross, B.C., Dungy, C.I. (1996) Does increased nitrate ingestion elevate nitrate levels in human milk? *Archives of Pediatric and Adolescent Medicine*, **150**, 311-314.

Dutt, M.C., Lim, H.Y., Chew, R.K. (1987) Nitrate consumption and the incidence of gastric cancer in Singapore. *Food Chem Toxicol*, **25(7)**, 515-20.

Dykhuizen, R.S., Copland, M., Smith, C.C., Douglas, G., Benjamin, N. (1995) Plasma nitrate concentration and urinary nitrate excretion in patients with gastroenteritis. *J Infect*, **31(1)**, 73-5.

Dykhuizen, R.S., Frazer, K., Duncan, C., Smith, C.C., Golden, M., Benjamin, N., Leifert, C. (1996) Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: Importance of dietary nitrate in host defence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 1422-1425.

ECETOC (1988) *Nitrate and drinking water*. Brussels, European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre (Technical Report No. 27).

El Nahas, S.M., Blobus, M., Vethamany-Globus (1984) Chromosomal aberrations induced by sodium nitrite in bone marrow of adult rats and liver cells of transplacentally exposed embryos. *J Toxicol Environ Health*, **13**, 643-647.

EU (1995a) European Parliament and Council Directive 95/2/EC of 20 February 1995 on Food additives other than colours and sweeteners. *Official Journal L61*: 1813/1995d, 1-40.

EU (1995) European Commission Directorate-General III Industry. Scientific Committee for Food. Opinion on nitrate and nitrite expressed on 22 September 1995. Annex 4 to Document 111/5611/95.

Fandrem, S.I., Kjuus, H., Andersen, A., Amlie, E. (1993) Incidence of cancer among workers in a Norwegian nitrate fertiliser plant. *British Journal of Industrial Medicine*, **50**, 647-652.

Forman, D., Al-Dabbagh, S., Doll, R. (1985) Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. *Nature*, **313(6004)**, 620-5.

Geleperin, A., Moses, V.J., Fox, G. (1976) Nitrate in water supplies and cancer. *IMJ Ill Med J*, **149(3)**, 251-3.

Gilli, G., Corrao, G., Favilli, S. (1984) Concentrations of nitrates in drinking water and incidence of gastric carcinomas: first descriptive study of the Piemonte Region, Italy. *Sci Total Environ*, **34(1-2)**, 35-48.

Gonzalez, C.A., Riboli, E., Badosa, J., Batiste, E., Cardona, T., Pita, S., Sanz, J.M., Torrent, M., Agudo, A. (1994) Nutritional factors and gastric cancer in Spain. *Am J Epidemiol*, **139(5)**, 466-73.

Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Fox, I.G. (1982) Nitrate in human and canine milk. *New England Journal of Medicine*, **306**, 1367-1368.

Haas, M., Classen, H.G., Thöni, H., Classen, V.G., Drescher, B. (1999) Persistent antihypertensive effect of oral nitrite supplied up to one year via the drinking water in spontaneously hypertensive rats. *Arzneimittel-Forschung/ Drug Research*, **49(1)**, 318-323.

Hagmar, L., Bellander, T., Andersson, C., Lindén, K., Attewell, R., Möller, T. (1991) Cancer morbidity in nitrate fertilizer workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **63**, 63-67.

Hansson, L.E., Nyren, O., Bergstrom, R., Wolk, A., Lindgren, A., Baron, J., Adami, H.O. (1994) Nutrients and gastric cancer risk. A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer*, **57(5)**, 638-44.

Hartman, P.E. (1983) Review: putative mutagens and carcinogens in foods. I. Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality. *Environ Mutagen*, **5(1)**, 111-21.

Iizuka, T., Sasaki, M., Oishi, K., Uemura, S., Koiki, M., Minatogawa, Y. (1997) Nitric oxide may trigger lactation in humans. *Journal of Pediatrics*, **131**, 839-843.

Iizuka, T., Sasaki, M., Oishi, K., Uemura, S., Koike, M. (1998) The presence of nitric oxide synthase in the mammary glands of lactating rats. *Pediatric Research*, **44**, 197-200.

Iizuka, T., Sasaki, M., Oishi, K., Uemura, S., Koike, M., Shinozaki, M. (1999) Non-enzymatic nitric oxide generation in the stomachs of breastfed neonates. *Acta Paediatrica*, **88**, 1053-1055.

- Ikemoto, Y., Teraguchi, M., Kobayashi, Y. (2002) Plasma levels of nitrate in congenital heart disease: comparison with healthy children. *Pediatr Cardiol*, **23**(2), 132-6.
- Ishidate, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Wada, M.S., Matsuoka, A. (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem Toxicol*, **22**, 623-636.
- Jensen, O.M. (1982) Nitrate in drinking water and cancer in northern Jutland, Denmark, with special reference to stomach cancer. *Ecotoxicol Environ Saf*, **6**(3), 258-67.
- Juhasz, L., Hill, M.J., Nagy, G. (1980) Possible relationship between nitrate in drinking water and incidence of stomach cancer. *IARC Sci Publ*, **31**, 619-23.
- Kako, Y., Toyoda, Y., Hatanaka, Y., Suwa, Y., Nukaya, H., Nagao, M. (1992) Inhibition of mutagenesis by p-aminobenzoic acid as a nitrite scavenger. *Mutat Res*, **282**(2), 119-25.
- Kamiyama, S., Ohshima, H., Shimada, A., Saito, N., Bourgade, M.C., Ziegler, P., Bartsch, H. (1987) Urinary excretion of N-nitrosamino acids and nitrate by inhabitants in high- and low-risk areas for stomach cancer in northern Japan. *IARC Sci Publ*, (84), 497-502.
- Kato, T., Tadokoro, N., Tsutsui, M., Kikugawa, K. (1991) Transformation of arylamines into direct-acting mutagens by reaction with nitrite. *Mutat Res*, **249**(1), 243-54.
- Kiese, M. (1974) *Methemoglobinemia: a Comprehensive Treatise. Causes, Consequences, and Correction of Increased Contents of Ferrihemoglobin in Blood*. CRC Press, Cleveland, Ohio, 260pp.
- Kleinjans, J.C.S., Albering, H.J., Marx, A., van Maanen, J.M.S., van Aagen, B., ten Hoor, F., Swaen, G.M.H., Mertens, P.L.J.M. (1991) Nitrate contamination of drinking water: evaluation of genotoxic risk in human populations. *Environmental Health Perspectives*, **94**, 189-193.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Dich, J., Hakulinen, T. (1999) Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer*, **80**(6), 852-6.
- Knight, T.M., Forman, D., Pirastu, R., Comba, P., Iannarilli, R., Cocco, P.L., Angotzi, G., Ninu, E., Schierano, S. (1990) Nitrate and nitrite exposure in Italian populations with different gastric cancer rates. *Int J Epidemiol*, **19**(3), 510-5.

- Knobeloch, L., Salna, B., Hogan, A., Postle, J., Anderson, H. (2000) Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environ Health Perspect*, **108(7)**, 675-8.
- Kostraba, J.N., Gay, E.C., Rewers, M., Hamman, R.F. (1992) Nitrate levels in community drinking waters and risk of IDDM. An ecological analysis. *Diabetes Care*, **15**, 1505-1508.
- Law, G., Parslow, R., McKinney, P., Cartwright, R. (1999) Non-Hodgkin's lymphoma and nitrate in drinking water: a study in Yorkshire, United Kingdom. *J Epidemiol Community Health*, **53(6)**, 383-4.
- Leclerc, H., Vincent, P., Vandevenne, P. (1991) Nitrates in the drinking water and cancer. *Ann Gastroenterol Hepatol* (Paris), **27(7)**, 326-32.
- l'Hirondel, J. and l'Hirondel, J-L. (2001) Nitrate and Man: Toxic, Harmless or Beneficial? Centre Hospitalier Universitaire de Caen, France, pp184.
- La Vecchia, C., D'Avanzo, B., Airoidi, L., Braga, C., Decarli, A. (1995) 'Nitrosamine intake and gastric cancer risk.' *Eur J Cancer Prev*, **4(6)**, 469-74.
- La Vecchia, C., Ferraroni, M., D'Avanzo, B., Decarli, A., Franceschi, S. (1994) Selected micronutrient intake and the risk of gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **3(5)**, 393-8.
- Luca, D. (1987) Cytogenetic changes induced in vivo by exposure to sodium nitrate. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, **91(2)**, 305-7.
- Luca, D., Káibeanu, L., Luca, V., Duda, R. (1985) Chromosomal aberrations and micronuclei induced in rat and mouse bone marrow cells by sodium nitrate. *Mutation Research*, **155**, 121-125.
- Maekawa, A., Ogiu, T., Onodera, H., Furuta, K., Matsuoka, C., Ohno, Y., Odashima, S. (1982) Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats. *Food and chemical Toxicology*, **20**, 25-33.
- McColl, K.E., el-Omar, E.M., Gillen, D. (1997) 'Alterations in gastric physiology in Helicobacter pylori infection: causes of different diseases or all epiphenomena?' *Ital J Gastroenterol Hepatol*, **29(5)**: 459-64.

- McKinney, P.A., Parslow, R., Bodansky, H.F. (1999) Nitrate exposure and childhood diabetes. In: Wilson WS, Ball AS, Hinton RH (eds) *Managing Risks of Nitrates to Humans and the Environment*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp.327-339.
- McKnight, G.M., Duncan, C.W., Leifert, C., Golden, M.H. (1999) Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition*, **81**, 349-358.
- Mirvish, S.S. (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in the etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Letters*, **93**, 17-48.
- Mirvish, S.S., Bulay, O., Runge, R.G., Patil, K. (1980) Study of the carcinogenicity of large doses of dimethylnitramine, N-nitroso-L-proline, and sodium nitrite administered in drinking water to rats. *J Natl Cancer Inst*, **64**, 1435-1442.
- Morales Suarez-Varela, M., Llopis Gonzalez, A., Tejerizo Perez, M.L., Ferrandiz Ferragud, J. (1993) Concentration of nitrates in drinking water and its relationship with bladder cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **12(4)**, 229-36.
- Morales-Suarez-Varela, M.M., Llopis-Gonzalez, A., Tejerizo-Perez, M.L. (1995) Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain. *Eur J Epidemiol*, **11(1)**, 15-21.
- Muijsers, R.B.R., Folkerts, G., Henricks, P.A.J., Soedeghi-Hashjin, G., Nijkamp, F.P. (1997) Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sciences*, **60**, 1833-1845.
- NRC (1995) National Research Council. Subcommittee on Nitrate and Nitrite in Drinking water. Nitrate and Nitrite in Drinking Water. National Academy Press, Washington, DC, 63pp.
- Palli, D., Saieva, C., Coppi, C., Del Giudice, G., Magagnotti, C., Nesi, G., Orsi, F., Airoldi, L. (2001) O6-alkylguanines, dietary N-nitroso compounds, and their precursors in gastric cancer. *Nutr Cancer*, **39(1)**, 42-9.
- Parslow, R.C., McKinney, P.A., Law, G.R., Staines, A., Williams, R., Bodansky, H.U. (1997) Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, Northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetologia*, **40**, 550-556.

Pobel, D., Riboli, E., Cornee, J., Hemon, B., Guyader, M. (1995) Nitrosamine, nitrate and nitrite in relation to gastric cancer: a case-control study in Marseille, France. *Eur J Epidemiol*, **11(1)**, 67-73.

Poch, M. (1987) Possible correlations between nitrate pollution of drinking water and neoplastic diseases of the gastrointestinal tract. *Z Gesamte Hyg*, **33(10)**, 528-9.

Pocock, S.J., Shaper, A.G., Cook, D.G., Packham, R.F., Lacey, R.F., Powel, P., Russel, P.F. (1980) British Regional Heart Study: geographic variations in cardiovascular mortality, and the role of water quality. *Br Med J*, **280(6226)**, 1243-9.

Preston-Martin, S., Pogoda, J.M., Mueller, B.A., Holly, E.A., Lijinsky, W., Davis, R.L. (1996) 'Maternal consumption of cured meats and vitamins in relation to pediatric brain tumors.' *Cancer Epidem Biomarkers Prev*, **5(8)**: 599-605.

Rademacher, J.J., Young, T.B., Kanarek, M.S. (1992) Gastric cancer mortality and nitrate levels in Wisconsin drinking water. *Arch Environ Health*, **47(4)**, 292-4.

Ramirez-Victoria, P., Guzman-Rincon, J., Espinosa-Aguirre, J.J., Murillo-Romero, S. (2001) Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum* spp.) and its possible interference with the nitrosation process. *Mutat Res*, **496(1-2)**, 39-45.

Risch, H.A., Jain, M., Choi, N.W., Fodor, J.G., Pfeiffer, C.J., Howe, G.R., Harrison, L.W., Craib, K.J., Miller, A.B. (1985) Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. *Am J Epidemiol*, **122(6)**, 947-59.

RIVM, National Institute for Public Health and Environmental Protection (1989) 'Integrated criteria document nitrate. Effects.' Appendix to report No 758473012, 198 p.

Robbins, R.A., Rennard, S.I. (1997) Biology of airway epithelial cells. In: Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ (eds). *The Lung*. Scientific Foundations, Vol 1 Lippencott-Raven, Philadelphia, pp.445-457.

Rogers, M.A., Vaughan, T.L., Davis, S., Thomas, D.B. (1995) Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4(1)**, 29-36.

Rojas, A. (1992) No increase in chromosome aberrations in lymphocytes from workers exposed to nitrogen fertilisers. *Mutation Research*, **281**, 133-135.

- Rosselli, M., Imthurn, B., Keller, P.J., Jackson, E.K., Dubey, R.K. (1995) Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 $\beta$ -estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension*, **25(part2)**, 848-853.
- Routledge, M.N., Mirsky, F.J., Wink, D.A., Keefer, L.K., Dipple, A. (1994) Nitrite-induced mutations in a forward mutation assay: influence of nitrite concentration and pH. *Mutat Res*, **322(4)**, 341-6.
- Sakai, T., Shiraki, K., Sawai, T., Shigeru, O., Takase, K., Nakano, T. (2001) Increased plasma nitrate and nitrite concentrations in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, **34(3)**, 485-6.
- Sandor, J., Kiss, I., Farkas, O., Ember, I. (2001) Association between gastric cancer mortality and nitrate content of drinking water: ecological study on small area inequalities. *Eur J Epidemiol*, **17(5)**, 443-7.
- Shi, Y., Li, J., Wang, L., Guo, W., Qin, D., Geng, C., Forman, D., Newell, D.G., Peto, R., Blot, W.J. (1997) Association of Helicobacter pylori infection with precancerous lesions and stomach cancer: a case-control study in Yngzhong County. *Chin Med Sci J*, **12(3)**, 175-80.
- Shen, W., Zhang, X., Zhao, G., Wolin, M.S., Sessa, W., Hintze, T.H. (1995) Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **27**, 1125-1134.
- Skrivan, J. (1971) Methemoglobinemia in pregnancy (clinical and experimental study). *Acta Universitatis Carolinae Medica*, **17**, 123-161.
- Spiegelhalter, B. (1995) Influence of dietary nitrate on oral nitrite production: relevance to in vivo formation of nitrosamines. In: Proceedings of the International Workshop on Health Aspects of Nitrates and its Metabolites (Particularly Nitrite). Bilthoven (Netherlands), 8-10 November 1994. Council of Europe Press, Strasbourg, pp125-136.
- Steindorf, K., Schlehofer, B., Becher, H., Hornig, G., Wahrendorf, J. (1994) Nitrate in drinking water. A case-control study on primary brain tumours with an embedded drinking water survey in Germany. *Int J Epidemiol*, **23(3)**, 451-7.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1991a) Vegetables, fruit and cancer.I. Epidemiology. *Cancer, Causes and Control*, **2**, 325-357.

Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1991b) Vegetables, fruit and Cancer. II. Mechanisms. *Cancer, Causes and Control*, **2**, 427-442.

Suzuki, E., Yagi, G., Nakaki, T., Kanba, S., Asai, M. (2001) Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord*, **63(1-3)**, 221-4.

Takacs, S. (1987) Nitrate content of drinking water and tumours of the digestive organs. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]*, **184(3-4)**, 269-79.

Tricker, A.R. (1997) N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev*, **6(3)**, 226-68.

Tsezou, A., Kitsiou-Tzeli, S., Galla, A., Gourgiotis, D., Papagezrgiou, L., Mitrou, S., Molybdas, P.A., Sinaniotis, C. (1996) High nitrate content in drinking water: cytogenetic effects in exposed children. *Archives of Environmental Health*, **51**, 458-461.

Van Leeuwen, J.A., Waltner-Toews, D., Abernathy, T., Smit, B., Shoukri, M. (1999) Associations between stomach cancer incidence and drinking water contamination with atrazine and nitrate in Ontario (Canada) agroecosystems, 1987-1991. *Int J Epidemiol*, **28(5)**, 836-40.

van Loon, A.J., Botterweck, A.A., Goldbohm, R.A., Brants, H.A., van Klaveren, J.D., van den Brandt, P.A. (1998) Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Br J Cancer*, **78(1)**, 129-35.

Van Maanen, J.M.S., Albering, H.J., van Breda, S.G.J., Curfs, D.M.J., Ambergen, A.W., Wolffenbuttel, B.H.R., Kleinjans, J.C.S., Reeser, H.M. (1999) Nitrate in drinking water and risk of childhood diabetes in the Netherlands. *Diabetes Care*, **22**, 1750.

Van Maanen, J.M.S., Albering, H.J., de Kok, T.M.C.M., van Breda, S.G.J., Curfs, D.M.J., Vermeer, I.T.M., Amberger, A.W., Wolffenbuttel, B.H.R., Kleinjans, J.C.S., Reeser, H.M. (2000) Does the risk of childhood diabetes mellitus require revision of the guideline values for nitrate in drinking water? *Environmental Health Perspectives*, **108**, 457-461.

Van Maanen, J.M.S., van Dijk, A., Mulder, K., de Baets, M.H., Menheere, P.C.A., van der Heide, D., Mertens, P.L.J.M., Kleinjans, J.C.S. (1994) Consumption of drinking water with high nitrate levels cause hypertrophy of the thyroid. *Toxicol Lett*, **72**, 365-374.

Van Maanen, J.M.S., Welle, I.J., Hageman, G., Dallinga, J.W., Mertens, P.L.J.M., Kleinjans, J.C.S. (1996) Nitrate contamination of drinking water: relationship with HPRT variant frequency in lymphocyte DNA and urinary excretion of N-nitrosamines. *Environmental Health Perspectives*, **104(5)**, 522-528.

Vermeer, I.T.M., Pachon, D.M.F.A., Dallinga, J.W., Kleinjans, J.C.S., van Maanen, J.H.S. (1998) Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet. *Environmental Health Perspectives*, **106**, 459-465.

Vincent, P., Dubois, G., Leclerc, H. (1983) Nitrates in the drinking water and cancer mortality. An epidemiologic study in northern France. *Rev Epidemiol Sante Publique*, **31(2)**, 199-207.

Virtanen, S.M., Jaakkola, L., Räsänen, L., Ylönen, K., Aro, A., Lounamaa, R., Åkerblom, H.K., Tuomilehto, J. and the Childhood Diabetes in Finland Study Group (1994) Nitrate and nitrite intake and the risk for type I diabetes in Finnish children. *Diabetes Medicine*, **11**, 656-662.

Ward, M.H., Mark, S.D., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Correa-Villasenor, A., Zahm, S.H. (1996) Drinking water nitrate and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology*, **7(5)**, 465-71.

Weller, R., Pattullo, S., Smith, L., Golden, M., Ormerod, A., Benjamin, N. (1996) Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *Journal of Investigative Dermatology*, **107**, 327-331.

WHO (1985) *Health hazards from nitrate in drinking-water. Report on a WHO meeting, Copenhagen, 5-9 March 1984*. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe (Environmental Health Series No. 1).

WHO (1996) Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the Forty-Fourth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (WHO Food Additives Series 35).

WHO (1998a) Guidelines for drinking-water quality, 2<sup>nd</sup> ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, World Health Organization, 1998. pp.64-80.

WHO (1998b) Guidelines for drinking-water quality, 2<sup>nd</sup> ed., Addendum to Volume 1, Recommendations, Geneva.

WHO (2001) Water Resources and Human Health in Europe, WHO, Regional Office for Europe, Copenhagen.

Yang, C.Y., Cheng, M.F., Tsai, S.S., Hsieh, Y.Z. (1998) Calcium, magnesium, and nitrate in drinking water and gastric cancer mortality. *Japanese Journal of Cancer Research*, **89**, 124-130.

Zaldivar, R., Wetterstrand, W.H. (1978) Nitrate nitrogen levels in drinking water of urban areas with high- and low-risk populations for stomach cancer: an environmental epidemiology study. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol*, **92(3)**, 227-34.

Zandjani, F., Høgsaet, B., Anderzen, A., Langård, S. (1994) Incidence of cancer among nitrate fertilizer workers. *Int. Arch. Occupational and Environmental Health*, **66**, 189-193.

Zeman, C.L., Kross, B., Vlad, M. (2002) A nested case-control study of methemoglobinemia risk factor in children of transylvania, Romania. *Environ Health Perspect*, **110(8)**, 817-22.