

VLIZ (vzw)
VLAAMS INSTITUUT VOOR DE ZEE
NEDERS MARINE INSTITUUT
nde -



Hormoonontregelaars in water: speurtocht naar een dreigend probleem?

62548

D. VETHAAK, RIKZ
G. RIJS, RIZA
H. PRINS, RIZA
C. VAN DE GUCHTE, RIZA

De problematiek van hormoonontregelende stoffen in het milieu staat zowel in Nederland als internationaal momenteel volop in de belangstelling. Reeds vele decennia weet men dat diverse stoffen, zoals bepaalde chloorkoolwaterstoffen, kunnen leiden tot directe effecten op de voortplanting en de populatie-ontwikkeling van aquatische toppredatoren, zoals visetende vogels en zeehonden. Door maatregelen om de emissies van deze stoffen sterk te beperken zijn de gehalten van deze stoffen sterk verminderd, en als gevolg hiervan ook de optredende nadelige populatie-effecten. Recent zijn in het watermilieu echter stoffen gemeten die bij dieren op een subtieler niveau inwerken, als hormoonontregelaar. Daartoe behoort een aantal natuurlijke oestrogene hormonen en zogenaamde xeno-oestrogenen. Over de mogelijke ecologische effecten is nog weinig bekend. Desalniettemin komen er steeds meer aanwijzingen dat lokale blootstelling aan deze stoffen op den duur tot nadelige effecten op de voortplanting kan leiden bij sommige diersoorten.

Hormoonontregelende stoffen zijn stoffen die bij blootstelling het hormonale systeem zodanig kunnen beïnvloeden dat nadelige effecten kunnen optreden voor het blootgestelde organisme dan wel zijn of haar nageslacht. In de internationale literatuur worden deze stoffen aangeduid met de term 'endocrine disrupters'.

Voor hormoonontregelende stoffen bestaat momenteel veel aandacht, omdat:

- bij een breed scala van in het wild levende dieren afwijkingen zijn gevonden aan voortplantingsorganen of in het seksueel gedrag die zijn toegeschreven aan blootstelling aan stoffen die hormoonsystemen kunnen beïnvloeden;
- effecten op de voortplanting en ontwikkeling van dieren grote betekenis kunnen hebben voor het voortbestaan van een populatie en daarmee op het goed functioneren van een ecosysteem;
- hormoonontregelende stoffen weinig soortspecifiek zijn. Allerlei dieren in het milieu kunnen worden geschaad. Daardoor kunnen op vele plaatsen in ecosystemen verstoringen in structuur en functie optreden, met onoverzienbare gevolgen;

- een eenmalige en betrekkelijke lage dosis van een hormoonontregelende stof, met name in de kritieke fase van de ontwikkeling van een dier, al effectief kan zijn. Bij gecombineerde blootstelling aan meerdere hormoonontregelaars tegelijk kan additiviteit van effecten optreden.

Meestal wordt de hormoonontregelende werking van een stof vastgesteld in gecontroleerde laboratoriumexperimenten met proefdieren (*in vivo*), maar in veel gevallen ook op een lager organisatieniveau, in speciaal gekweekte cellijnen of weefsels (*in vitro*). De grote vraag hierbij is of deze laatste laboratoriumuitkomsten ook geldig zijn voor intacte organismen, en of de *in vivo*-effecten die worden waargenomen in het laboratorium ook kunnen en zullen optreden onder natuurlijke omstandigheden.

De effecten in het milieu, die aan hormoonontregelaars worden toegeschreven, betreffen onder andere toename van vervrouwelijking, onvruchtbaarheid, hermafroditisme en afwijkend seksueel gedrag bij onder andere vogels, zeezoogdieren, alligators, vissen en

Drieluik

Wat speelt er nu allemaal op dit gebied? Is er sprake van een nieuw probleem en om welke stoffen gaat het nu eigenlijk? Afgelopen zomer heeft de Gezondheidsraad adviezen uitgebracht die de overheid moeten attenderen op het gevaar van hormoonontregelende stoffen. In de Verenigde Staten en in Europa wordt momenteel zeer veel onderzoek gedaan op dit gebied. In Nederland loopt onder meer een omvangrijk onderzoek naar de aanwezigheid en effecten van oestrogeen-actieve stoffen (LOES). In een drieluik beogen medewerkers van het Rijksinstituut voor Kust en Zee, het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling en enkele universiteiten inzicht te geven in wat zoal gaande is op het gebied van hormoonontregelaars in relatie tot het watermilieu.

slakken (Colborn e.a., 1992; CSTEE, 1999). Ook in Nederland en West-Europa, en met name in aquatische ecosystemen, zijn schadelijke effecten bij sommige diersoorten waargenomen, die in verband worden gebracht met blootstelling aan hormoonontregelende stoffen (tabel 1). De hier vermelde effecten werden doorgaans waargenomen op duidelijk verontreinigde locaties; bij vissen en zeeslakken zijn recentelijk ook wijdverspreide effecten vastgesteld in gebieden, waarvan op basis van de klassieke beoordeling werd aangenomen dat ze niet of alleen licht verontreinigd waren.

Er zijn verschillende mechanismen waardoor hormoonontregelende effecten door stoffen kunnen worden veroorzaakt: ontregeling van lichaamsprocessen door directe interactie met receptor of indirect door inwerking op omzetting, transport of uitscheiding van het betreffende hormoon. De meeste aandacht richt zich momenteel op effecten op de reproductie door veranderingen in de geslachtshormoonhuishouding. Vooral in de belangstelling staan stoffen die de feminiserende werking van de natuurlijke vrouwelijke geslachtshormonen, via receptorbinding, nabootsen. Deze stoffen worden xeno-oestrogenen genoemd. Voor het detecteren van stoffen met dit type werkingsmechanisme zijn de laatste jaren diverse testen beschikbaar gekomen (zie het laatste artikel van dit drieluik op pagina 20). Aan stoffen die met andere hormonen of hormoonsystemen interacteren wordt duidelijk minder aandacht besteed. Uitzondering hierop zijn de aangetroffen mannelijke geslachtskenmerken (imposex) bij vrouwelijke zeeslakken (afb. 1). Dit effect wordt toegeschreven aan de hormoonversturende eigen-

schappen van organotinverbindingen (TBT) die toegepast worden in aangroeiwerende verven op schepen.

(Xeno)-oestrogenen zijn natuurlijke of synthetische stoffen die de feminiserende werking van de natuurlijke vrouwelijke geslachtshormonen nabootsen doordat deze binden aan de hormoonreceptor, met als gevolg een respons. De interactie van een oestrogeen hormoon (of xeno-oestrogene stof) met zijn receptor veroorzaakt een aantal reacties welke uiteindelijk leidt tot gewenste (of onbedoelde) effecten met betrekking tot de voortplanting en ontwikkeling. Bij niet-zoogdieren zoals bijvoorbeeld vissen zorgt 17 β -oestradiol op deze wijze voor de aanmaak in de lever van dooier-eiwit (vitellogenine); zie verderop in dit artikel. Een stof kan na binding aan de hormoonreceptor de natuurlijke respons echter ook juist tegengaan (antagonistisch effect). Men spreekt dan van een anti-(xeno)-oestrogeen.

Nieuwe fase in verontreinigingsproblematiek

Reproductieverstoring, al dan niet langs de weg van hormoonontregeling, is niet nieuw. Al in de zeventiger jaren werd in Nederland een aantal persistente chloorkoolwaterstoffen (dieldrin, DDT, PCB's en dioxine-achtige verbindingen) verantwoordelijk gehouden voor verstoring van de ontwikkeling en voortplanting bij aquatische toppredatoren (Koeman e.a., 1969). Aangetoond is dat

Afb. 1 Een vrouwjeswulk uit de open Noordzee met een mannelijk geslachtsorgaan (imposex). (Foto H. Kraft).

DDT, PCB's, dioxine-achtige stoffen en ook endrin / telodrin de reproductie van visetende vogelsoorten, zoals de grote stern en de eider-eend, verstoren. Een slecht broedsucces bij de aalscholver in de Biesbosch en bij de visdief in het Haringvliet zijn door diverse onderzoekers toegeschreven aan PCB's en dioxine-achtige stoffen. In het onderzoek bij aalscholvers is ook een correlatie aangetoond tussen dunne eischalen en DDT-metabolieten. Bij zeehonden in de Waddenzee en de Oostzee is aangetoond dat steriliteit kan optreden door aanwezigheid in het milieu van PCB's en metabolie-

ten daarvan. Van PCB's is tevens bekend dat zij een nadelige invloed hebben op de voortplanting van marterachtigen, zoals de otter.

Concentraties van bekende stoffen als PCB's en metalen zijn de laatste tien jaar sterk gedaald. Toch zijn nog effecten waargenomen die niet te verklaren zijn aan de hand van de concentraties die gemeten worden: het brongericht beleid heeft weliswaar geresulteerd in een sterke reductie van bekende, prioritaire verontreinigingen, maar intussen bieden andere potentieel verdachte stoffen zich aan.

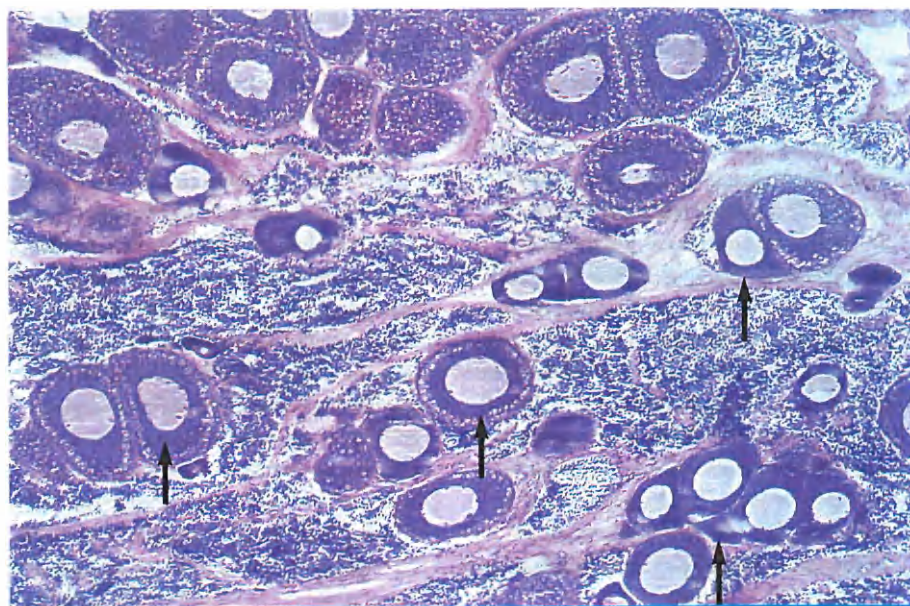
Tabel 1: Enkele gedocumenteerde effecten van hormoonontregelende stoffen op (populaties van) dieren in West-Europese en Nederlandse wateren (gebaseerd op CSTEE, 1999).

effect	organisme/diersoort	locatie/regio	stof	periode
verminderd reproductiesucces	gewone zeehond	Waddenzee	PCB's en PCB-metabolieten	jaren '70-'80; nu bijna geen effecten meer
verminderd reproductiesucces	Europese otter	Noord-Europese landen	PCB's	jaren '80; in Nederland uitgestorven
verminderd broedsucces, ontwikkelingsstoornissen	aalscholver, visdief	sedimentatiegebieden van Rijn en Maas	DDE, PCB's en dioxines	jaren '60-'90; nu alleen nog subtiele effecten
feminisatie bij mannelijke vissen	regenboogforel (uitgehangen in kooien)	oppervlaktewater nabij lozingspunten van rwzi's in Groot-Brittannië	17 β -oestradiol, oestron, 17 α -ethinyloestradiol, alkylfenolderivaten	midden jaren '90
	blankvoorn	meerdere riviersystemen in Groot-Brittannië	oestrogene steroidhormonen	eind jaren '90
	bot	meerdere estuaria in Groot-Brittannië en Nederland	onbekend	eind jaren '90
	brasem	IJssel, Elbe	onbekend	eind jaren '90
masculinisatie bij vrouwelijke dieren; belemmering van de voortplanting	vele soorten zeelakken, o.a. purperslak en wulk	meeste kustgebieden, open Noordzee	tributyltin	jaren '80-'90

Door de Gezondheidsraad zijn circa 80 stoffen gescreend op potentiële hormoonontregelende werking (Gezondheidsraad, 1999). Gebleken is dat 34 van deze stoffen voor Nederland van belang kunnen zijn. Naast de klassieke verontreinigingen worden ook genoemd de organobroomverbindingen (polybroombifenylen en -difenylethers), alkylfenolen (4-nonylfenol en 4-octylfenol), bisfenol-A en in mindere mate de ftalaten. Ook merkt de Gezondheidsraad enkele natuurlijke hormonen (17 β -oestradiol, 17 α -oestradiol en oestron), en het synthetische hormoon 17 α -ethinyloestradiol aan als hormoonontregelaars. Dit laatste hormoon wordt in de anticonceptiepill voor de mens gebruikt.

Deze oestrogene hormonen worden door mensen en vooral landbouwhuisdieren in aanzienlijke hoeveelheden uitgescheiden. De oestrogene potentie van deze natuurlijke en synthetische oestrogene hormonen is altijd veel hoger dan die van xeno-oestrogenen (zie tabel 2). Deze laatste stoffen zijn doorgaans slecht biologisch afbreekbaar en bovendien vaak hydrofoob, waardoor ze de neiging vertonen zich op te hopen in sedimenten en organismen. De meeste xeno-oestrogene stoffen verspreiden zich dan ook diffuus door het milieu.

In binnen- en buitenland wordt gewerkt aan de uitbreiding van bestaande en de ontwikkeling van nieuwe tests, die specifiek gericht zijn op het aantonen van effecten ten gevolge van hormoonontregeling, bijvoorbeeld bij vissen. Ook is in veel landen veldon-



Afb. 2 Histologische opname van de testis van een mannelijke hot met kenmerken van interseksualiteit: naast spermatogenese zijn ook vrouwelijke kenmerken (pijltjes wijzen naar eicellen) aanwezig. (Foto S. Feist).

Effecten bij vissen

In veldstudies in Groot-Brittannië (Desbrow e.a., 1998; Jobling e.a., 1998; Marthiessen e.a., 1998; Routledge e.a., 1998) zijn wijdverspreide effecten van oestrogeen-actieve stoffen in het aquatisch milieu aangetoond. Aangevoerd is dat de meeste effluënten van rtwi's kunnen leiden tot feminiserende effecten bij mannelijke vissen. Door fractionering van het effluent heeft men de verantwoordelijke stoffen voor deze oestrogene

ren en in de estuaria zijn oestrogene effecten bij mannelijke vissen gevonden, voornamelijk vitellogenine-inductie en inter-seksualiteit. Vitellogenine-inductie is de oestrogeen-gestuurde aanmaak van vitellogenine in de lever van de vis. Vitellogenine wordt normaal alleen door vrouwtjes geproduceerd. Een verhoogde aanmaak bij mannetjesvissen wijst op een oestrogeen effect veroorzaakt door in het milieu aanwezige oestrogeen-actieve stoffen (Sumpter e.a., 1995). Naast onnatuurlijke vitellogenine-productie vertoonden mannelijke exemplaren van bepaalde vissoorten bovendien inter-seksualiteit (afb. 2).

Inter-seksualiteit bij vissen is een afwijking die gekenmerkt wordt door de ontwikkeling van eicellen in een overigens normale testis van mannelijke individuen, waardoor verminderde fertiliteit en steriliteit kan ontstaan. Bij de blankvoorn bleek dat zeer hoge prevalenties van inter-seksualiteit (tot plaatselijk meer dan 90 procent van de onderzochte populatie) voorkwamen. Of deze effecten ook daadwerkelijk nadelige gevolgen hebben voor het voortplantingssucces en de grootte van de populatie bij de vissen is nog onbekend.

De resultaten van het Engelse onderzoek zijn relevant voor de Nederlandse situatie. In Nederland heeft omvangrijk onderzoek naar vitellogenine-productie en inter-seksualiteit bij vissen nog niet plaatsgevonden. Uit het nog beperkte onderzoek onder vispopulaties in ons land blijkt dat er in enkele sterk verontreinigde zoetwatersystemen en estuaria sprake is van verhoogde vitellogenine-gehalten in mannelijke vissen, overeenkomend met de gehalten aangetroffen in vis van Engelse wateren.

Tabel 2: De relatieve oestrogene potentie (EEF) van een aantal verdachte (xeno)-oestrogene stoffen in de ER-CALUX screeningstest, uitgedrukt ten opzichte van 17 β -oestradiol (Legler, 1999).

stof	EEF ER-CALUX	stof	EEF ER-CALUX
17 β -oestradiol	1	di(2-ethylhexyl)ftalaat	$< 3 \times 10^{-8}$
oestron	0,058	bisfenol-A	$7,8 \times 10^{-6}$
17 α -oestradiol	0,016	4-nonylfenol	$3,8 \times 10^{-5}$
17 β -ethinyloestradiol	0,81	4-octylfenol	$1,4 \times 10^{-6}$
dimethylftalaat	$1,1 \times 10^{-5}$	o,p-DDT	$9,1 \times 10^{-6}$
di-ethylftalaat	$3,2 \times 10^{-8}$	dieldiin	$2,4 \times 10^{-7}$
di-n-butylftalaat	$1,8 \times 10^{-8}$	endosulfan	$1,0 \times 10^{-6}$
butylbenzylftalaat	$1,4 \times 10^{-6}$	chloordaan	$9,6 \times 10^{-7}$

derzoek en monitoring in gang gezet van mogelijke reproductieproblemen bij in het water levende dieren. Het onderzoek richt zich dan ook voornamelijk op het aantonen van causale relaties tussen effecten op populatieniveau in het veld en de aanwezigheid van bepaalde (groepen) stoffen. Op enkele van de gesignaleerde probleemlocaties zou het in de toekomst mogelijk moeten worden de voor hormoonontregeling verantwoordelijke stoffen of stofgroepen te identificeren.

potentie kunnen herleiden tot natuurlijke en synthetische hormonen (17 β -oestradiol, oestron en 17 α -ethinyloestradiol) en alkylfenolderivaten. Mensen en dieren scheiden steroïdhormonen in de inactieve, geconjugeerde vorm uit, de oestrogenen blijken echter in actieve vorm voor te komen in gezui- verd afval- en rioolwater. Waarschijnlijk zijn bacteriën verantwoordelijk voor deze opgetreden deconjugatie.

Ook in de ontvangende oppervlaktewate-

Nationaal beleid

In 1997 heeft de Gezondheidsraad een advies uitgebracht over de invloed van hormoonontregelende stoffen op de gezondheid van de mens. Hierin werd geconcludeerd dat geen aanwijzingen bestaan dat blootstelling aan hormoonontregelende stoffen een acute dreiging vormt voor de gezondheid, maar dat deze stoffen - gezien de brede blootstelling - wel serieuze aandacht behoeven. Een ander geluid komt uit het vorig jaar door de raad uitgebrachte advies over hormoonontregelaars in ecosystemen. Met name bij dieren die deel uitmaken van aquatische ecosystemen zijn wel effecten van hormoonontregelende stoffen op de voortplanting aangetoond of aannemelijk. De gevolgen daarvan voor levensgemeenschappen en gehele ecosystemen zijn echter nog onbekend.

De bezorgheid over hormoonontregelende stoffen in het milieu heeft in 1997 geleid tot vragen vanuit de Tweede Kamer. Als antwoord heeft de minister van VROM vorige zomer een notitie 'Hormoonontregelende stoffen' opgesteld, waarin een overzicht wordt gegeven van het beleid en lopend onderzoek op het gebied van hormoonontregelende stoffen. Hierin staat de conclusie dat de aanpak van hormoonontregelende stoffen niet principieel anders benaderd dient te worden dan die van andere stoffen die ecotoxologische effecten kunnen veroorzaken. Dit betekent dat hormoonontregeling ingebracht kan worden in de daarvoor bestemde stofbeoordelingskaders. Daarvoor is het van belang betrouwbare testmethoden beschikbaar te krijgen om stoffen op hormoonontregelende kenmerken te kunnen screenen. Geconstateerd is dat het aantal geproduceerde (bestaande) stoffen zeer groot is en het toepassen van het risicobeleid op al deze stoffen tijdrovend en duur is.

Het ministerie van VROM is begonnen met het programma 'Beleidsvernieuwing stoffen', ook wel 'Strategie omgaan met stoffen' genoemd. Van deze nieuwe strategie voor het omgaan met stoffen zullen hormoonontregelende stoffen ook deel gaan uitmaken. Omdat in Nederland weinig veldonderzoek is verricht naar de mogelijke effecten van hormoonontregelaars in ecosystemen adviseert de Gezondheidsraad de deels al bestaande monitoringprogramma's naar dit soort stoffen uit te breiden met een aantal specifiek voor dit doel ontwikkelde testmethoden. Hierbij wordt opgemerkt dat er geen beproefde blauwdruk van aanpak bestaat, maar dat dit veldonderzoek een iteratief proces van samenwerking tussen verschillende disciplines vereist, waarbij stapsgewijs moet blijken welke aanpak de meest effectieve is. Verder beveelt de Gezondheidsraad aan veldonderzoek te richten op specifieke bronnen, zoals mest.

Nationale onderzoeksactiviteiten

In Nederland zijn bij het onderzoek naar hormoonontregelende stoffen diverse disciplines van onderzoeksinstituten van overheid, onderwijs en bedrijfsleven betrokken. In 1996 en 1998 zijn op initiatief van Rijkswatersraat twee nationale studiedagen gehouden. De verslagen hiervan geven een goed beeld van de actuele ontwikkelingen in Nederland (Leonards, 1996; Vethaak, 1999). In het laatste verslag wordt de lezer tevens geïnformeerd over het vorig jaar opgerichte Nederlands Onderzoekers Platform 'Hormoonontregelaars' (LOPES). Eén van de taken van dit platform, waarin de meeste belanghebbenden op dit terrein participeren, is het coördineren en prioriteren van het benodigde onderzoek. Een eerste aanzet voor chemische en biologische effectmetingen voor oestrogeen-actieve stoffen in het Nederlandse watermilieu wordt op nationaal niveau

momenteel gerealiseerd in het 'Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES)' en in Europees verband in het onderzoekprogramma 'COMmunity Programme of Research on Environmental Hormones and Endocrine Disrupters (COMPREHEND)' (zie kader).

De centrale vraag bij het LOES-project is of in Nederland oestrogene effecten op vispopulaties optreden ten gevolge van de aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen in watersystemen. In het project wordt de aanwezigheid van potentiële (xeno)-oestrogene stoffen in diverse matrices van regenwater, leidingwater, zoet en zout oppervlaktewater, en al dan niet gezuiverd stedelijk of bedrijfsafvalwater in Nederland in kaart gebracht. Daarnaast worden in het laboratorium met *in vitro*- en *in vivo*-screeningstests potentiële en actuele effecten bepaald (zie het laatste artikel in dit drieluik). Verder worden bij in het veld verzamelde vis met specifieke biomarkers, zoals vitellogenine-inductie, oestrogene effecten en mogelijke verstoring van de reproductie geïnventariseerd. Ook zullen op een aantal (verdachte) locaties vissen of mosselen worden uitgehangen in kooien en gedurende enige tijd worden blootgesteld aan oppervlaktewater of biologisch gezuiverd afvalwater. Door toepassing van een combinatie van gelijktijdige stof- en effectgerichte monitoring moet duidelijk worden welk gedeelte van de geconstateerde effecten verklaard kan worden door de aanwezigheid van de hormoonontregelende stoffen.

Het LOES-programma wordt onder auspiciën van Rijkswaterstaat uitgevoerd door een groot aantal onderzoeksinstituten en laboratoria (onder andere Instituut voor Milieu-vraagstukken, Wageningen Universiteit sectie Toxicologie, Universiteit van Amsterdam vakgroep Milieu- en Toxicologische Chemie, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Tauw BV, AquaSense, Rijksinstituut voor Visserij-Onderzoek Universiteit Utrecht, veterinaire faculteit RITOX en het Hubrecht laboratorium). De samenwerkende Rijn- en Maaswaterleidingbedrijven (RIWA), het RIVM, Wetterskip Fryslân en het RIKZ en RIZA financieren het programma. Daar waar mogelijk vindt integratie plaats van het LOES-programma met het EU-onderzoekprogramma COMPREHEND. Binnen dit laatste driejarig durende programma, waaraan door 13 onderzoeksinstituten (waaronder RIZA) in negen Europese landen wordt bijgedragen, zal de ernst van de huidige situatie in Europa nader geïnventariseerd worden.

Ter voorbereiding van het LOES-programma is in 1997-1998 een voorstudie uitgevoerd, waarbij een eerste indruk is verkregen van de aanwezigheid van enkele

COMPREHEND is de afkorting van 'the COMmunity Programme of Research on Environmental Hormones and Endocrine Disruptors'. Het is een door de Europese Unie medegefinancierd onderzoeksprogramma op het gebied van hormoonontregelaars in het aquatisch milieu. Het wordt uitgevoerd door het consortium Euraqua, een samenwerkingsverband van nationale waterinstituten, waaronder het RIZA in Nederland. In de tien landen (zie kaartje) wordt onderzoek verricht naar onder meer hormoonontregelaars in representatieve effluënten van industrie en rioolwaterzuiveringsinstallaties, worden probleemstoffen geïdentificeerd, effecten op 'wildlife' gezocht op het niveau van populatie-ontwikkeling en screeningsinstrumenten ontwikkeld en gestandaardiseerd. Het COMPREHEND-programma loopt tot en met 2002. Een eerste overzicht van de resultaten wordt in de loop van dit jaar verwacht. Voor meer informatie kunt u contact opnemen met C. v.d. Guchte en A. Gerritsen van het RIZA in Lelystad.



(xeno)-oestrogene stoffen en de oestrogene potentie in watersystemen en afvalwater (Belfroid e.a., 1999). De resultaten kunt u lezen in de twee volgende artikelen.

LITERATUUR

- Belfroid A., Murk T., de Voogt P., Schäfer A., Rijs G. en D. Vethaak (1999). Hormoonontregelaars in water. Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland. RIZA/RIKZ-rapport 99.007/99.024 (in druk).
- Colborn T. en C. Clement (1992). *Advances in modern environmental toxicology* (vol. 21). Princeton Scientific Publishing Co.
- CSTEE (1999) Opinion on human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods. Report of the working group on endocrine disrupter of the Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) of DG XXIV, Consumers Policy and Consumer Health Protection.
- Desbrow C., Routledge E., Brighty G., Sumpter J. en M. Waldock (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, pagina 1549-1558.
- Gezondheidsraad (1997). Hormoonontregelaars en de humane voortplanting en ontwikkeling. Hormoonontregelaars in de mens. Publicatienummer 1997/08.
- Gezondheidsraad (1999). Hormoonontregelaars in ecosystemen. Publicatienummer 1999/13.
- Jobling S., Tyler C., Nolan M. en J. Sumpter (1998). The identification of estrogenic effects in wild fish. R & D technical report W119, Environment Agency, Bristol.
- Koeman J., Ten Oever den Brauw M. en R. de Vos (1969). Chlorinated biphenyls in fish, mussels and birds from the river Rhine and the Netherlands coastal area. *Nature* nr. 221, pagina 1126-1128.
- Legler J. en T. Murk (1999) voorstudies Landelijk Onderzoek Oestrogene Stoffen. Interne notitie Wageningen Universiteit/RIZA.
- Leonards P., Vethaak A. en P. de Voogt (1996). Oestrogeen-actieve stoffen in het milieu. RIKZ/SENSE.
- Matthiessen P., Allen Y., Alchini C., Feist S., Kirby M., Law R., Scott A., Thain J. en K. Thomas (1998). Oestrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus* L.) from United Kingdom estuarine and marine waters. *Sci. Ser. Tech. Rep.*, CEFAS, Lowestoft (1997).
- Routledge E., Sheehan D., Desbrow C., Brighty G., Waldock M. en J. Sumpter (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW Effluent 2. *in vivo*-responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, pagina 1559-1565.
- Sumpter J. en S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for oestrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103: (suppl. 7), pagina 173-178.
- Vethaak D., van der Burg B., Rijs G. en A. Brouwer (1999). Proceedings of symposium 'Endocrine disrupting compounds: wildlife and human health risks' (in druk).
- VROM (1999). Notitie hormoonontregelende stoffen. DGM/SVS/ 99182381.



Speuren naar (xeno)oestrogene sporen

A. BELFROID, VRIJE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, INSTITUUT VOOR MILIEUVRAAGSTUKKEN
P. DE VOOGT, UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, VAKGROEP MILIEU EN TOXICOLOGISCHE CHEMIE

E. VAN DER VELDE, RIJSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU

G. RIJS, RIJSINSTITUUT VOOR INTEGRAAL ZOETWATERBEHEER EN AFVALWATERBEHANDELING

In een voorstudie is een eerste indruk gekregen van de aanwezigheid van enkele verdachte hormoonontregelaars in watersystemen in Nederland. De resultaten tonen aan dat natuurlijke oestrogene hormonen en xeno-oestrogene stoffen van niet natuurlijke oorsprong in afvalwater voorkomen. Ook in oppervlaktewater werden natuurlijke oestrogene hormonen en bisfenol-A aangetroffen, terwijl ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) voornamelijk in zwevend stof en sediment gevonden werden. Deze resultaten maken duidelijk dat een uitgebreide 'baseline'-studie van hormoonontregelende stoffen in Nederland noodzakelijk is.

Wereldwijd worden verschillende stoffen geïdentificeerd die als potentieel verdacht worden aangemerkt voor hormoonontregeling. Dit kunnen stoffen zijn die in diverse industriële productieprocessen worden toegepast, maar ook de natuurlijke oestrogene hormonen die worden uitgescheiden door mens en vee en het synthetische 17 α -ethinyloestradiol, dat in de anticonceptiepill wordt toegepast. Het doel van de voorstudie (Belfroid e.a., 1999), uitgevoerd in het najaar van 1997, was om de beschikbare chemische en biologische analysemethoden in diverse milieumatrices te optimaliseren en vervolgens een eerste indruk te krijgen van de aanwezigheid van deze (xeno)-oestrogenen in afval- en oppervlaktewater in Nederland, alsmede het meten van de totale oestrogene potentie in dezelfde milieumonsters (zie het volgende artikel in dit drieluik).

Locatiekeuze

Bij de keuze van de meetlocaties voor het oppervlaktewater in de zoete, brakke en zoute Rijkswateren is zoveel mogelijk aangesloten bij het landelijk routinematig monitoringsonderzoek, dat jaarlijks door RIZA en RIKZ wordt uitgevoerd. Voor het afvalwater zijn de meetlocaties (stedelijk en industrieel) zo geselecteerd dat deze een zo goed mogelijke afspiege-

ling geven van de afvalwaterstromen in Nederland. Het stedelijk afvalwater betreft het influent en effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties. Het industrieel afvalwater is afkomstig van twee (biologische) afvalwaterzuiveringsinstallaties en van twee persleidingen van industrieterreinen. Doelbewust is niet gekozen voor afvalwaterstromen, waarvan op basis van de samenstelling een hoge concentratie van één van de te analyseren stoffen werd verwacht.

Resultaten

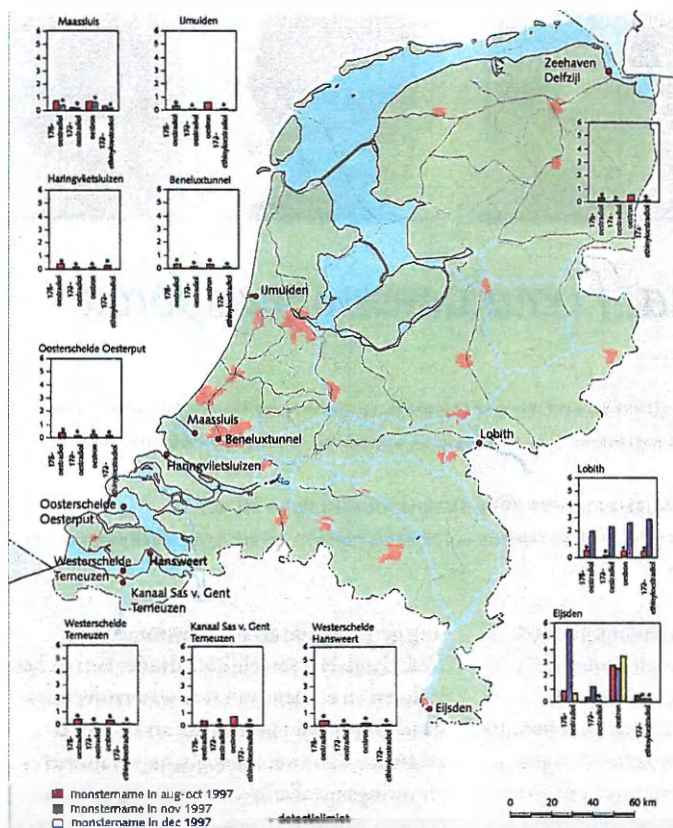
Oestrogene hormonen

Oestrogene hormonen (17 β - en 17 α -oestradiol, oestron en het synthetische 17 α -ethinyloestradiol) werden aangetroffen in oppervlaktewater in rivieren en kanalen nabij stedelijke agglomeraties, maar niet in open wateren waar veel verdunning optreedt (afb. 1). De oestrogene hormonen die veelvuldig werden aangetroffen in oppervlaktewater zijn de natuurlijke hormonen 17 β -oestradiol en oestron. De in Nederland aangetroffen gehalten zijn vergelijkbaar met die in de ons omringende landen.

In afvalwater werden naast 17 β -oestradiol en oestron ook de overige twee gemeten hormonen, 17 α -oestradiol en het synthetische 17 α -ethinyloestradiol, aangetroffen. In afbeelding 2 is het gehalte van 17 β -oestradiol in afvalwater weergegeven; voor de andere oestrogene hormonen werd een vergelijkbaar patroon gevonden. De gegevens tonen dat oestrogene hormonen voornamelijk in huishoudelijk afvalwater voorkomen. De gehalten in het effluent van rwzi's zijn hierbij aanzienlijk lager dan in ruw rioolwater. De dataset is echter nog te gering om een uitspraak te doen over de verwijderingsefficiëntie.

Ftalaten

Ftalaten worden onder andere toegepast als weekmakers in plastics. Door wijdverbreide



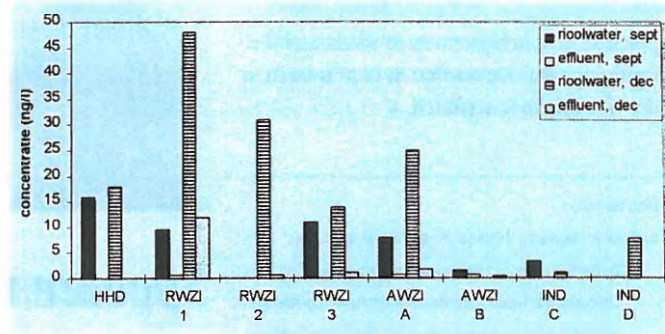
Afb. 1 Aanwezigheid van oestrogene hormonen (in ng/l) in oppervlaktewater in Nederland in 1997.

toepassing en uitloging kunnen ftalaten overal in het milieu aangetroffen worden. In de voorstudie bleek het mogelijk om deze groep van stoffen in alle matrices (leidingwater, oppervlaktewater, sediment, zwevend stof, mosselen, afvalwater en zuiveringsslib) te kunnen aantonen.

In oppervlaktewater werden gehalten aangetroffen die lagen in de orde van $\mu\text{g/l}$.

gegeven in tabel 1. Hieruit blijkt dat de meest algemeen voorkomende ftalaat de hydrofobe di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP) is.

Gehalten in effluenten van rwzi's liggen in dezelfde orde van grootte als in oppervlaktewater en zijn veel lager dan in ongezuiverd afvalwater. Ftalaten lijken zowel in huishoudelijk als industrieel afvalwater in gelijke mate voor te komen. De aangetroffen gehalten in



Afb. 2 Gehalten (in ng/l) aan 17β-oestradiol in vijf rwzi's en drie rioolpunten in 1997. HHD is ruw rioolwater van een woonwijk. RWZI 1-3 zijn stedelijke rwzi's. AWZI A en B zijn industriële awzi's en IND C en D zijn locaties voor rioolwater van twee industrieterreinen.

Veel hogere gehalten werden echter aangetroffen in zwevend stof en sediment (tot 30.000 $\mu\text{g/kg}$ droge stof). Dit houdt verband met het hydrofobe karakter van veel ftalaten. Een overzicht van het voorkomen van

Nederland zijn vergelijkbaar met die in ons omringende landen.

Bisfenol-A

Bisfenol-A wordt eveneens gebruikt bij de productie van plastics en in epoxyharsen. Het algehele beeld is dat de concentraties bisfenol-A in rivieren en bij riviermondingen hoger lagen dan op de overige locaties (gemiddeld rond 40 ng/l tegenover elders 4 ng/l) (afb. 3).

In afvalwater was het bisfenol-A gehalte veel hoger; in ruw rioolwater gewoonlijk tussen de 200 en 1000 ng/l, in het effluent van een rwzi/awzi een factor 10 lager. Ook in zuiveringsslib werd bisfenol-A regelmatig aangetroffen. Gehaltes liepen daarin op tot 7000 ng/l (270 $\mu\text{g/kg}$ droge stof). Er zijn weinig meetgegevens over bisfenol-A in oppervlakte- of afvalwater uit de ons omringende landen beschikbaar, zodat een vergelijking niet mogelijk is.

APEO's

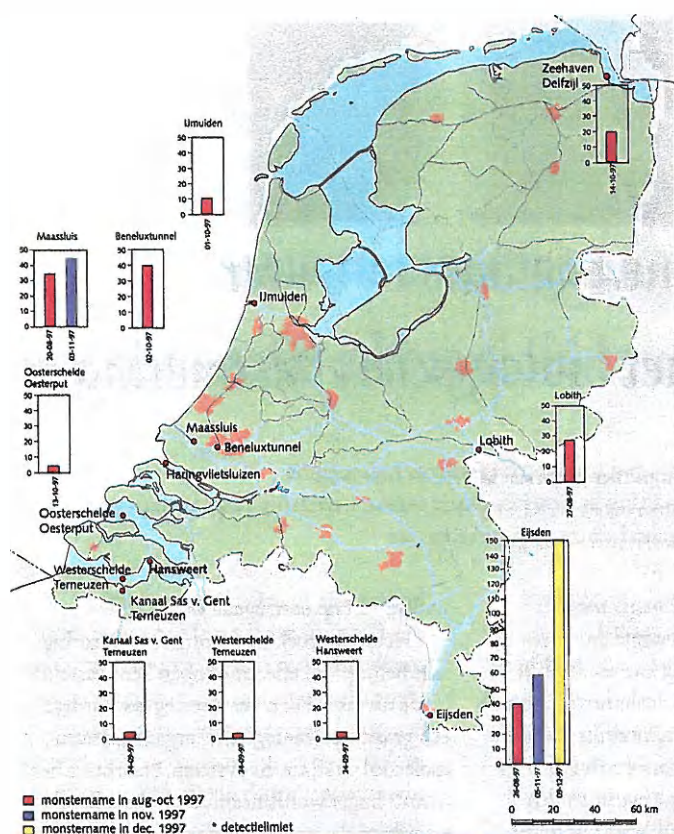
Alkylfenolethoxylaten (APEO's) zijn oppervlakte-actieve stoffen die onder andere in industriële reinigingsmiddelen worden toegepast. Ze vormen een groep van verbindingen met verschillende eigenschappen (zie ook kader). Nonylfenol (NP), de belangrijkste alkylfenol (AP), is een grondstof voor de APEO-productie en wordt tevens als stabilisator in plastics gebruikt. In deze studie zijn in zwevend stof en sediment APEO-gehalten van 8 $\mu\text{g/kg}$ droge stof (tabel 2) aangetroffen, terwijl in oppervlaktewater het gehalte zelfs op relatief verontreinigde locaties onder de detectielimiet bleef.

In afvalwater, met name industrieel afvalwater, werden relatief hoge gehalten APEO's aangetroffen in de orde van $\mu\text{g/l}$ tot zelfs mg/l. Zoals uit tabel 2 blijkt zijn de gehalten in effluent van rwzi/awzi aanzienlijk lager dan in influent. Dit duidt op omzetting van de oorspronkelijke verbindingen en/of adsorptie aan slib in een rwzi (zie kader). Ook in zuiveringsslib werden hoge gehalten NPEO's en NP aangetroffen. Op een enkele locatie werden ook

Tabel 1: Concentratie ranges (in $\mu\text{g/l}$ of $\mu\text{g/kg}$ droge stof) van zes ftalaten in diverse milieumatrices (1997).

	DMP ¹⁾	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP
leidingwater	<d.l.	<d.l.-0,1	0,2 - 2,3	<d.l.	0,4 - 3,5	<d.l.
milieumatrices						
oppervlaktewater	<d.l.-0,5	<d.l.-2,6	<d.l.-0,7	<d.l.	0,04 - 1,9	<d.l.
sediment	<d.l.	<d.l.-33	<d.l.-114	<d.l.-56	106 - 2866	<d.l.
zwevend stof	<d.l.-58	22 - 40	98 - 1500	<d.l.-705	590 - 27000	<d.l.
biota	<d.l.	58 - 660	190 - 4380	<d.l.-1730	<d.l.-8040	<d.l.
stedelijk afvalwater						
influent/rioolwater	1,1 - 4,6	7 - 30	1,8 - 5,6	0,3 - 2,0	8,7 - 27	<d.l.-0,4
riool-/zuiveringsslib	<d.l.-430	<d.l.-1500	690 - 1100	<d.l.-2300	1600-98000	<d.l.-2000
effluent	0,2	0,4 - 1,8	0,8 - 2,1	<d.l.	1,0 - 2,9	<d.l.
industrieel afvalwater						
influent/rioolwater	0,3 - 1,9	1,0 - 77	1,0 - 9,6	<d.l.-0,5	<0,4 - 26,3	<d.l.-0,4
riool-/zuiveringsslib	<d.l.-580	<d.l.-2800	720 - 3200	<d.l.-990	8000-258000	<d.l.-17000
effluent	0,1 - 0,3	1,2 - 1,4	0,6 - 0,8	<d.l.	0,7 - 4,1	<d.l.

1) DMP = dimethylftalaat, DEP = diethylftalaat, DBP = di-n-butylftalaat, BBP = butylbenzylftalaat, DEHP = di(2-ethylhexyl)ftalaat, DOP = di-n-octylftalaat.



Afb. 3 Aanwezigheid van bisfenol-A (in ng/l) in oppervlaktewater in Nederland in 1997.

octylfenoethoxylaten in het slib aangetoond.

De gehalten van NP en NPEO's in oppervlaktewateren in Nederland liggen volgens de studie uit 1997 over het algemeen lager dan elders in Europa en Noord-Amerika zijn gemeten. De in deze studie gemeten concentraties in afvalwater komen goed overeen met de in de literatuur gerapporteerde ranges. De gemeten waarden in effluenten van rwzi en awzi's liggen in tegenstelling tot de ons omringende landen doorgaans in het lage gebied van deze concentratieranges.

Algemene patronen van voorkomen hormoonontregelaars

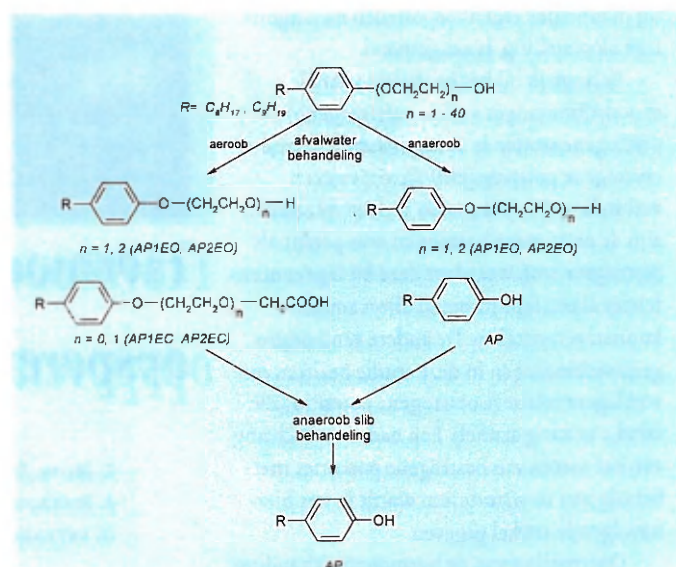
Samengevat kan worden gesteld dat in oppervlaktewater alle onderzochte stoffen worden aangetroffen en dat daarbij oestrogene hormonen en bisfenol-A voornamelijk opgelost aanwezig zijn, terwijl ftalaten en APEO's zich voornamelijk bevinden in zwevend stof en sediment.

In ongezuiverd afvalwater zijn alle verbindingen die in deze voorstudie zijn betrokken, meerdere malen aangetroffen. Gehalten waren relatief laag voor de hormonen (tot 150 ng/l), terwijl voor de andere verbindingen bisfenol-A, ftalaten en APEO's gehalten lagen in de orde van enkele tot tientallen µg/l. In effluenten van rwzi/awzi's waren de gehalten van deze verbindingen vergelijkbaar of hoger met die van oppervlaktewater. Hormonen werden zoals verwacht vooral aangetroffen in stedelijk afvalwater, terwijl APEO's en bisfenol-A meer lijken

voor te komen in industrieel afvalwater. Overigens is het van belang op te merken dat het hier om slechts een kleine selectie meer campagne gaat. Het is dan ook belangrijk de resultaten in dit licht te zien: een eerste inventarisatie van de aanwezigheid van potentieel verdachte (xeno)-oestrogene stoffen in diverse milieumatrices in Nederland.

Tabel 2: Concentratie ranges (in µg/l of mg/kg droge stof van nonylfenoethoxylaten (NPEO's) en nonylfenol (NP) in diverse milieumatrices in 1997.

	NPEO	NP
milieumatrices		
oppervlaktewater	<d.l.	<d.l. - 0,14
sediment	2,6 - 5,7	0,63 - 1,70
zwevend stof	0,70 - 8,0	0,21 - 0,62
stedelijk afvalwater		
influent/rioolwater	2,1 - 170	<d.l. - 23
riool-/zuiveringsslib	0,7 - 2400	<d.l. - 125
effluent	<d.l. - 6,1	<d.l. - 1,0
industrieel afvalwater		
influent/rioolwater	20 - 2270	<d.l. - 400
riool-/zuiveringsslib	<d.l. - 1400	<d.l. - 2500
effluent	0,9 - 15	<d.l. - 1,2



Afb. 4 Aërobe en anaërobe transformatie van alkylfenoethoxylaten (Thiele e.a., 1997)

De oplosbaarheid in water van NPEO neemt af met een afnemend aantal ethoxylaateenheden. Als gevolg hiervan hebben nonylfenol en de lagere oligomeren de neiging te zich te verplaatsen naar een lipofiele omgeving, zoals slib sediment en biota. Nonylfenol is zeer slecht oplosbaar in water.

Tussen het lozingspunt en het moment dat het afvalwater de rwzi bereikt worden de hogere goed in water oplosbare oligomeren (met $n_{EO} > 8$) al deels omgezet in de lagere, slecht in water oplosbare verbindingen. Zo kan in ruw rioolwater een relatieve aanrijking van de lagere oligomeren worden waargenomen. In de rwzi vindt een verdere omzetting plaats waardoor de hogere oligomeren vrijwel geheel verdwijnen ten gunste van de omzettingen producten (zie afbeelding 4). Deze producten zijn resistent tegen verdere biologische afbraak en verlaten de rwzi gedeeltelijk via het effluent. Het grootste gedeelte van de gevormde lagere oligomeren (NP1EO, NP2EO en NP) adsorbeert door hun lipofiele karakter echter aan het slib. In anaëroob slib is verdere omzetting van NP1EO en NP2EO tot NP aangetoond. (Giger e.a., 1984)

Wat betekent dit?

Hormonen en andere hormoonontregelende stoffen kunnen worden aangetoond in Nederlandse watersystemen en afvalwater. De gehalten liggen in de orde van ng/l voor de oestrogene hormonen tot µg/l voor de xeno-oestrogene verbindingen. Voor de natuurlijke hormonen waren de gemeten gehalten weliswaar laag, maar bevonden zich op een aantal locaties boven het effectniveau van 0,3 ng/l. Dit is de drempelwaarde waarbij één van de hormoonontregelende kenmerken, de oestrogeen-gestuurde aanmaak van dooierewit/vitellogenine

bij mannelijke regenboogforellen na langdurige blootstelling, is aangetoond.

Belangrijk bij het beoordelen van de concentratieranges van de overige (xeno)-oestrogene stoffen is de zogenaamde relatieve oestrogene potentie (EEF-factor) van een verbinding. Zoals de naam al doet vermoeden zijn de oestrogene hormonen zeer potent als oestrogene stof, waardoor deze bij lage concentraties al een feminiserend effect zouden kunnen veroorzaken. De andere xeno-oestrogene verbindingen in deze studie bezitten een veel lagere relatieve oestrogene potentie. (Zie tabel 2 in vorig artikel). Een nadere toelichting van het meten van oestrogene potenties met behulp van *in vitro*-testen wordt in het hiernavolgende artikel gegeven.

Ontregeling van de hormoonhuishouding door (xeno)-oestrogene stoffen in een organisme wordt bovendien niet alleen door de potentie van een stof en de concentratie in het milieu bepaald, maar ook door het milieuecologische gedrag van deze stof, haar biologische beschikbaarheid en de kinetiek en afbraak in het organisme zelf. Al deze gegevens zijn nog grotendeels onbekend voor de (xeno)-oestrogene stoffen in deze studie. Of de gemeten concentratieniveaus aan (xeno)-oestrogene stoffen ook werkelijk kunnen resulteren in ecologische consequenties kan op basis van deze studie dan ook niet worden bepaald. Hiervoor is inzicht noodzakelijk in de relatie tussen gehalten van hormoonontregelende stoffen en in het veld geconstateerde effecten, alsmede inzicht in de betekenis van deze effecten op populatie- en ecosysteemniveau. Evenmin kan op basis van de gemeten gehalten (xeno)-oestrogene stoffen in oppervlaktewater en afvalwater een uitspraak worden gedaan over de risico's van deze stoffen in het Nederlands milieu. Voor beide vragen zijn aanvullende studies nodig.

LITERATUUR

- Ahel M., Giger W. en M. Koch (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28 (5), pagina 1131-1142.
- Belfroid A., Murk T., de Voogt P., Schäfer A., Rijs G. en D. Vethaak (1999). Hormoonontregelaars in water. Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland. RIZA/RIKZ-rapport 99.007/99.024 (in druk).
- Giger W., Brunner P. en C. Schaffner (1984). 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225, pagina 623-625.
- Thiele B., Gunther K. en M. Schwuger (1997). Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. *Chem. Rev.* 97, pagina 3247-3272.



Hormoonontregelaars in water opsporen met biologische effectmetingen

T. MURK, WAGENINGEN UNIVERSITEIT, SECTIE TOXICOLOGIE

A. BELFROID, VRIJE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, INSTITUUT VOOR MILIEUVRAAGSTUKKEN

D. VETHAAK, RIJSINSTITUUT VOOR KUST EN ZEE

Van sommige in Nederland voorkomende milieuverontreinigingen is bekend dat ze een hormoonverstorende werking kunnen hebben. Er wordt met name veel aandacht besteed aan stoffen die de werking van vrouwelijke hormonen kunnen nabootsen, de xeno-oestrogenen. De groep van verdachte xeno-oestrogene stoffen groeit nog steeds. Onduidelijk is wat de totale verstoring van alle stoffen samen is. Door gebruik te maken van biologische effectmetingen wordt het mogelijk de totale 'oestrogene potentie' van mengsels van stoffen te bepalen en onbekende (xeno)-oestrogene stoffen op te sporen.

Hiervoor worden zowel laboratoriumtesten met vissen (*in vivo*) als voor dit doel ontwikkelde *in vitro*-testen met speciaal gekweekte cellen gedaan. Het is ook mogelijk om in natuurlijke vispopulaties biomarkers voor oestrogene effecten te bepalen. In een voorstudie voor LOES (Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen) zijn de voor- en nadelen van een aantal *in vitro*-testen met elkaar vergeleken. De gemeten oestrogene potentie is, vergeleken met de berekende oestrogene potentie, gebaseerd op gemeten chemische concentraties van enkele verdachte (xeno)-oestrogene stoffen.

Ontregeling van geslachtshormonen zou een serieuze bedreiging kunnen vormen voor de voortplanting en daarmee voor het voortbestaan van soorten. Door het wegvallen van diersoorten kunnen natuurlijke evenwichten in kwetsbare ecosystemen ontregeld raken en dit kan op zijn beurt weer het voortbestaan van andere soorten onder druk zetten. De beschikbare kennis over hormoonontregeling is op dit moment nog zeer beperkt. Zo is er tot nu toe vrijwel uitsluitend aandacht besteed aan het chemisch meten van gehalten van een klein aantal zogenoemde (xeno)-oestrogenen. Waarschijnlijk nog maar een fractie van de potentiële problemstoffen is ook werkelijk

onderzocht op oestrogene werking.

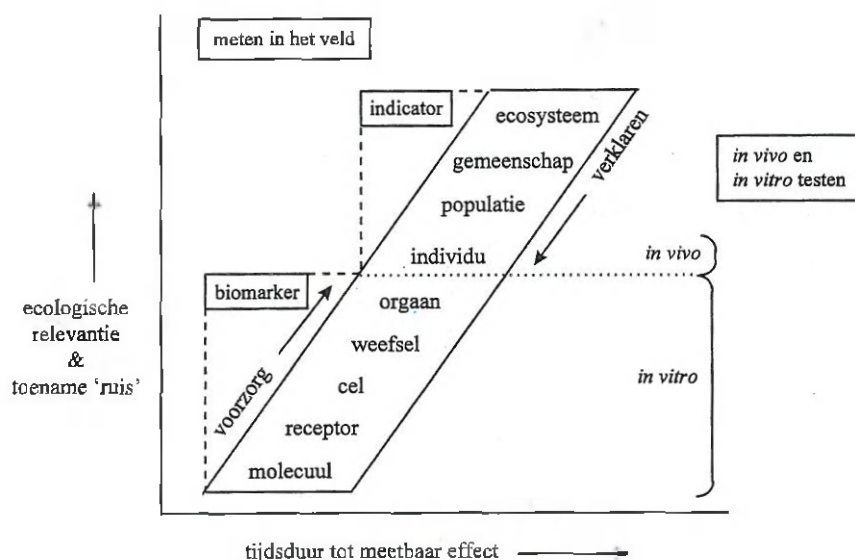
Het onderzoek naar hormoonverstoring met behulp van effectmetingen kent verschillende niveaus. Elk niveau vertegenwoordigt een graad van (biologische) organisatie van molecuul (stof) tot ecosysteem. Naarmate het niveau hoger wordt neemt de voorspellende waarde en daarmee de ecologische relevantie toe. Anderzijds neemt de verstoring door andere (fysiologische en ecologische) factoren ook toe en daarmee de mogelijkheid om een effect te koppelen aan een stofgroep juist af (afb. 1). Al naar gelang de doelstelling, kunnen verschillende niveaus worden ingezet voor effectmeting. De keuze wordt daarbij in belangrijke mate bepaald door de soort informatie die men wenst, het beschikbare budget en de termijn waarop een resultaat gewenst is.

Effectmetingen worden binnen LOES ingezet met verschillende doelstellingen. De oestrogene potentie van monsters uit verschillende milieu matrices van verschillende locaties worden bepaald met *in vitro*-testen. De vergelijking van deze resultaten met de chemisch vastgestelde concentraties aan (xeno)oestrogene stoffen zullen inzicht verschaffen in de aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen en de al dan niet corresponderende oestrogene potentie in het watermilieu. Hieruit kan men onder andere afleiden of er nog verder naar onbekende xeno-oestrogene stoffen moet worden gezocht.

Metingen aan natuurlijke vispopulaties moeten inzicht geven in de daadwerkelijke oestrogene effecten in de Nederlandse wateren. Experimenten waarbij vissen, op locatie en in het lab, worden blootgesteld aan biologisch gezuiverde effluënten zullen informatie verschaffen over de bijdrage van deze lozingen aan de in het veld waargenomen effecten.

Principes van de *in vitro*-testen

Om een indicatie te krijgen van de oestrogene potentie van stoffen in bepaalde milieu-matrices is het gebruik van *in vitro*-testen zeer



Afb. 1 De ecologische relevantie en tijdsduur totdat een effect gemeten kan worden bij meting van biologische effecten in het veld op verschillende niveau's van biologische organisatie. Rechts staat aangegeven op welk niveau *in vivo*- en *in vitro*-testen uitgevoerd kunnen worden, lokaal of in het lab met materiaal uit het veld. Bij risicobeoordeling wordt stapsgewijs het 'voorzorg'-traject gevolgd, terwijl voor het verklaren van daadwerkelijk waargenomen effecten in het veld het omgekeerde traject wordt doorlopen.

geschikt. De testen zijn snel, relatief goedkoop en er is meestal maar weinig materiaal nodig.

In het vooronderzoek voor LOES (Belfroid e.a., 1999a) zijn drie *in vitro*-testen toegepast: de 'estrogenreceptor'-bindingstest (Schwartz e.a., 1993), de 'yeast estrogen'-test (Routledge e.a., 1996) en de 'chemical activated luciferase gen expression'-test (Legler e.a., 1999a). In het kader van een STOWA-onderzoek (Belfroid e.a., 1999b) naar biomarkers voor oestrogeen-actieve stoffen is bovendien de E-screen (Soto, 1995) toegepast. De ER-bindingstesten en E-screen zijn uitgevoerd aan de Vrije Universiteit Amsterdam; de ER-calux en YES-testen door Wageningen Universiteit.

De genoemde testen meten alle vier verschillende aspecten van de effectketen van een stof die een cel binnenkomt en uiteindelijk tot oestrogene verstoring kunnen leiden. Ter toelichting is in afbeelding 2 het principe van de werking van een (xeno)-oestrogene stof beschreven. Wanneer (xeno)-oestrogene stoffen de celmembraan passeren, kunnen deze binden aan de oestrogeen-receptor in het cytosol van de cel. Vervolgens kan de receptor worden geactiveerd waarna een complex ontstaat van twee beladen receptoren aan elkaar. Dit complex migreert naar de celkern, waar het bindt aan een specifiek stukje DNA, het 'estrogen responsive element'(ERE). Bij het 'uitlezen' van DNA worden eiwitten gevormd zoals in een normale reactie op oestrogene hormonen in een vrouwjesdier. Een van de eiwitten die gevormd kunnen worden, is vitellogenine. Dit is een dooier-eiwit dat van nature alleen in de lever van vrouwelijke vissen wordt aangemaakt, maar bij blootstel-

ling aan (xeno)-oestrogene stoffen uit het omringende milieu ook door mannelijke vissen kan worden geproduceerd. Het vormt derhalve een goede indicator voor oestrogene effecten.

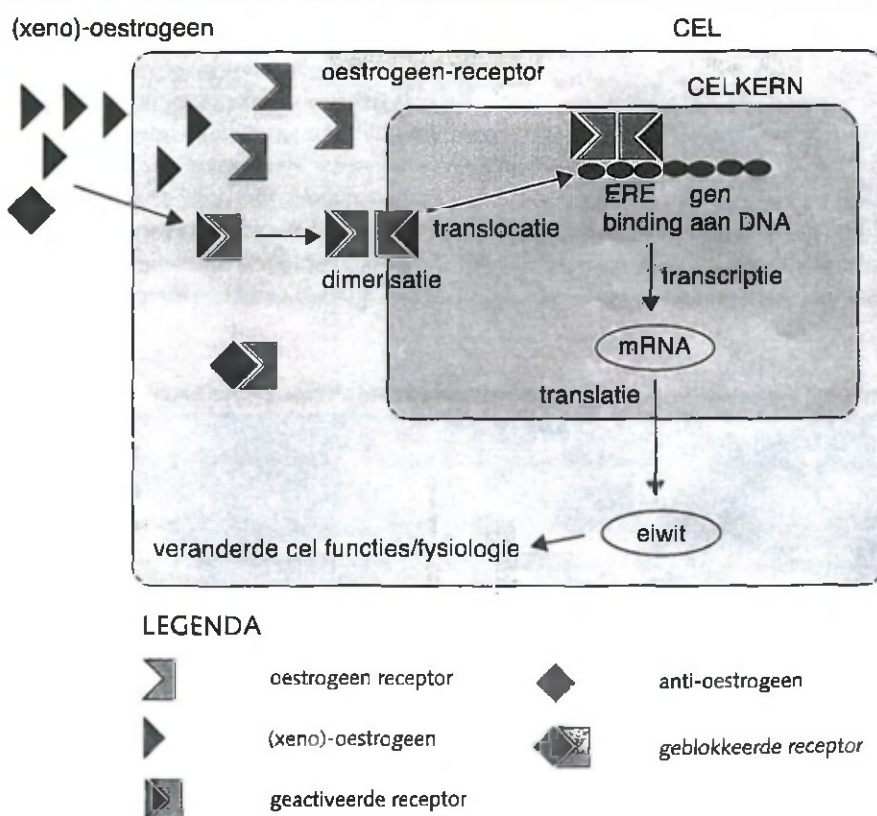
De oestrogeen-receptor-bindingstest (ER) geeft informatie over het binden van een stof aan een uit cellen geïsoleerde oestrogeen-

receptor. Geen informatie wordt gegeven over de activering of remming van de receptor. In de praktijk geven hierbij zowel actieve (xeno)-oestrogenen als anti-oestrogenen een positieve respons.

In de 'yeast estrogen'-test (YES) meet men de binding van een oestrogene stof aan een in de cel gebrachte humane oestrogeen-receptor (de gistcel heeft deze zelf niet) inclusief de activatie van deze receptor en het eveneens ingebrachte reporter-gen. Dit geeft dus een maat voor de stimulerende (agonistische) werking van de (xeno)oestrogenen. Doordat de gistcel een relatief moeilijk doorlaatbare celwand heeft, passeren zowel grotere moleculen als vrij lipofiele moleculen niet of nauwelijks de celmembraan. Als deze dus in het milieu-extract aanwezig zijn, zullen ze geen respons geven in deze test. Voor zover bekend geven stoffen met anti-oestrogene werking geen verlaging van de respons.

In de 'chemical activated luciferase gen expression'-test (ER-CALUX) wordt in een humane borstkankercellijn ook het hele proces van binding aan de receptor tot en met de activatie van de genen gemeten. Dit gaat ook op basis van het ingebrachte reporter-gen, maar de receptor zit van nature al in de cel. De respons is een resultante van zowel oestrogene en anti-oestrogene activiteit. Voor zover bekend passeren zowel hydrofiele als lipofiele stoffen zonder probleem de celwand. Dit betekent dat alle stoffen die in een extract aan de cellen worden aangeboden de celwand ook daadwerkelijk

Afb. 2 Principe van werkingmechanisme van natuurlijke oestrogenen en xeno-oestrogenen in een cel.



kunnen passeren. Ook kan er in de cellen omzetting van de stoffen plaatsvinden waardoor effecten van metabolieten (afbraakproducten) meegemeten kunnen worden.

De E-screen maakt gebruik van een borstkankercellijn die oestrogenen in het groei-medium nodig heeft om te kunnen delen. (Xeno)oestrogenen uit een milieu-extract zullen in principe dus ook de celgroei stimuleren. De E-screen is een relatief bewerkelijke *in vitro*-test, omdat onder andere controles moeten worden uitgevoerd op stoffen die mogelijk de groei van de cellen remmen.

Niet in de voorstudie meegenomen maar wel in het LOES-onderzoek wordt in een nieuw ontwikkelde *in vitro*-test de productie van het dooier-eiwit vitellogenine in celcultures van vissenlevers bepaald door blootstelling aan (xeno)-oestrogenen uit milieu-extracten. Deze test is weliswaar (nog) moeilijk uitvoerbaar, maar de vergelijkbaarheid met *in vivo*-testen, eveneens uitgevoerd met vissen, wordt hiermee eenvoudiger.

Resultaten vooronderzoek

Omdat de genoemde vier *in vitro*-testen nog niet eerder toegepast waren op de geselecteerde milieumonsters, moesten de voorbewerkingsmethoden van de monsters nog worden ontwikkeld. Waterige monsters werden na filteren over glasvezelfilters geëxtraheerd met een SDBXC-disk en geëluëerd met methanol. Zwevend stof, sediment en zuiveringsslib werden na vriesdrogen geëxtraheerd in een 'accelerated solvent extractor' met dichloormethaan/aceton (1:1). Alle extracten werden uiteindelijk in DMSO aan de *in vitro*-testen toegevoegd. In het vorige artikel was te lezen welke locaties zijn bemonsterd.

Prestatiekarakteristieken van de *in vitro*-testen

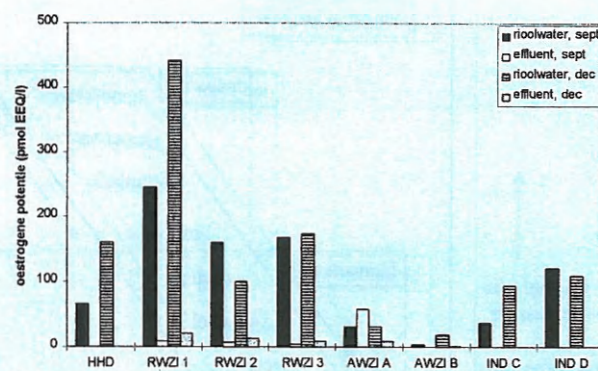
Alle *in vitro*-testen bleken goed te kunnen worden uitgevoerd met extracten van alle milieumonsters. De respons van deze tests worden steeds uitgedrukt ten opzichte van het natuurlijke oestrogene hormoon 17 β -oestra-

diol, als oestradiol equivalenten (EEQ's). Zoals verwacht is de oestrogene potentie, gemeten met de ER-bindingstest, veel hoger dan die gemeten met de andere testen. Dit komt doordat stoffen niet zoals bij levende systemen een celwand hoeven te passeren en binding van anti-oestrogenen op dezelfde wijze bijdragen aan het signaal als oestrogenen. De ER-CALUX en de YES-test geven resultaten te zien die vrij goed overeenkomen, hoewel de respons op de laatste test wat vaker onder de detectielimiet lag.

Doordat karakteristieken zoals detectielimiet, maximale inductiefactor en spreiding nogal verschillen tussen de *in vitro*-testen is ook de hoeveelheid monstermateriaal, die bewerkt moet worden, per test sterk verschillend. Tabel 1 geeft een overzicht van de hoeveelheden materiaal die gemiddeld nodig zijn om de oestrogene potentie goed te kunnen bepalen. In deze tabel is tevens de detectielimiet en benodigde blootstelduur weergegeven.

Oestrogene potentie in afvalwater

Zoals in afbeelding 3 te zien is verschilt de oestrogene potentie van het afvalwater sterk per monsterperiode. Voor gefiltreerd stedelijk rioolwater ligt de oestrogene potentie in de orde van grootte van 1 tot 300 pmol EEQ/l voor ER-CALUX en YES. Deze waarde van de oestrogene potentie is equivalent aan 0,3 tot 90 ng 17 β -oestradiol/l. Voor de ER-bindingstest bedroeg deze waarde 500 tot 2500 pmol EEQ/l. In de rwzi's vindt een aanzienlijk reductie plaats (met een factor tien tot 20), wat resul-



Afb. 3 Aanwezigheid van oestrogene potentie in afvalwater, gemeten met ER-CALUX in vijf rwzi/awzi's en in drie rioolputten. HHD is ruw rioolwater van woonwijk, RWZI 1-3 zijn stedelijke rwzi's, AWZI A en B zijn industriële awzi's en IND C en D zijn locaties voor rioolwater van twee industrieterreinen.

teert in lagere gehalten in effluent in de orde van grootte van 1 tot 30 pmol EEQ voor ER-CALUX en YES. De oestrogene potentie van het gefiltreerde rioolwater vanaf industrieterreinen ligt met 1 tot 75 pmol EEQ/l voor ER-CALUX en YES beduidend lager dan ruw stedelijk rioolwater. Ook zuiveringsslib bevat nog vrij veel oestrogene potentie.

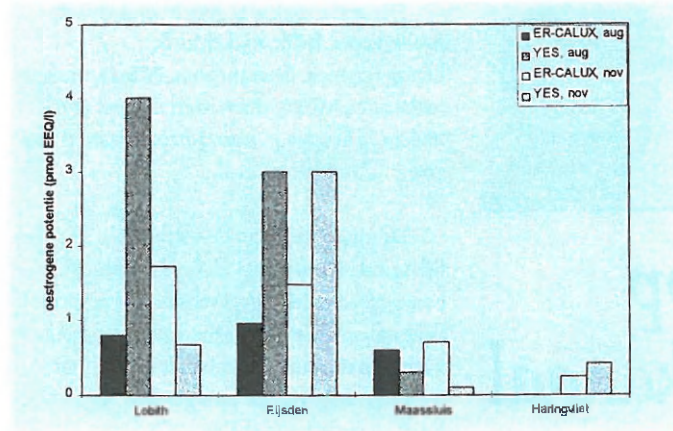
Deze gemeten responsen van de *in vitro*-testen zijn hoger dan wordt berekend op basis van chemisch gemeten gehalten. Deze gehalten aan individuele stoffen worden vermenigvuldigd met de relatieve oestrogene potentie (EEF) van deze individuele stoffen, waarna alle producten van de afzonderlijke stoffen in een mengsel bij elkaar worden opgeteld. Afhankelijk van het type screeningstest alsmede de matrix is het percentage van de oestrogene potentie, wat verklaard kan worden, wisselend. Zo is voor het effluent van een rwzi/awzi het berekende percentage van het chemisch verklaarde deel slechts 30 procent van de gemeten oestrogene potentie met de ER-CALUX. Dit betekent dat 70 procent van de gemeten oestrogene potentie waarschijnlijk veroorzaakt wordt door nog onbekende stoffen. Voor het influent is het chemisch te verklaren deel een factor twee groter. Een belangrijk deel van deze berekende oestrogene potentie wordt bepaald door de aanwezigheid van de oestrogene hormonen.

Oestrogene potentie in oppervlaktewater

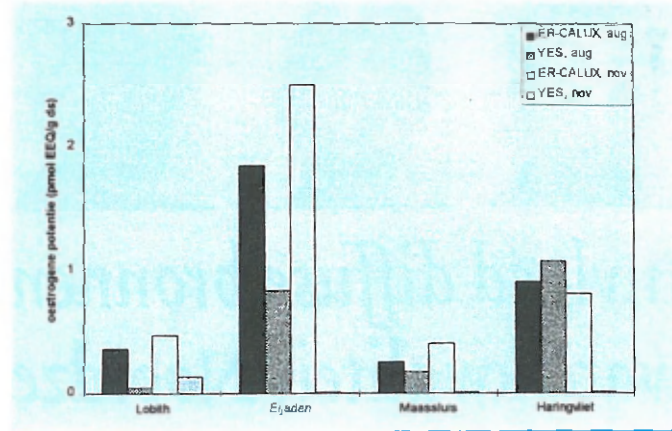
Ook in oppervlaktewater en zwevend stof blijkt de oestrogene potentie tussen de bemonsteringslocaties sterk te kunnen verschillen, maar ook de matrix waarin deze voorkomt (zie afb. 4 en 5). In oppervlaktewater is de oestrogene potentie over het algemeen laag: 0,1 tot 1,7 pmol EEQ/l voor ER-CALUX en waarden tot 4 pmol EEQ/l voor YES. Voor zwevend stof lag de oestrogene potentie tussen 0,1 en 2,5 pmol EEQ/g droog materiaal. Bij

Tabel 1 Enkele prestatiekarakteristieken en per matrix de hoeveelheid benodigd materiaal van vier *in vitro*-tests.

	ER-binding	YES	ER-CALUX	E-screen
blootstelduur	3 uur	3 dagen	1 dag	8 dagen
detectielimiet (pM)	1000	10	0,5	3,3
oppervlaktewater (ml)	± 950	60 - 250	6 - 30	15 - 90
zwevend stof (g)	± 1500	50 - 400	16 - 40	45 - 120
ruw rioolwater (ml)	± 400	4 - 100	0,2 - 2,5	0,6 - 7,5
effluent (ml)	± 400	10 - 100	0,9 - 9	3 - 18
zuiveringsslib (g)	± 150	5 - 40	0,5 - 4	1,5 - 12



Afb. 4 Aanwezigheid van oestrogene potentie in oppervlaktewater op vier locaties in Nederland, gemeten met ER-CALUX en YES.



Afb. 5 Aanwezigheid van oestrogene potentie in zwevend stof op vier locaties in Nederland, gemeten met ER-CALUX en YES.

Eijsden is de gemeten oestrogene potentie in zowel de waterige als vaste fractie over het al gemeen hoger dan bij de andere drie locaties. Met de ER-bindingsassay zijn de gemeten niveaus, indien deze boven de detectielimiet uitkwamen, altijd veel hoger (tot 10 pmol EEQ/l en 300 pmol EEQ/g droge stof voor respectievelijk de waterige fractie en zwevend stof) dan gemeten met de YES of ER-CALUX.

De berekende oestrogene potentie uitgaande van de chemisch gemeten gehalten van de individuele stoffen in oppervlaktewater waren enkele factoren hoger dan de daadwerkelijk gemeten responsen met de *in vitro*-testen. Mogelijke verklaring is dat de chemisch gemeten gehalten van de diverse stoffen in oppervlaktewater dicht tegen de detectielimiet liggen, waardoor de onzekerheid in de berekende potentie vrij groot wordt.

Betekenis van de resultaten

Zoals uit het vooronderzoek blijkt zijn in het Nederlandse milieu stoffen aanwezig met oestrogene potentie. Zelfs in rivierwater kon soms een oestrogene potentie worden gemeten die op het niveau lag van 1.1 pmol EEQ/l (equivalent aan 0,3 ng 17 β -oestradiol/l), het niveau waarbij in het laboratorium met oestrogene hormonen als zuivere stof is aangetoond dat bij mannelijke forellen vitellogenine productie optreedt. Of dit ook bij vissen in deze rivieren op zal treden is nog niet bekend, omdat niet precies bekend is welke stoffen deze oestrogene potentie vormen en of ze goed zullen worden opgenomen door vissen. Daarom is het van belang om naast *in vitro*-testen met extracten ook *in vivo*-experimenten met dezelfde extracten en niet-geëxtraheerd water uit te voeren. Een ecologisch relevantere parameter is een nadelig reproductie-effect op lokaal levende vissen met effecten op de populatie. Dit is methodisch echter vaak zeer moeilijk vast te stellen. In het LOES-project zal echter een goede schatting kunnen worden gemaakt van de risico's van de huidige niveaus

aan (xeno)oestrogene stoffen op de reproductie van vissen in Nederland. Tevens zal het de mogelijkheid bieden voor nadere biologische en ecologische validatie van de gebruikte screeningstesten.

De volgende validatiestappen zullen worden uitgevoerd:

- *in vitro*-respons met extracten (ER-CALUX, YES, vitellogenine-inductie in karperscellen),
- *in vivo*-respons met extracten (transgene zebravis). Zeer recentelijk is een transgene genetisch gemanipuleerde zebravis ontwikkeld in respons vergelijkbaar met de ER-CALUX. Hiermee kunnen in alle levensstadia van de vis de orgaanspecifieke effecten van oestrogeen-actieve stoffen bepaald worden (Legler, 2000),
- *in vivo*-respons met compleet water (life-cycle test met zebravis). Tijdens deze test worden zebravissen gedurende een hele levenscyclus bloot gesteld aan niet-geëxtraheerd water, waarbij de effecten op het voortplantingssucces van deze dieren en hun nakomelingen worden bekeken,
- biomarker-effecten door in kooien uittehangen vis (karpers en regenboogforel). Gekeken zal worden naar de vitellogenine-inductie na drie weken blootstelling. Daarnaast zullen bepaalde inteelt-karpers, waarvan de nakomelingen honderd procent mannelijk of honderd procent vrouwelijk zijn, lokaal worden uitgezet in kooien of blootgesteld onder laboratoriumomstandigheden. Deze dieren zijn zeer geschikt om naast vitellogenine-inductie de mate van interseksualiteit ten gevolge van de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen te bepalen
- en vitellogenine-inductie, histologisch onderzoek aan gonaden en afwijkingen aan geslachtsverhoudingen bij lokaal in het wild levende vissen.

Door de toenemende complexiteit wordt het met toenemende ecologische relevantie steeds moeilijker om de relatie met de chemisch bepaalde gehalten aan (xeno)-oestrogene stoffen vast te stellen. Door de chemisch-biologische geïntegreerde benadering in het LOES-project zal het echter mogelijk zijn na ecologische validatie van de *in vitro*-testen voor bepaalde matrices een grenswaarde aan te geven, waaronder geen nadelige oestrogene effecten te verwachten zijn.

LITERATUUR

- Belfroid A., Murk T., de Voogt P., Schäfer A., Rijs G. en D. Vethaak (1999a). Hormoonontregelaars in water. Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland. RIZA/RIKZ-rapport 99.007/99.024 (in druk).
- Belfroid A., van Hattum A. en J. Meerman (1999b). Pilot-studie biomarkers voor oestrogeen-actieve stoffen. STOWA-rapport (in druk).
- Legler J., van den Brink C., Brouwer A., Murk T., van der Saag P., Vethaak D. en B. van der Burg (1999a). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Tox. Sciences*, 48, pagina 55-66.
- Legler J., Broekhof J., Brouwer A., Lanser P., Murk T., van der Saag P., D. Vethaak en B. van der Burg (2000). Male reproductive organs are the main target for estrogens in novel transgenic zebrafish model. Submitted.
- Routledge E. en J. Sumpter (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Tox. Chem.* 15, pagina 241-248.
- Schwartz J. en D. Skafar. Ligand-mediated modulation of estrogen receptor conformation by estradiol analogs. *Biochemistry*, 32, pagina 10109-10115.
- Soto A., Sonnenschein C., Chung K., Fernandez M., Olea N. en F. Serrano (1995). The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103 Suppl 7, pagina 113-122.

