Hormoonontregelaars in water

Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland

Ministerie van Verkeer en Waterstaat

Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat

Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling/RIZA

Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ

Ministerie van Verkeer en Waterstaat Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat

VLIZ (vzw)
VLAAMS INSTITUUT VOOR DE ZEE
FLANDERS MARINE INSTITUTE
Oostende - Belgium

Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling/RIZA

Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ

5593

Hormoonontregelaars in water

Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland

A.C. Belfroid[1], A.J. Murk[2], P. de Voogt[3], A.J. Schäfer[4], G.B.J. Rijs[4] en A.D. Vethaak[5]

met bijdragen van J.H.N. Meerman[6], E.G. van der Velde[7] en J. de Boer[8]

[1] Instituut voor Milieuvraagstukken, Vrije Universiteit Amsterdam
[2] Wageningen Universiteit, Sectie Toxicologie
[3] Universiteit van Amsterdam, Vakgroep Milieu- en Toxicologische Chemie
[4] Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwater-behandeling/RIZA
[5] Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ
[6] Vrije Universiteit Amsterdam, Vakgroep Moleculaire Toxicologie
[7] RIVM, Laboratorium voor Organisch-analytische Chemie
[8] Rijksinstituut voor Visserijonderzoek

RIZA rapport: 99.007
RIKZ rapport: 99.024
ISBN: 9037952271

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

Summary

1	**Inleiding**	**3**
1.1	Aanleiding en voorgeschiedenis	3
1.2	Doel van het oriënterend onderzoek; leeswijzer	6
1.2.1	Doel	6
1.2.2	Leeswijzer	6
1.3	Locatiekeuze	7
1.3.1	Oppervlaktewatersystemen	7
1.3.2	Stedelijk en industrieel afvalwater	8
1.4	Keuze chemische parameters	10
1.5	Keuze *in vitro* assays	11
2	**Materiaal en methoden**	**15**
2.1	Monstername en conservering	15
2.2	Chemische analyses	18
2.2.1	Hormonen en bisfenol-A	18
2.2.2	Ftalaten	20
2.2.3	Alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten	23
2.3	*In vitro* assays	25
2.3.1	ER-bindingsassay	26
2.3.2	YES assay	28
2.3.3	ER-CALUX assay	30
3	**Resultaten**	**31**
3.1	Hormonen	31
3.1.1	Mogelijkheden en beperkingen van analysemethode	31
3.1.2	Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen	31
3.1.3	Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib	34
3.2	Bisfenol-A	36
3.2.1	Mogelijkheden en beperkingen van analysemethode	36
3.2.2	Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen	37
3.2.3	Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib	40
3.3	Ftalaten	40
3.3.1	Mogelijkheden en beperkingen van analysemethode	40
3.3.2	Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen	42
3.3.3	Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib	45
3.4	Alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten	48
3.4.1	Mogelijkheden en beperkingen van analysemethode	48
3.4.2	Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen	49
3.4.3	Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib	51
3.5	*In vitro* assays	54
3.5.1	Mogelijkheden en beperkingen van *in vitro* assays	54
3.5.2	Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen	57
3.5.3	Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib	59

4 Relaties tussen chemische analyses en *in vitro* assays **61**
4.1 Trends 61
4.2 Vergelijking tussen berekende en gemeten oestrogen potentie 63

5 Conclusies en aanbevelingen **67**
5.1 Conclusies 67
5.1.1 Logistiek en bruikbaarheid analysemethoden 67
5.1.2 Aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen en oestrogene potentie 68
5.2 Aanbevelingen 71

6 Referenties **73**

Bijlagen

Bijlage 1 Overzicht locaties en methode van bemonstering **79**

Bijlage 2 Meetgegevens oppervlaktewatersytemen (oppervlaktewater, zwevend stof, sediment en biota) **85**

Bijlage 3 Meetgegevens afvalwater en riool-/zuiveringsslib **99**

Voorwoord

In 1999/2000 zal Rijkswaterstaat (RIZA/RIKZ) in samenwerking met een groot aantal andere instituten een omvangrijk landelijk onderzoek naar oestrogeen-actieve stoffen uitvoeren: 'Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES). Dit baseline onderzoek heeft tot doel:
- Te inventariseren welke van de meest verdachte (xeno)oestrogeen-actieve stoffen in Nederland aanwezig zijn in diverse milieumatrices als zoet en zout oppervlaktewater, sediment, biota, regenwater, drinkwater en al dan niet gezuiverd industrieel/stedelijk afvalwater.
- Te inventariseren welke gevolgen voor de reproductie zich in welke mate voordoen in deze milieumatrices. Hiervoor worden o.a. in laboratorium specifieke *in vitro* testen uitgevoerd met extracten van milieumatrices.

Ter voorbereiding op het project LOES is in 1997/1998 een beperkte oriënterende studie uitgevoerd met de op dat moment operationele meetmethoden.

In dit rapport zijn de resultaten beschreven van deze oriënterende studie, waarvoor het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA) en het Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ) de opdracht gaven. Het onderzoek is onder leiding van Rijkswaterstaat uitgevoerd door een groot aantal instituten, te weten: het Instituut voor Milieuvraagstukken (IVM) van de Vrije Universiteit (logistiek, hormonen, bisfenol-A, ftalaten en extracties t.b.v. bio-assays), Vakgroep Milieu- en Toxicologische Chemie (MTC) van de Universiteit van Amsterdam (alkylfenolen in afvalwater/sediment), Sectie Toxicologie van de Wageningen Universiteit (WU-Tox) (ER-CALUX assay en YES-assay), afdeling Moleculaire Toxicologie van de Vrije Universiteit (ER-bindingsassay), Laboratorium voor Organisch-analytische Chemie van het RIVM-LOC (ftalaten) en het Rijksinstituut voor Visserijonderzoek (RIVO-DLO) (alkylfenolen in biota).
De 'Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer' (STOWA) heeft geparticipeerd in dit onderzoek door financiering van een deel van de ER-bindingsassays.

Aan dit onderzoek hebben de volgende personen meegewerkt: Rudy te Braak (TAUW), Peter Schout, Johan Jol en Ton van der Zande (RIKZ), Juliette Legler, Bert Spenkelink en Tinka Murk (LUW-Tox), John Meerman en Sylvia Lemstra (Moleculaire Toxicologie-VU), Pim de Voogt (MTC), Jacob de Boer (RIVO-DLO), Martin Könert (GKL), E. van der Velde (RIVM-LOC), Wilfried van Gogh en Ivo Freriks (RIZA), Wim Cofino (IVM/RIZA), Jan-Willem Wegener, Bert van der Horst, Ilse Burgers, Wendy Kockelkoren en Angelique Belfroid (IVM).
Projectleiders vanuit het RIZA waren Anneke Schäfer (oppervlakte-water) en Gerard Rijs (afvalwater). Projectleider vanuit RIKZ was Dick Vethaak.

Tenslotte willen de auteurs alle personen en instanties die op enigerlei wijze betrokken zijn geweest bij dit oriënterend onderzoek - zoals de medewerkers van de rioolwaterzuiveringsinrichtingen - bedanken voor hun inzet of de genoten gastvrijheid.

Samenvatting

Inleiding en achtergrond
De problematiek van hormoonontregelende stoffen in het milieu staat zowel in Nederland als internationaal momenteel volop in de belangstelling. Zowel natuurlijke hormonen als nog betrekkelijk onbekende milieuverontreinigende stoffen blijken de geslachtshormoonhuishouding van mens en dier zodanig te kunnen verstoren dat nadelige effecten op de ontwikkeling en voortplanting kunnen optreden. Causale verbanden tussen de aanwezigheid van potentieel hormoonontregelende stoffen in het milieu en eventuele effecten op voortplanting en nageslacht van mens en dier zijn over het algemeen moeilijk te leggen. Desondanks zijn bij vooral aquatische organismen (bepaalde soorten slakken, vissen en visetende vogels en zoogdieren) in Nederland en andere West Europese landen de laatste jaren verstoringen in de voortplanting gezien die verband kunnen houden met de blootstelling aan dergelijke stoffen. Ook de Gezondheidsraad ziet voldoende redenen voor bezorgheid over de aanwezigheid van stoffen in vooral het aquatische milieu die de geslachtshormoonhuishouding van organismen kunnen ontregelen en daardoor het voortbestaan van soorten in ecosystemen in gevaar kunnnen brengen. De eerste vragen die als gevolg van die bezorgdheid gesteld worden zijn uiteraard hoe het met de aanwezigheid van deze stoffen in Nederland is gesteld en wat de ernst en omvang is van de effecten die aan dergelijke stoffen toe te schrijven zijn.

Gezien de beperkte kennis over deze problematiek in ons land, is in 1997-1998 in opdracht van Rijkswaterstaat een eerste oriënterende studie naar de aanwezigheid van enkele hormoonontregelende (xeno-oestrogene) stoffen in oppervlaktewater en afvalwater uitgevoerd. In deze studie is met behulp van *in vitro* screenings-assays tevens gekeken naar de oestrogene potentie in deze watersystemen. Verder heeft deze studie de toepasbaarheid van de chemische analysemethoden van enkele (xeno)-oestrogen stoffen en de *in vitro* assays geëvalueerd. Het een en ander heeft geresulteerd in aanbevelingen ten behoeve van de uitvoering van een omvangrijk 'baseline'-onderzoek 'Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES)' in 1999/2000 naar het optreden van oestrogene effecten bij vispopulaties ten gevolge van de aanwezigheid van (xeno)-oestrogene stoffen in diverse aquatische compartimenten in Nederland.

Vooronderzoek
In het oriënterend onderzoek zijn de volgende stofgroepen in beschouwing genomen: natuurlijke oestrogene hormonen (oestron, 17α-en 17ß-oestradiol), het synthetische oestrogene hormoon 17α-ethinyl-oestradiol, en de chemische verbindingen bisfenol-A, ftalaten, alkylfenolen (AP) en alkylfenolethoxylaten (APE's). De oestrogene potentie is bepaald met een set van *in vitro* screeningsassays, namelijk de ER-bindingsassay, de YES-assay en de ER-CALUX.
De (xeno)-oestrogene verbindingen en de oestrogene potentie zijn bepaald in zoet en zout oppervlaktewater, zwevend stof, sediment en biota, en in al dan niet (biologisch) gezuiverd afvalwater en in riool-/zuiveringsslib. Aan de hand van de meetresultaten is gekeken naar mogelijke relaties

tussen de stofconcentraties van de chemische verbindingen en de oestrogene potentie in de *in vitro* assays.

In de herfst van 1997 zijn op 11 oppervlaktewater- en op 8 afvalwaterlocaties water- en slibmonsters genomen. De keuze van de meetlocaties voor oppervlakte- en afvalwater was er primair op gericht om een beter inzicht te verkrijgen in potentiële aandachtsgebieden ter voorbereiding voor het LOES-project; hierbij is doelbewust gekozen voor 'gemiddelde' locaties en zijn de meest verdachte situaties veelal vermeden. De keuze van de meetlocaties voor oppervlaktewater is beperkt geweest tot de Rijkswateren van het landelijk routinematig milieumeetnet. De meetlocaties voor afvalwater zijn zodanig geselecteerd, dat deze een zo goed mogelijke weergave geven voor afvalwaterstromen in de Nederlandse situatie. Afvalwatermonsters (influent, effluent en zuiveringsslib) werden genomen bij 5 biologische rioolwaterzuiveringsinrichtingen; t.w. 3 voor stedelijk afvalwater en 2 voor industrieel afvalwater. Daarnaast werd rioolwater en -slib bemonsterd afkomstig van een woonwijk en van twee industrieterreinen.

Logistiek en bruikbaarheid van toegepaste methoden

- Deze oriënterende studie heeft ons geleerd dat een veldstudie waarbij verschillende matrices worden aangeleverd door verschillende instanties met verschillende tussenpersonen, en waarbij de voorbewerking maar ook de uiteindelijke analyses voor zeer uiteenlopende verbindingen worden uitgevoerd door verschillende instituten uiteindelijk resulteert in een complex project dat een goede voorbereiding behoeft. De studie heeft ons tevens geleerd dat in het multidisciplinaire kader waarin gewerkt wordt een zeer gedetailleerde voorbespreking van alle methoden wenselijk is en dit vast te leggen in gestandaardiseerde protocollen voor o.a. de monstername, de voorbewerking en de analyse/bepalingsmethoden.
- De methode gebruikt voor de analyse van hormonen en bisfenol-A bleek geschikt voor de bepaling in oppervlaktewater en afvalwater, maar voor vaste matrix dient de methode verder geoptimaliseerd te worden. Ftalaten bleken voldoende gevoelig te kunnen worden geanalyseerd in zowel de opgeloste fractie als de vaste matrix. Ook alkylfenol(ethoxylaten) kunnen voldoende nauwkeurig worden geanalyseerd in beide fracties.
- De drie toegepaste *in vitro* assays bleken allen in staat om oestrogene potentie in de opgeloste fractie en vaste matrix te detecteren. Echter, uitgedrukt in oestrogene potentie, kunnen zij zeer uiteenlopende resultaten opleveren voor eenzelfde monster. De ER-CALUX en YES assay geven over het algemeen een vergelijkbare respons; de ER-bindingsassay duidelijk hoger. Mogelijke verklaring hiervoor is dat in de ER-bindingsassay zowel agonisten als antagonisten op dezelfde wijze bijdragen aan een respons. Verder is er geen natuurlijke barrière in de vorm van een celwand.
  De bepaling van oestrogene potentie met behulp van ER-CALUX en YES assay vindt daarentegen plaats binnen een cel, waarbij de oestrogene respons van de ER-CALUX een resultante is van de agonisten en antagonisten.
- Analyses van verbindingen in gedifferentieerde matrices zoals afvalwater en slib kunnen worden gedaan in de waterfractie, in de vaste fractie (zwevend stof of slibdeeltjes) of in beide. De keuze hangt in sterke mate af van de karakteristieken van de te bepalen verbinding alsmede van de (on)mogelijkheden van de analyse-

methode. In alle gevallen is een goede bepaling van de hoeveelheid van het vaste materiaal noodzakelijk.

Aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen en oestrogene potentie.
In onderstaande tabellen zijn de concentratie-ranges voor de gemeten (xeno)-oestrogene stoffen en de oestrogene potentie voor de *in vitro* assays per matrix gegeven.

Op basis van deze gemeten gehalten (xeno)-oestrogene stoffen en de oestrogene potenties kunnen (nog) geen uitspraken worden gedaan over de risico's van deze stoffen voor het Nederlands aquatisch milieu. Hiervoor is o.a. meer inzicht nodig in de relatie tussen de aanwezigheid van deze (xeno)-oestrogene stoffen en de optredende oestrogene effecten op (populaties van) dieren in deze watersystemen.

Tabel 0.1
Concentratie-ranges van oestrogene hormonen (som van 17α- en 17ß-oestradiol, 17α-ethinyloestradiol, oestron), bisfenol-A, totaal ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) per matrix.

matrix	oestrogene hormonen	bisfenol-A	totaal ftalaten	AP+APE
oppervlaktewater (ng/l)	< d.l. - 9	< d.l. - 160	100 - 5.500	< d.l. - 140
zwevend stof (µg/g ds)	-	< d.l.	0,7 - 30	1 - 8
sediment (µg/g ds)	-	< d.l.	0,1 - 3	3,2 - 7,2
biota (µg/g ds)	-	-	6 - 15	< d.l.
rioolwater/influent (ng/l)	5 - 200	250 - >2.000	1.000 - 70.000	3.000 - 8,1 x 10^6
effluent (ng/l)	< d.l. - 70	20 - 400	500 - 7.000	870 - 23.700
riool-/zuiveringsslib (µg/g ds)	-	< d.l. - 0,27	2,3 - 250	0,7 - 4.000

Tabel 0.2
Oestrogene potenties gemeten met ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay per matrix.

matrix	ER-CALUX	YES	ER-bindingsassay
oppervlaktewater (pmol EEQ/l)	0,25 - 1,7	< d.l. - 4	< d.l. - 9
zwevend stof (pmol EEQ/g ds)	0,2 - 2,5	< d.l. - 1	< d.l. - 300
sediment (pmol EEQ/g ds)	-	-	-
biota (pmol EEQ/g ds)	-	-	-
rioolwater/influent (pmol EEQ/l)	4 - 450	< d.l. - 300	< d.l. - 5.000
effluent (pmol EEQ/l)	0,1 - 60	0,3 - 60	< d.l. - 230
riool-/zuiveringsslib (pmol EEQ/g ds)	1,5 - 40	< d.l. - 2.750	350 - 2.000

Oppervlaktewatersystemen

- In zoet, brak en zout oppervlaktewater zijn de natuurlijke oestrogene hormonen, het synthetische hormoon en de potentiële xeno-oestrogene verbindingen bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) in een aantal gevallen aangetroffen.
  - De oestrogene hormonen worden vooral aangetroffen op locaties nabij stedelijke agglomeraties, maar niet in open wateren waar veel verdunning heeft kunnen optreden. De gemeten gehalten

zijn laag, maar liggen op enkele locaties wel boven een bepaald effectnivo (d.i. de drempelwaarde van oestrogeengestuurde aanmaak van dooiereiwit/ vitellogenine bij mannelijke regenboogforellen bij langdurige blootstelling). De hormonen 17ß-oestradiol en oestron werden het meest aangetroffen, terwijl de concentraties van 17α-oestradiol en 17α-ethinyloestradiol veelal onder de detectielimiet bleven. Uit de voorbehandeling met ß-glucuronidase is gebleken dat de hormonen vooral in de biologisch actieve vorm in oppervlaktewater aanwezig zijn.
  - Bisfenol-A werd in oppervlaktewater aangetroffen in concentraties tot 0,16 µg/l, maar werd niet gedetecteerd in zwevend stof en sediment. Ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) werden vooral in zwevend stof en sediment aangetroffen. De gehalten liepen hierbij op tot 27000 µg/kg DEHP en 8000 µg/kg nonylfenol-ethoxylaten. In biota werden ftalaten aangetroffen, doch geen alkylfenol(ethoxylaten). Voor deze laatste groep verbindingen is de huidige detectielimiet in biota te hoog om bij de aangetroffen concentraties in oppervlaktewater iets te kunnen meten.
- De oestrogene potentie -gemeten met *in vitro* asssays- in oppervlaktewater en zwevend stof kunnen sterk verschillen tussen de bemonsteringslocaties, maar ook tussen de matrices. In oppervlaktewater is de oestrogene potentie over het algemeen laag (0,25 - 1,7 pmol EEQ/l voor ER-CALUX; waarden tot 4 pmol EEQ/l voor YES). Voor zwevend stof lag de oestrogene potentie tussen 0,2-2,5 pmol EEQ/g droge stof. De oestrogene potentie, gemeten met de ER-bindingsassay, is -indien deze boven de detectiegrens uitkwam- altijd veel hoger (tot 10 pmol EEQ/l voor waterige fractie en tot 300 pmol EEQ/g droge stof voor zwevend stof).

Afvalwater en riool-/zuiveringsslib

- In al dan niet gezuiverd stedelijk- of industrieel afvalwater zijn de natuurlijke oestrogene hormonen, het synthetische oestrogene hormoon, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) in een groot aantal gevallen aangetroffen.
  - De totale gehalten aan oestrogene hormonen in ruw rioolwater en influenten van rwzi's variëren van 5-200 ng/l, waarbij 17ß-oestradiol en oestron het grootste deel vormen. Het gehalte aan 17α-ethinyloestradiol lag onder de 10 ng/l. In het gezuiverde effluent ligt het totale gehalte oestrogene hormonen onder de 70 ng/l. Hormonenglucuroniden zijn niet aangetroffen.
    De geselecteerde hormonen bevinden zich bijna uitsluitend in de opgeloste fractie van het afvalwater. Het gehalte aan oestrogene hormonen is in stedelijk afvalwater beduidend hoger dan in industrieel afvalwater.
  - De gehalten aan bisfenol-A liggen in industrieel en stedelijk afvalwater in dezelfde orde van grootte (250-2000 ng/l). Na zuivering in een rwzi/awzi is de concentratie bisfenol-A gereduceerd tot 20-400 ng/l. Het gehalte bisfenol-A in het vaste residu na filtratie (0,45 µm) van ruw rioolwater bedraagt minder dan 5%.
  - De twee meest voorkomende ftalaten in al dan niet gezuiverd afvalwater zijn DEP en DEHP, gevolgd door DMP en DBP.
    De gehalten DEP en DEHP bedroegen in ruw rioolwater tot 30 µg/l en waren na zuivering in rwzi/awzi gereduceerd tot minder dan 5 µg/l. De kleinste ftalaten DMP en DEP zijn voornamelijk opgelost; terwijl DEHP ook geadsorbeerd is aan de vaste matrix.
  - Het patroon van voorkomen van alkylfenolethoxylaten (APE) en alkylfenolen (AP) in afvalwater is grillig; doordat afwisselend deze verbindingen wel dan weer niet worden aangetroffen.

De APE-gehalten bedragen gemiddeld 55 µg/l voor ruw stedelijk rioolwater en 4 µg/l voor het effluent van een rwzi. De gehalten APE in ongezuiverd industrieel afvalwater zijn vele malen hoger dan in ruw stedelijk rioolwater.

- In alle rwzi's is de oestrogene potentie in het effluent duidelijk lager dan die in het influent. Voor gefiltreerd stedelijk rioolwater ligt de oestrogene potentie in de orde van grootte van 1-300 pmol EEQ/l voor de ER-CALUX en YES assay; d.i. equivalent met 0,3-80 ng/l 17ß-oestradiol. Voor de ER-bindingswaarde ligt een dergelijke waarde aanzienlijk hoger (500-2500 pmol EEQ/l). In een rwzi vindt er een aanzienlijke reductie plaats, hetgeen resulteert in waarden voor gefiltreerd biologisch gezuiverd effluent in de range 1-30 pmol EEQ/l voor ER-CALUX en YES, en voor ER-bindingsassay 15-230 pmol EEQ/l. De oestrogene potentie van het gefiltreerde rioolwater vanaf industrieterreinen ligt met 1-30 pmol EEQ/l voor ER-CALUX, tot 75 pmol EEQ/l voor YES en tot 1500 pmol EEQ/l voor de ER-bindingsassay lager dan ongezuiverd stedelijk afvalwater.
- In riool-/zuiveringsslib werden voornamelijk ftalaten en alkylfenol-(ethoxylaten) aangetroffen. Ook werd in vrijwel alle slibmonsters oestrogene potentie gemeten. Hormonen bleven, op 1 na, steeds onder de (hoge) detectielimiet, terwijl ook bisfenol-A in slechts enkele gevallen boven de (hoge) detectielimiet werd aangetroffen.

Trends

- De gehalten van hormonen en ftalaten in milieumatrices zijn vergelijkbaar met die in ons omringende landen. De gehalten van alkylfenol(ethoxylaten) zijn in Nederland over het algemeen lager dan in andere landen. Momenteel is er nog te weinig informatie beschikbaar om een dergelijke vergelijking ook voor de gemeten oestrogene potenties met de *in vitro* screeningsassays te kunnen uitvoeren.
- De met ER-CALUX gemeten oestrogene potentie in oppervlakte-water en afvalwater correleert redelijk met de gemeten gehalten van oestrogene hormonen in deze matrices.
- Op basis van de relatieve oestrogene potentie (EEF) - bepaald met de *in vitro* screeningsassays - van elk afzonderlijke (xeno)-oestrogene stof is berekend dat de totale (berekende) oestrogene potentie in al dan niet gezuiverd afvalwater voor een belangrijk deel wordt bepaald door de aanwezigheid van de oestrogene hormonen. Het resultaat van deze berekening is inherent aan de vastgestelde EEF's per (xeno)-oestrogene stof behorend bij een bepaalde *in vitro* screeningsassay.
- Bij vergelijking van de gemeten oestrogene potentie met een *in vitro* screeningassay en de berekende oestrogene potentie op basis van de aangetroffen gehalten aan de (xeno)-oestrogene stoffen hormonen, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) vermenigvuldigd met de EEF's van deze stoffen, blijkt voor afvalwater dat de *in vitro* assays een hogere oestrogene potentie registreren dan op basis van de chemische parameters is berekend. Voor ruw rioolwater kan 70% van de met de ER-CALUX gemeten oestrogene potentie verklaard worden; voor het effluent slechts 20%. Voor oppervlaktewater en riool-/zuiveringsslib daarentegen zijn de gemeten oestrogene potenties vele orden van grootte lager dan de berekende waarden op basis van de aangetroffen concentratieranges van de gemeten (xeno)-oestrogene stoffen.

Algemene conclusie en aanbevelingen

Ter voorbereiding op het 'baseline' onderzoek 'Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES) heeft deze oriënterende studie enerzijds veel leemten in kennis en logistieke aspecten inzichtelijk gemaakt. Dit heeft geresulteerd tot gerichte aanbevelingen o.a. voor het opstellen van protocollen bij de monsterlogistiek en analysemethode. Ook zijn aanbevelingen gedaan voor enkele aanvullende experimenten, die nodig zijn ter verdere invulling van het LOES-project. Anderzijds heeft dit oriënterend onderzoek een eerste indruk gegeven van de aanwezigheid van de meest verdachte (xeno)-oestrogene stoffen en oestrogene potentie in diverse milieumatrices in Nederland. De belangrijkste conclusies en aanbevelingen zijn:

- De in deze oriënterende studie toegepaste analysemethodes en *in vitro* screeningsassays zijn doorgaans goed bruikbaar. Voor enkele stoffen en matrices is aanvullend onderzoek gewenst o.a. in de vorm van stabiliteitstesten en matrixverdelingsexperimenten.
- In veel oppervlaktewateren en afvalwaterstromen in Nederland blijken (potentiële) (xeno)-oestrogene stoffen en oestrogene potentie, gemeten met *in vitro* assays, in detecteerbare hoeveelheden aanwezig te zijn. De gemeten concentraties aan belangrijkste oestrogene hormonen zijn in de ng/l range, en die van enkele xeno-oestrogenen in de µg/l range. In de meeste gevallen bleek de waargenomen oestrogene potentie niet eenduidig te verklaren te zijn aan de hand van de gemeten concentraties (xeno)-oestrogene stoffen. Een aanzienlijk deel van de oestrogene potentie in water wordt bepaald door de aanwezigheid van de natuurlijke oestrogene hormonen.
- Op basis van de gemeten gehalten (xeno)-oestrogene stoffen en oestrogene potenties in de verschillende milieumatrices in deze oriënterende studie kan (nog) geen uitspraak worden gedaan over de risico's van deze stoffen voor het Nederlands milieu. Hiervoor is nader onderzoek noodzakelijk naar de effecten op aquatische organismen door blootstelling aan de gemeten (xeno)-oestrogenen en oestrogene potenties met de *in vitro* en *in vivo*-assays. Dit aspect viel buiten dit oriënterend onderzoek.

Summary

Endocrine-disrupting compounds in water systems: A pilot study of the occurrence of estrogenic compounds in surface and waste waters in the Netherlands

Introduction and background

The presence of endocrine-disrupting compounds in the environment is currently the focus of a substantial amount of attention, both within the Netherlands and internationally. In principle, both natural hormones and contaminants of industrial origin seem capable of disrupting the homeostasis of sex hormones in humans and animals, with consequent adverse effects on development and reproduction. Generally speaking, however, it is difficult to establish causal relationships between the presence of endocrine-disrupting compounds in the environment and the occurrence of any such effect. Nevertheless, disruption of reproduction associated with exposure to these compounds has in the past and recently been reported from a range of organisms in aquatic ecosystems in the Netherlands and other countries of western Europe. The organisms implicated include snails, fish, fish-eating birds and fish-eating mammals.

These findings led the Netherlands Health Council to conclude that there is reason for concern about the presence in the aquatic environment of endocrine-disrupting compounds, which may represent a threat to the continued existence of populations of some species. The first priorities are to determine the scale of occurrence of these compounds in Dutch waters, and the magnitude of their effects. With these objectives in mind, a pilot study was carried out during 1997/98, under the supervision of 'Rijkswaterstaat' (RIZA[1], RIKZ[2]). This study attempted to quantify the occurrence of several endocrine-disrupting compounds in surface and waste waters. Particular attention was paid to xeno-estrogens and estrogenic hormones that may have feminizing effects, since these substances are thought to be of particular concern.

The compounds studied included xeno-estrogens of industrial origin, natural estrogenic hormones and synthetic estrogenic hormones. *In vitro* screening assays were applied in order to estimate estrogenic potency in the water systems studied. The study also evaluated the suitability of these assays and available analytical methods for further use. It resulted in recommendations for a comprehensive baseline investigation of aquatic ecosystems in the Netherlands, to be carried out during 1999/2000. This investigation, which concentrates on fish populations in particular, is known as the National Investigation into Estrogenic Compounds (Dutch acronym, LOES).

The pilot study was limited to potential endocrine disrupters that act via the estrogen receptor. Chemical analyses were used to study the occurrence of the following groups of compounds:

[1] Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment / RIZA
[2] National Institute for Coastal and Marine Management / RIKZ

- Natural and synthetic estrogens: estrone, 17α-estradiol, 17ß-estradiol, 17α-ethinylestradiol and hormone glucuronides.
- Industrial xeno-estrogens: bisphenol-A, phthalates, alkylphenols, alkylphenolethoxylates (APEs).

Estrogenic potency was determined using three different *in vitro* screening assays: the estrogen-receptor-binding (ER-binding) assay, the yeast estrogen reporter gene (YES) assay and the ER-mediated chemical activated luciferase gene expression (ER-CALUX) assay. Using samples from a range of matrices, an attempt was made to determine possible relationships between concentrations of the compounds studied and estrogenic potency. The samples, which were collected in autumn 1997, included:

- Water from a total of 11 freshwater, estuarine and marine sites.
- Sediment, and particulate matter in water samples, from three of these sampling locations.
- Flounder (*Platichthys flesus*) livers and mussel (*Mytilus edulis*) tissue from three of the sampling locations.
- Waste water inflows, effluents and sewage sludge of five biological waste water treatment plants (WWTPs).
- Waste water and sewer sludge taken directly from a residential area and two industrial areas.

The choice of sampling locations for surface water and waste water was intended to provide a better understanding of the likely range of contaminant concentrations and estrogenic potency, for use in planning the full baseline survey. The objective was not to focus primarily on the locations most likely to produce or contain high concentrations of estrogens.

Logistics and suitability of methods applied

- Our experience with the pilot study suggested that a more extensive investigation, involving sampling, handling, pre-treatment and analysis by a range of institutes, would be logistically complex. Such an investigation would need thorough preparation. This study also demonstrated that, because of the multidisciplinary nature of the work, several meetings would be needed in order to produce standardized methodologies and protocols for sampling, treatment and analysis.
- The method used for the analysis of hormones and bisphenol-A in surface water and waste water samples proved to be sufficiently sensitive. For these compounds in solid matrices, however, the analytical method requires optimization. The analytical methods used for phthalates, alkylphenols and APEs were appropriate, both in the aqueous fraction and in solid matrices.
- The three *in vitro* assays used in the pilot study were all suitable for the detection of estrogenic potency in all types of sample, although they sometimes gave different results. In general, the ER-CALUX and YES assays consistently showed similar responses, but the ER-binding assay usually gave higher potency values. This difference may be explained by the fact that both agonists and antagonists contribute to the response in the ER-binding assay, where in addition there is no cell membrane to act as a natural barrier. The determination of estrogenic potency in the ER-CALUX and YES assays, on the other hand, occurs inside the cell, although the response in the ER-CALUX assay is the result of both agonists and antagonists. Thus the results of the different assays are not directly comparable, and a combination of assays may provide more information than one alone.

- In principle, analyses of compounds in multi-compartmented matrices such as waste water and sewage sludge may be directed at the aqueous phase, the solid phase, or a combination of both. The choice depends on the characteristics of the compound as well as the suitability of the analytical method. Under all circumstances, however, it is essential to determine the amount of solid matrix in each sample.

Presence of estrogens and estrogenic potency

The tables below show the range of observed concentrations of estrogenic hormones and xeno-estrogens, and the range of values of estrogenic potency as measured by *in vitro* assays, within each matrix sampled.

Table 0.1
Range of concentrations of estrogenic hormones (sum of estrone, 17α-estradiol, 17ß-estradiol, 17α-ethinylestradiol), bisphenol-A, total phthalates and alkylphenols/APEs in each matrix.

matrix	estrogenic hormones	bisphenol-A	total phthalates	AP+APE
surface water (ng/l)	< d.l. - 9	< d.l. - 160	100 - 5,500	< d.l. - 140
suspended matter (µg/g ds)	-	< d.l.	0.7 - 30	1 - 8
sediment (µg/g ds)	-	< d.l.	0.1 - 3	3.2 - 7.2
biota (µg/g ds)	-	-	6 - 15	< d.l.
waste water/influent WWTP (ng/l)	5 - 200	250 - >2,000	1,000 - 70,000	3,000 - 8.1 x 10^6
effluent WWTP (ng/l)	< d.l. - 70	20 - 400	500 - 7,000	870 - 23,700
sewer/sewage sludge (µg/g ds)	-	< d.l. - 0.27	2.3 - 250	0.7 - 4,000

Tabel 0.2
Estrogenic potency measured with ER-CALUX, YES and ER-binding assay in each matrix.

matrix	ER-CALUX	YES	ER-binding
surface water (pmol EEQ/l)	0.25 - 1.7	< d.l. - 4	< d.l. - 9
suspended matter (pmol EEQ/g)	0.2 - 2.5	< d.l. - 1	< d.l. - 300
sediment (pmol EEQ/g ds)	-	-	-
biota (pmol EEQ/g ds)	-	-	-
waste water/influent WWTP (pmol EEQ/l)	4 - 450	< d.l. - 300	< d.l. - 5,000
effluent WWTP (pmol EEQ/l)	0.1 - 60	0.3 - 60	< d.l. - 230
sewer/sewage sludge (pmol EEQ/g ds)	1.5 - 40	< d.l. - 2,750	350 - 2,000

d.l. = limits of detection of the analycal method employed.
- = combination not tested.

Surface water systems

- Measurable concentrations of all the compounds studied occurred in some surface water samples, including samples from freshwater, estuarine and marine environments.

  - Natural estrogens were found mostly in rivers and canals near locations with high human populations, rather than in open water or large estuaries. Observed concentrations were low, but on a few locations still above the threshold concentrations at which male rainbow trout show induction of the female yolk sac protein vitellogenin. The hormones 17ß-estradiol and estrone were the most common and occurred at the highest concentrations, whereas concentrations of 17α-estradiol and 17α-ethinylestradiol were almost universally below the limits of detection. Hormone glucuronides were not detected, suggesting that hormones are present in biologically active forms in surface waters.
  - Bisphenol-A occurred in surface waters at concentrations of up to 0.16 µg/l, but was not detected in particulate matter and sediment. Phthalates and alkylphenols/APEs occurred at higher concentrations in particulate matter and sediment than in surface waters. For example, concentrations in solid matrices were as high as 27 000 µg/kg di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and 8 000 µg/kg nonylphenol. Phthalates were detected in biota, but concentrations of alkylphenols and APEs were below the limits of detection.
- Estrogenic potency in surface waters and suspended matter, as measured with *in vitro* assays, showed wide variability among sampling locations and also among matrices. In surface waters, estrogenic potency was generally low, values being 0.25 - 1.7 pmol EEQ/l (ER-CALUX assay) or up to 4 pmol EEQ/l (YES assay). Using the same assays, the estrogenic potency of suspended matter varied between 0.2 - 2.5 pmol EEQ/g dry matter. When measured with the ER-binding assay, estrogenic potency – when above the limits of detection – was much greater, with values in the aqueous fraction and suspended matter reaching 10 pmol EEQ/l and 300 pmol EEQ/g dry matter respectively.

Waste water and sewage sludge

- In almost every sample of municipal and industrial waste water, natural and synthetic estrogenic hormones, as well as the xeno-estrogens bisphenol-A, phthalates and alkylphenols/APEs, were encountered.
  - The sum of the estrogenic hormone concentrations in untreated waste water and WWTP inflows were between 5-200 ng/l. The compounds 17ß-estradiol and estrone showed the highest concentrations. Concentrations of 17α-ethinylestradiol were less than 10 ng/l in all samples. Concentrations of estrogenic hormones were generally significantly higher in waste water of domestic origin than in industrial waste water. In biologically treated effluent, the sum of the estrogenic hormone concentrations were less than 70 ng/l. Hormone glucuronides were not detected.
  - Levels of bisphenol-A in untreated waste water and WWTP inflows were between 250 - 2000 ng/l, and were similar whatever the source of the waste water (municipal or industrial). After treatment, concentrations fell to between 20 - 400 ng/l. The concentration of bisphenol-A in untreated waste water after filtration at 0.45 µm was less than 5 % of the total.
  - In untreated waste water, di-ethylphthalate (DEP) and di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) were the most common phthalates. Maximum concentrations of DEP/DEHP in untreated waste water were 30 µg/l, while after treatment they were reduced to less than 5 µg/l. The phthalates with the smal-

lest molecules, di-mono-phthalate (DMP) and DEP, were mainly found in the aqueous phase, while the more hydrophobic DEHP was mainly sorbed onto particulate matter in the waste water.
  - The pattern of occurrence of alkylphenols and APEs in waste water is unpredictable because these compounds were sometimes detected and another time they were absent on the same location. APE concentrations in untreated municipal waste water were in the range of 55 µg/l, falling to 4 µg/l in biological WWTP effluents. In industrial waste waters, concentrations of APEs were substantially higher than in municipal waste water. Relative to APEs, concentrations of alkylphenols were relatively low in most of the samples.
- At all biologically WWTPs sampled, the estrogenic potency of the effluent was significantly lower than that of the incoming waste water. In filtrated (0.45 µm) and biologically not treated municipal waste water, estrogenic potency was of the order of 1 - 450 pmol EEQ/l using the ER-CALUX and YES assays, equivalent to 0.3 - 120 ng/l 17ß-estradiol. Potencies measured with the ER-binding assay were higher, reaching from limit of detection to 5000 pmol EEQ/l. Corresponding levels in the effluent of municipal WWTP were 5 - 20 pmol EEQ/l (ER-CALUX), 1 - 30 pmol EEQ/l (YES) and 15 to 230 pmol EEQ/l (ER-binding assay). Estrogenic potency of industrial waste water (biologically not treated, but filtrated at 0.45 µm) was 5 - 120 pmol EEQ/l (ER-CALUX), up to 75 pmol EEQ/l (YES), and up to 1500 pmol EEQ/l ER-binding assay; all significantly lower than values in raw municipal waste water.
- In sewer/sewage sludge, phthalates and alkylphenols/APEs were detected, as was estrogenic potency. With one exception, hormone levels were below the (high) limits of detection. Bisphenol-A too was encountered in only very few samples.

Comparison of chemical analysis and screening assays

- The estrogenic potency of surface water and waste water samples, as measured with the ER-CALUX assay, was positively correlated with concentrations of natural estrogens in the same samples, but the correlation coefficient had a relatively low value.
- Based on the relative estrogenic potency of every compound studied, and its concentration in the sample, a theoretical total estrogenic potency could be calculated for each sample. This calculation showed that natural estrogens were the most important estrogenic compounds in waste water samples with respect to the (few) compounds which were involved in this pilot study.
- A comparison between these calculated estrogenic potencies and the estrogenic potencies measured with e.g. the *in vitro* ER-CALUX assay, showed that the compounds studied accounted for 70% of the estrogenic potency of untreated waste water and WWTP inflows. The corresponding value for WWTP effluents was only 20%. For surface water and sewage sludge, on the other hand, the measured potencies were much lower than the calculated potencies. The reason for this is unknown, but it would appear that it is not yet possible to predict overall assay responses on the basis of concentrations of individual compounds.
- Concentrations of hormones and phthalates as measured in this study were comparable to those reported in the literature for other European countries, while concentrations of alkylphenols and APEs were generally lower. Insufficient information was available from other countries to permit a similar comparison of estrogenic potencies measured with *in vitro* assays.

General conclusions and recommendation

This pilot study, as a forerunner of the LOES investigation, gave an insight into the present state of knowledge of this area, and provided an indication of the logistical complexity of a full baseline study. It resulted in several specific recommendations, including draft protocols for sample collection, treatment and analysis, together with proposals for additional experimental work. The research also provided the first quantitative analysis of xeno-estrogens and estrogenic potency in environmental matrices in the Netherlands.

The most important conclusions of the pilot study are:

- The analytical methods and *in vitro* screening assay used are, in general, appropriate for a more extensive baseline study. For some compounds and matrices, additional research is needed. For example, the stability and distribution of these compounds in different matrices should be quantified.
- Estrogenic compounds and estrogenic potency were detected in many of the surface water and waste water samples analysed. In general, concentrations of estrogenic hormones tended to be between 1 and 100 ng/l, three orders of magnitude less than concentrations of most xeno-oestrogens.
- In most cases, the estrogenic potency of the samples could not be accounted for purely in terms of the compounds studied. However, estrogenic hormones appeared to account for a significant proportion of the estrogenic potency of waste water samples.

Although this study has provided quantitative data on the occurrence of estrogenic compounds in Dutch surface and waste waters, it is not currently possible to draw any conclusions about the risks posed by these compounds to the ecosystems in which they occur. For this to be possible, it will be necessary to obtain data on the effects of different concentrations of estrogenic hormones and xeno-estrogens on aquatic organisms. This area of investigation was not addressed by the pilot study.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding en voorgeschiedenis

De laatste jaren zijn in de wetenschappelijke vakliteratuur en media berichten verschenen over de aanwezigheid van hormoonontregelende stoffen ('endocrine disruptors') in het milieu en de gevolgen van deze stoffen op de voortplanting, gedrag en ontwikkeling van mens en dier. Hormoonontregelaars in het milieu blijken de geslachtshormoon-huishouding van mens en dier zodanig te kunnen beïnvloeden dat nadelige effecten kunnen optreden bij het blootgestelde organisme dan wel zijn of haar nageslacht. Bij de mens worden bepaalde ziekten of afwijkingen, zoals met name een vermindering van de mannelijke vruchtbaarheid, in verband gebracht met blootstelling aan deze stoffen. Een overtuigend bewijs hiervoor is tot op heden (nog) niet geleverd (Gezondheidsraad, 1997). Opgemerkt dient te worden dat het in het algemeen moeilijk is causale verbanden te leggen tussen de aanwezigheid van potentieel hormoonontregelende stoffen in het milieu en eventuele effecten op voortplanting en nageslacht van mens en dier. Desondanks zijn in tegenstelling tot de situatie bij de mens de laatste jaren vooral bij aquatische organismen (bepaalde soorten slakken, vissen en visetende vogels en zoogdieren) in Nederland en andere West Europese landen verstoringen in de voortplanting gezien, die geassocieerd kunnen worden met de blootstelling aan dergelijke stoffen. Het betreft veelal de aanwezigheid van verhoogde gehalten van een bepaald eiwit (vitellogenine) bij mannetjesvissen en het verschijnsel van intersexualiteit (Gezondheidsraad, 1999). De effecten op voort-planting en sexueel gedrag bij dieren kunnen hun weerslag hebben in de populatie omvang en daarmee ook op de populaties van andere soorten. Hormoonontregelaars bedreigen hierdoor het voort-bestaan van sommige diersoorten in ecosystemen en kunnen hele levensgemeenschappen en ecosystemen aantasten.

Hormoonontregelende stoffen kunnen op diverse manieren inwerken in de hormoonhuishouding. Vooral sterk in de belangstelling staan de hormoonontregelende stoffen, die de feminiserende effecten van de natuurlijke vrouwelijke (oestrogene) geslachtshormonen nabootsen. Deze oestrogeen-actieve stoffen kunnen van nature voorkomende stoffen zijn, zoals de natuurlijke oestrogene hormonen, die uitgescheiden worden door mens of (landbouw)-huisdieren of die bijvoorbeeld door planten en schimmels worden geproduceerd, maar ook synthetische hormonen en industriëel geproduceerde chemicaliën. Momenteel is de beschikbare kennis voor de hormoonontregeling op basis van de directe oestrogeen-receptor afhankelijke werking het grootst. Hierbij zal blootstelling aan oestrogeen-actieve stoffen leiden tot ontregeling van de geslachtshormoonhuishouding door binding van deze stoffen aan de oestrogeen-receptoren en vervolgens activatie van het DNA (zie kader paragraaf 1.5). Bij alle gewervelde dieren is 17ß-oestradiol het meest potente oestrogene hormoon. Andere natuurlijke oestrogene hormonen zijn 17α-oestradiol en oestron. Oestrogenen worden, algemeen gesproken, gevormd in de ovaria door cellen die rond de rijpende eicellen gelegen zijn.
Een belangrijk synthetisch oestrogeen hormoon is 17α-ethinyl-oestradiol, dat in de anticonceptiepil voor de de mens wordt gebruikt.

Tal van milieuvreemde stoffen zijn eveneens in staat om te binden aan oestrogeen-receptoren, waardoor ze zowel de werking van de vrouwelijke geslachtshormonen kunnen nabootsen (agonisten) of de werking daarvan juist kunnen blokkeren (antagonisten). Deze stoffen worden aangeduid als xeno-oestrogenen. De oestrogene potentie van de xeno-oestrogenen is doorgaans (veel) lager dan de natuurlijke en synthetische hormonen. Experimenteel is vastgesteld dat blootstelling aan zwak-oestrogene stoffen, die op zich zelf weinig direct effect hebben kan leiden tot extra aanmaak van oestrogene receptoren. De oestrogene potentie van de verdachte xeno-oestrogenen zijn doorgaans veel lager dan die van de natuurlijke oestrogenen. Daarentegen zijn deze synthetische verbindingen slechter biologisch afbreekbaar en bovendien vaak hydrofoob, waardoor zij de neiging vertonen zich op te hopen in sedimenten en in organismen. Hierdoor kunnen concentraties in bijvoorbeeld vissen gevonden worden die orders van grootte hoger zijn dan de omgevingswaarden (Gezondheidsraad, 1999). In het algemeen blijkt dat aquatische organismen door de blootstellingsroute en de hoge concentraties in het aquatische milieu hogere risico's lopen dan soorten die zich hoger in de voedselketen bevinden.

In studies in Groot-Brittannië zijn, op grond van omvangrijk veldonderzoek, wijd verspreide effecten van oestrogeen-actieve stoffen in het aquatisch milieu aangetoond. Blijkens dit Engelse onderzoek leiden de meeste effluenten van rioolwaterzuiveringsinrichtingen (rwzi's) tot oestrogene of feminiserende effecten bij mannelijke vissen. Ook in ontvangende oppervlaktewateren en in estuaria zijn deze oestrogene effecten gevonden. Eén van de effecten is de vitellogenine-inductie; d.i. de oestrogeen-gestuurde aanmaak van vitellogenine in de lever van de vis, dat normaal alleen door vrouwtjes-vissen geproduceerd wordt. Een verhoogde aanmaak bij mannetjes-vissen wijst op blootstelling aan stoffen met oestrogene werking en vormt derhalve een goede indicatie voor oestrogene activiteit. Bepaalde vissoorten vertoonden naast vitellogenine-inductie bovendien zeer hoge prevalenties interseksualiteit. Interseksualiteit 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.

De resultaten van het Engelse onderzoek zijn relevant voor de Nederlandse situatie. In Nederland heeft omvangrijk onderzoek naar vitellogenine-inductie en interseksualiteit bij vissen nog niet plaatsgevonden. Uit het nog beperkte onderzoek (RIKZ, ongepubl. gegevens) onder vispopulaties in ons land blijkt dat er in sterk verontreinigde zoetwatersystemen en estuaria eveneens sprake is van een vitellogenine-verhoging in mannelijke vissen, die overeenkomt met de gehalten aangetroffen in vis afkomstig uit Engelse wateren.

Een complicerende factor in de studie naar oestrogeen-actieve stoffen is dat dit een heterogene groep van verbindingen betreft met uiteenlopende fysisch-chemische eigenschappen. Daarnaast is er een groot aantal aangrijpingspunten voor verstoring van de hormoonhuishouding mogelijk en kunnen zeer kleine hoeveelheden (ppb, ppt) van hormoonontregelende stoffen effecten op de voortplanting en ontwikkeling hebben, terwijl de uiteindelijke gevolgen zich zeer geleidelijk of pas op latere termijn op populatie of ecosysteem niveau zullen manifesteren.

Intermezzo

Studies in Groot-Brittannië hebben aan het licht gebracht dat effluenten van rwzi's oestrogeen voor vis zijn (Purdom, 1994; Sumpter, 1995; Routledge, 1998). Ook een aantal ontvangende oppervlaktewateren vertonen oestrogene activiteit (Harries, 1996; Jobling, 1998). Deze studies hebben aangetoond dat gekooide mannelijke regenboog-forellen *(Oncorhynchus mykiss)* het (vrouwelijke) dooier-eiwit vitellogenine aanmaken en dat er tevens een vertraging optreedt in de groei van hun testikels. Hoewel in eerste instantie alleen alkylfenolderivaten als vervuilingsbron werden geïdentificeerd (Jobling, 1996), is later - met behulp van oestrogeniteit-gestuurde fractionering van het effluent - vastgesteld dat de oestrogene activiteit van de water-monsters mede kan worden verklaard door de aanwezigheid van natuurlijke oestrogenen (17ß-oestradiol en oestron) en in mindere mate door het synthetische hormoon 17α-ethinyloestradiol afkomstig van de anticonceptiepil (Desbrow, 1997; Routledge, 1998).

In Groot-Brittannië zijn in veldsurveys duidelijke oestrogene effecten vastgesteld bij in het wild levende populaties van de blankvoorn *Rutilus Rutilus* in riviersystemen waarop al dan niet gezuiverd afvalwater wordt geloosd. Tot de waargenomen verschijnselen behoorden verhoogde gehalten aan vitellogenine, en zeer grote voorkeur (tot plaatselijk meer dan 100% van de onderzochte populatie) voor interseksualiteit (Jobling, 1998).

Deze bevindingen wijzen op een wijdverspreid effect van oestrogeen-actieve stoffen. De waargenomen reproductie-stoornissen zijn consistent met experimentele bevindingen en kunnen geassocieerd worden met de in lozingen van rwzi's aangetoonde oestrogene steroïden (Jobling, 1998). Surveys van mannelijke botten gevangen in een vijftal estuaria in Groot-Brittannië en langs de kust van Wales en Engeland vertonen eveneens bijna allemaal verhoogde concentraties vitellogenine (Allen, 1998).

Van de meeste milieucontaminanten was tot enkele jaren geleden niet bekend of zij potentieel oestrogeen-actief zouden zijn. Maar op grond van internationale studies wordt de lijst met van hormoonontregeling verdachte stoffen steeds langer. Ook de Gezondheidsraad heeft een dertigtal stoffen geïdentificeerd die als meest verdacht en relevant voor het Nederlands aquatisch milieu kunnen worden aangemerkt. Het gaat daarbij om enkele bekende gechloreerde koolwaterstoffen zoals PCB's, atrazine en chloorhoudende pesticiden (aldrin, dieldrin, DDE, DDT, HCH, chloordaan, endosulfan), maar ook om de natuurlijke en synthetische hormonen, enkele fyto-oestrogenen (genisteïne) en een aantal minder bekende synthetische chemische verbindingen zoals bisfenol-A, ftalaten, alkylfenolen-/alkylfenolethoxylaten en polybroom-bifenylen-/polybroomdiphenylethers. De aanwezigheid en verspreiding van deze stoffen in het aquatische milieu van Nederland is slechts gedeeltelijk bekend (Vethaak, 1996). In opdracht van en in samen-werking met Rijkswaterstaat is deze eerste oriënterende studie naar de aanwezigheid van enkele oestrogene hormonen en xeno-oestrogenen in watersystemen en in afvalwater uitgevoerd om invulling te kunnen geven aan deze leemte in kennis. Ook is in deze studie met behulp van *in vitro* screeningsassays, die informatie kunnen verschaffen over de ontregelende potentie van een verbinding of watermonster, gekeken naar het al dan niet voorkomen van de oestrogene potentie in dezelfde watersystemen.

1.2 Doel van het oriënterend onderzoek; leeswijzer

1.2.1 Doel

Informatie omtrent de aanwezigheid, verspreiding en effecten van (xeno)-oestrogene stoffen in het aquatisch milieu in Nederland is essentieel o.a. voor het maken van een risicobeoordeling. Hiertoe wordt door Rijkswaterstaat (RIZA, RIKZ) in samenwerking met een groot aantal andere onderzoeksinstellingen en laboratoria in de periode 1999-2000 een 'baseline' onderzoek 'Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES)' uit te voeren. De centrale vraag bij het LOES-project is of er in Nederland oestrogene effecten op vispopulaties optreden ten gevolge van de aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen in water-systemen. In het LOES-project wordt de aanwezigheid van potentiële (xeno)-oestrogene stoffen in diverse matrices van regenwater, leiding-water, zoet en zout oppervlaktewater, en al dan niet gezuiverd stedelijk- of bedrijfsafvalwater in Nederland in kaart gebracht. Ook zal de oestrogene potentie in dezelfde milieumatrices door middel van de *in vitro* screeningsassays ER/DR-CALUX en YES worden vastgelegd. Omdat deze *in vitro* testen geen ondubbelzinnig uitsluitsel geven over de te verwachten effecten op de reproductie, worden aanvullende *in vivo* testen met zebravissen in het laboratorium uitgevoerd. Daarnaast zullen bij in het veld verzamelde vissen; t.w. bot (zoute en brakke water) en brasem (zoet water) oestrogene effecten en de mogelijke gevolgen voor de reproductie worden geïnventariseerd. Naast de algehele visconditie en de concentraties aan xeno-oestrogene stoffen in het spierweefsel zullen bij de vis speciale biomarkers als vitellogenine-inductie en afwijkingen aan de geslachtsorganen worden bepaald alsook met *in vitro* assays de oestrogen potentie in extracten van het spierweefsel en gal. Ook zullen op een aantal (verdachte) locaties vissen en mosselen in kooien worden uitgehangen in opper-vlaktewater en gedurende een korte tijd worden blootgesteld aan verontreinigd oppervlaktewater of gezuiverd afvalwater. Door toepas-sing van een combinatie van gelijktijdige stof- en effectgerichte moni-toring moet duidelijk worden welk gedeelte van de geconstateerde effecten verklaard kan worden door de aanwezigheid van de geana-lyseerde stoffen.

Ter voorbereiding op het project LOES is in 1997/1998 een beperkte oriënterende studie uitgevoerd. Het doel van deze oriënterende studie was:

- vaststellen van de bruikbaarheid van een aantal chemische en biologische analysemethoden voor het bepalen van (xeno)-oestrogenen en oestrogene potentie in diverse oppervlaktewater- en afvalwatermatrices;
- verkrijgen van een eerste indruk van de aanwezigheid en gedrag van (xeno)-oestrogenen en van oestrogene potentie van diverse oppervlaktewater- en afvalwatermatrices met behulp van de (ten tijde van het onderzoek) beschikbare chemische en biologische analysemethoden.

1.2.2 Leeswijzer

In deze rapportage worden de resultaten gepresenteerd van de oriën-terende studie naar de (on)mogelijkheden van toepassing van een aantal chemische analysemethoden voor (xeno)-oestrogenen en *in vitro* assays voor het detecteren van de oestrogene potentie in diverse oppervlaktewater- en afvalwatermatrices. In het resterende deel van hoofdstuk 1 wordt de keuze van de bemonsteringslocaties voor oppervlaktewater en afvalwater toegelicht alsmede de keuze voor de in

dit oriënterend onderzoek betrokken (xeno)-oestrogene stoffen en *in vitro* screeningsassays. Hoofdstuk 2 geeft een korte beschrijving van de toegepaste analysemethoden en *in vitro* screeningsassays, zoals die ten tijde van dit onderzoek operationeel waren. In hoofdstuk 3 zijn de mogelijkheden en beperkingen van de diverse analysemethoden geëvalueerd, gevolgd door de meetresultaten. Deze summiere set aan meetgegevens zal worden vergeleken met de beschikbare informatie uit de ons omringende landen. Op basis van de eerste bevindingen zal in hoofdstuk 4 gezocht worden naar mogelijke relaties en verbanden tussen de verschillende meetresultaten en/of bemonsteringslocatie en tussen chemische analyses (stofconcentraties) en biologische analyses (*in vitro* assay responses). Het rapport eindigt met enkele voorzichtige conclusies over de aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen in het Nederlands aquatisch milieu en een aantal aanbevelingen ter verdere invulling van het LOES-project, dat in 1999/2000 wordt uitgevoerd.

1.3 Locatiekeuze

1.3.1 Oppervlaktewatersystemen

Bij de keuze van de meetlocaties voor het oppervlaktewater in de zoete, brakke en zoute Rijkswateren is zoveel als mogelijk aangesloten bij het landelijk routinematig milieumeetnet van Rijkswaterstaat. Relatief schone referentielokaties zijn hierbij grotendeels buiten beschouwing gelaten. De geselecteerde locaties zijn doorgaans van belang in internationaal kader.
Een kaart met de posities van de geselecteerde meetlocaties inclusief enkele bemonsteringslocaties van stedelijk afvalwater is gegeven in figuur 1.1.

Figuur 1.1
Geselecteerde bemonsteringslocaties voor oppervlaktewatersystemen en stedelijk afvalwater.

Lobith en Eijsden zijn de bemonsteringslocaties van de grensoverschrijdende rivieren de Rijn en de Maas. Stroomopwaarts van deze twee punten bevinden zich het dichtbevolkte en sterk geïndustrialiseerde Ruhr-gebied (D) en de stad Luik en omgeving (B).
Als benedenstroomse bemonsteringslocaties van Rijn en Maas worden de locaties Beneluxtunnel, Maassluis en Haringvlietsluizen aangehouden, die informatie over de waterkwaliteit in de Nieuwe Waterweg en het Haringvliet verstrekken. Beide locaties en IJmuiden geven inzicht in de emissie naar de Noordzee. Bij IJmuiden wordt water uit het Amsterdam-Rijnkanaal, het Markermeer en de polderwateren via het Noordzeekanaal op de Noordzee afgevoerd. Met uitzondering van het Haringvliet liggen al deze locaties in dicht bevolkte en geïndustrialiseerde gebieden.
Het kanaal Gent-Terneuzen is van regionaal belang voor de plaatselijke industrie. Het kanaal wordt vooral gevoed door de stroomgebieden van de Leie en de Bovenschelde in België. Het kanaal komt uit in de Westerschelde, waar tevens de locaties 'Terneuzen nabij boei 20' en bij Hansweert zijn geselecteerd.
De Oesterput, die in open verbinding staat met de Oosterschelde, kan gekarakteriseerd worden als relatief schoon marien gebied.
Als noordelijke locatie is Delfzijl in het industriële gebied Eems-Dollard geselecteerd.

De belangrijkste eigenschappen van de locaties zijn nog eens samengevat in tabel 1.1. Een uitgebreide beschrijving van de geselecteerde bemonsteringslocaties en de gehanteerde methode van bemonstering is gegeven in bijlage 1.

Tabel 1.1
Belangrijke karakteristieken van de geselecteerde meetlocaties voor oppervlaktewater.

locatie	acroniem	watersysteem	chloride	gemiddelde jaardebiet zoetwater 1997 (m^3/s)
Lobith	RIJN-LOBH	Rijn	zoet	1.914
Eijsden	MAAS-EIJS	Maas	zoet	188
Beneluxtunnel	NWG-BLT	Nieuwe Waterweg	licht brak	-
Maassluis	NWG-MSL	Nieuwe Waterweg	licht brak	1.346
Haringvlietsluizen	HARVLIE	Haringvliet	zoet	379
Amerikahaven	NZKL-AMH	Noordzeekanaal	brak tot zout	66
IJmuiden	NZKL-IJM	Noordzeekanaal	brak tot zout	71
Delfzijl	ZHKL-DZL	Zeehaven-/Eemskanaal	brak tot zout	9,5*
Hansweert	WES-HANS	Westerschelde	sterk brak	146
Terneuzen Boei 20	WES-TERN	Westerschelde	sterk brak tot zout	166
Terneuzen	KGT-TERN	Kanaal Gent-Terneuzen	brak	20
Oesterput	OOS-OESP	Oosterschelde	zout	0

*gebaseerd op 1993-1996.

1.3.2 Stedelijk en industrieel afvalwater

Vanwege het oriënterend karakter van dit onderzoek zijn de bemonsteringslocaties voor het afvalwater zodanig geselecteerd, dat deze een zo goed mogelijke afspiegeling geven van de afvalwaterstromen in de Nederlandse situatie. Hierbij is doelbewust niet gekozen voor afval-

waterstromen, waarvan op basis van de samenstelling of diverse activiteiten een hoge oestrogene activiteit mag worden verwacht of een hoge concentratie van één van de in beschouwing genomen (xeno)-oestrogene stoffen. Het streven was dus niet gericht om uiterste waarden in afvalwaterstromen aan te treffen, maar om een beter inzicht te verkrijgen in potentiële aandachtsgebieden ter voorbereiding op het LOES-programma.
Om deze reden is in dit oriënterend onderzoek zowel huishoudelijk-, stedelijk als industrieel afvalwater separaat bemonsterd.
Het huishoudelijk afvalwater is afkomstig van de woonwijk Oostermeente te Steenwijk, dat in het verleden in een ander onderzoek naar de samenstelling van huishoudelijk afvalwater is meegenomen. Het huishoudelijk afvalwater wordt zonder bijmenging met regenwater afgevoerd via een gescheiden rioolstelsel. Naast rioolwater zijn ook monsters genomen van het rioolslib.
Onder het begrip stedelijk afvalwater wordt gerekend het influent, effluent en zuiveringsslib van een rioolwaterzuiveringsinrichting (rwzi). Selectie van de rwzi's voor stedelijk afvalwater heeft plaatsgevonden op basis van o.a. het type rioolstelsel in het afwaterend gebied, het type zuiveringsinrichting, het huishoudelijk/industrieel vervuilingsaandeel, de huidige effectieve zuiveringscapaciteit en enkele bedrijfvoeringstechnische kenmerken van de rwzi, zoals slibbelasting. Daarnaast is de keuze mede bepaald vanwege logistieke redenen, zoals transport van de monsters, maar ook vanwege eventueel beschikbare informatie uit voorafgaand onderzoek. De volgende drie communale rwzi's zijn geselecteerd: rwzi Eindhoven, rwzi Kralingseveer en rwzi A'dam-Westpoort (huishoudelijk). In dit oriënterend onderzoek zijn van de rwzi's het influent, effluent en zuiveringsslib bemonsterd.

Tabel 1.2
Karakteristieken van de meetlocaties voor afvalwater.

locatie	acroniem	type riolering	type rwzi	ontwerp-belasting (i.e.)	gemiddeld belasting (%)	aandeel huis-houdelijk (%)
woonwijk Oostermeente	OOST	gescheiden	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	100
rwzi Eindhoven	EIND	gemengd	aeratietank	557.000	74	69
rwzi Kralingseveer	KRAL	gemengd	carroussel	301.500	97	79
rwzi Adam-Westpoort (huishoudelijk)	WEST	gescheiden	aeratietank	390.000	80	95
awzi A	AWZI A	gemengd	aeratietank	72.000	95	< 5
awzi B	AWZI B	gemengd	aeratietank	1.000.000	80	< 5
industrieterrein C	IND C	gemengd	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	
industrieterrein D	IND D	gemengd	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	

Voor industrieel afvalwater zijn twee afvalwaterzuiveringsinstallaties (awzi's) en twee persleidingen van industrieterreinen in beschouwing genomen. Evenals bij het stedelijk afvalwater zijn het influent, effluent en zuiveringsslib van de awzi's bemonsterd. Zowel de awzi's als de persleidingen zijn geselecteerd op basis van criteria waarbij specifieke locale beïnvloeding zoveel mogelijk wordt uitgesloten. Het aanbod van specifiek afvalwater zal beperkt moeten zijn en de diversiteit aan verontreinigingen in het afvalwater zo groot mogelijk.

De locaties van industrieel afvalwater worden gecodeerd gerapporteerd, omdat een aantal instanties/bedrijven vooraf te kennen had gegeven graag, maar anoniem, aan dit oriënterend onderzoek te willen deelnemen. De gebruikte acroniemen voor de diverse bemonsteringslocaties staan vermeld in tabel 1.2.

1.4 Keuze chemische parameters

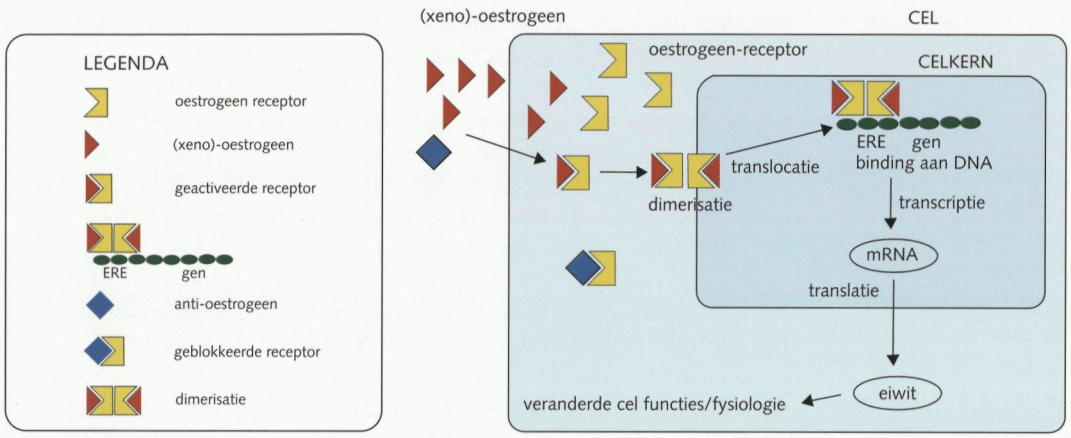
Zoals in paragraaf 1.1 is vermeld worden op basis van internationale studies steeds meer stoffen ervan verdacht de hormoonhuishouding te kunnen ontregelen. Deze stoffen kunnen aangrijpen op verschillende delen van het endocrien systeem. De aandacht gaat evenwel vooral uit naar de beïnvloeding van de geslachtshormoonhuishouding, dat reproductie-effecten tot gevolg kan hebben, zoals verminderde vruchtbaarheid of een veranderde geslachtsverdeling. De meeste belangstelling en kennis bestaat internationaal naar stoffen die feminiserende effecten van de natuurlijke vrouwelijke geslachtshormonen kunnen nabootsen (oestrogeen effect) of de werking daarvan juist kunnen blokkeren (anti-oestrogeen effect). Tevens dient de hormoonontregeling te geschiedens op basis van de zogenaamde directe oestrogeen-receptor afhankelijke werking. Bij de keuze van stoffen voor het oriënterend onderzoek is met deze beide aspecten rekening gehouden. Stoffen die indirect oestrogeen-actief zijn en werken via een algemene endocriene ontregeling, of stoffen die op andere wijze reproductie-verstorend (androgeen) werken, zijn bij de stofkeuze buiten beschouwing gelaten.
Een aantal stoffen is o.a. door de Gezondheidsraad (Gezondheidsraad, 1999) aangemerkt als meest verdacht voor de oestrogene ontregeling en relevant voor het Nederlands aquatisch milieu. Dit kunnen zijn enkele bekende gechloreerde koolwaterstoffen zoals PCB's, atrazine en chloorhoudende pesticiden (aldrin, dieldrin, DDE, DDT, HCH, chloordaan, endosulfan), maar ook om de natuurlijke en synthetische hormonen, enkele fyto-oestrogenen (genisteïne) en een aantal minder bekende chemische verbindingen zoals bisfenol-A, ftalaten, alkylfenol-(ethoxylaten) en de gebromeerde brandvertragers polybroombifenylen/-diphenylethers (PBB, PBDE). Voor de gechloreerde koolwaterstoffen is in het verleden reeds een emissiebeleid ontwikkeld, waaraan veel inventariserend onderzoek is vooraf gegaan. De verspreiding van deze stoffen in Nederland is daardoor goed bekend. Onbekend daarentegen is de aanwezigheid en verspreiding van de natuurlijke hormonen (17ß-oestradiol, 17α-oestradiol en oestron), van het synthetische oestrogene hormoon 17α-ethinyloestradiol en van hun afbraakprodukten. Dit komt vooral doordat tot voor kort geen aandacht werd besteed aan deze stoffen. Ook van de verdacht xeno-oestrogenen bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol-(ethoxylaten) is de verspreiding in de Nederlandse watersystemen nauwelijks bekend. Om deze reden is gekozen het oriënterend onderzoek met name op deze minder bekende stofgroepen te richten. De PBB's en PBDE's zijn buiten dit oriënterend onderzoek gelaten, aangezien deze stoffen pas in een later stadium als verdachte xeno-oestrogene stof zijn geïdentificeerd.
De fyto-oestrogenen vielen buiten de 'scope' van dit oriënterend onderzoek.

1.5 Keuze *in vitro* assays

Een belangrijk hulpmiddel bij het onderzoek naar de ontregeling van de oestrogene hormoonhuishouding in het milieu zijn enkele (recentelijk ontwikkelde) kortdurende *in vitro* screeningsassays. Het voordeel van het gebruik van deze assays boven chemische analyse van bekende (xeno)-oestrogene stoffen is dat er in principe geen onbekende componenten met een zekere oestrogene potentie onopgemerkt blijven. Daarnaast is het met *in vitro* assays wellicht mogelijk de additieve, synergistische en antagonistische effecten in mengsels van oestrogene stoffen te meten. Indien in hetzelfde milieumonster zowel de chemische analyses van de bekende (xeno)-oestrogenen als de oestrogene potentie met een *in vitro* assay zijn bepaald, is het in principe mogelijk vast te stellen of de gemeten oestrogene potentie (gedeeltelijk) verklaard kan worden uit de gemeten concentratie van de (xeno)-oestrogenen, of dat nog een onverklaard deel aanwezig is.
De chemisch gemeten gehalten aan de individuele (xeno)-oestrogene stoffen moeten hiervoor wel 'vertaald' worden naar een bepaalde oestrogene potentie van de desbetreffende stof. Dit gebeurt door de

Intermezzo
(Xeno)-oestrogenen kunnen via een aantal mechanismen aangrijpen in de oestrogene hormoonhuishouding. Over deze werkingsmechanismen bestaan nog grote leemten in kennis. De meeste belangstelling gaat momenteel uit naar stoffen met een receptor-afhankelijke oestrogene werking (hormoonmimicry). Dit zijn stoffen die op het vrouwelijke geslachtshormoon 17ß-oestradiol lijken en daardoor als een hormoon kunnen werken. De (xeno)-oestrogeen bindt na passage van het celmembraan aan de oestrogeenreceptor (ER), waarna dit dimeriseert en zich verplaatst naar de celkern. In de celkern bindt dit (xeno)-oestrogeen/receptor-complex aan een specifiek stukje DNA, het 'estrogen responsive element' (ERE), waarna overschrijving (transcriptie) van een of meer genen naar boodschapper mRNA plaats vindt. RNA bevat daardoor de code die vervolgens vertaald wordt (translatie) naar de productie van specifieke eiwitten, waarmee de cel een gerichte functie kan uitoefenen. Verandering van de hoeveelheid gevormd eiwit kan tenslotte een verstoring van het functioneren van de cel en de fysiologie leiden. Zie schematische weergave in onderstaand figuur.
Een bekend voorbeeld is de specifieke synthese van het dooiereiwit vitellogenine in de lever van vissen, dat van nature alleen voorkomt bij vrouwtjes, maar bij blootstelling aan oestrogeen-actieve stoffen uit het omringende milieu ook door mannelijke vissen wordt aangemaakt.
De binding aan en activering van de ER-receptor, uitgedrukt als 'oestrogene equivalente factor' (EEF) is voor diverse individuele (xeno)-oestrogene stoffen bevestigd, maar de bindingsaffiniteiten van deze stoffen met de oestrogeenreceptor zijn meestal aanzienlijk lager dan die voor de natuurlijke oestrogene hormonen.
Bindt de stof wel aan de oestrogeen-receptor maar vindt activering niet plaats, dan kan de stof de receptor blokkeren met als gevolg een anti-oestrogene werking.
De derde mogelijkheid van ontregeling van de hormoonhuishouding is dat bepaalde stoffen een receptor-onafhankelijke oestrogene werking kunnen uitoefenen. Hierbij valt te denken dat deze stoffen aangrijpen op het metabolisme en transport van de geslachtshormonen, of ze verstoren de hormonale regulatie via terugkoppeling in de hersenen (hypothalamus-hypofysesysteem).

Figuur 1.2
Werkingsmechanisme van natuurlijke oestrogenen en xeno-oestrogenen in de cel.



relatieve oestrogene potentie van elke stof afzonderlijk stof te bepalen met behulp van dezelfde *in vitro* assay en deze dan uit te drukken in een oestrogene potentie (oestrogene equivalente factor EEF).
De huidige oriënterende studie richt zich op stoffen met een directe receptor afhankelijke oestrogene werking. Voor het detecteren van de oestrogene potentie - die wordt veroorzaakt door stoffen met dit type werkingsmechanisme - is een aantal *in vitro* screeningsassays met gemodificeerde cellijnen beschikbaar. Hierbij kan onderscheid gemaakt worden tussen assays die het biologische effect van activatie van oestrogeen receptoren meten, alsmede assays die alleen de binding aan de receptor bepalen zonder het daaropvolgende biologische effect te meten.

In deze studie is gekozen voor:
- een reporter-gen assay in gist, de 'yeast oestrogen'(YES)-assay (Routledge, 1996);
- een reporter-gen assay in zoogdiercellen, de ER-CALUX ('chemical activated luciferase gen expression') assay (Legler, 1999);
- de oestrogenreceptor (ER)-bindingsassay (Schwartz, 1993).

Voor de YES-assay is gekozen omdat deze vooral in Groot-Brittannië veelvuldig toegepast gaat worden. Hierdoor wordt het mogelijk de Nederlandse resultaten rechtstreeks met de Engelse meetgegevens te vergelijken. De ER-CALUX assay is een recent in Nederland ontwikkelde assay die doorgaans een goede respons geeft en ook anti-oestrogenen kan detecteren. Zowel de YES als ER-CALUX behoren tot de eerste categorie *in vitro* assays, die niet de binding aan de receptor bepalen maar ook de activatie. Dit in tegenstelling tot de ER-bindingsassay die gekozen is vanwege het feit dat deze in het verleden al vaker is toegepast voor oestrogene stoffen en gebaseerd is op binding. In deze voorstudie is de E-screen met MCF7 borstkanker cellen niet meegenomen. Deze assay is gebaseerd op de oestrogen-afhankelijke groeistimulans (proliferatie) van cellen. De E-screen is echter niet zeer specifiek aangezien enerzijds soms ander dan (xeno)-oestrogene stoffen een stimulerende werking op de celgroei hebben en anderzijds stoffen, die de celgroei remmen, de respons kunnen onderdrukken.

De gekozen assays meten allen verschillende aspecten van de effect-keten die tot oestrogene activiteit kan leiden (zie figuur 1.2).

De eerste stap is binding van de stof aan de ER-receptor in het cytosol van de cel. Deze binding wordt gemeten in de ER-bindingsassay. Deze assay geeft uitsluitend informatie over het binden van stoffen aan een uit cellen geïsoleerde oestrogeen receptor. Geen uitsluitsel wordt gegeven over de activering of remming van de receptor. In de praktijk geven hierbij zowel actieve (xeno-)oestrogenen als anti-oestrogenen bijvoorbeeld een respons. Een voordeel van de ER-bindingsassay is dat in principe alle in een (milieu)monster aanwezige (xeno-)oestrogenen ongehinderd de receptor kunnen bereiken omdat ze geen celwand hoeven te passeren. Het levert dus een 'worst-case'-schatting op. Voor nadere uitleg van de bepalingsmethode van deze assay wordt verwezen naar paragraaf 2.3.1.
In de YES-assay wordt gebruik gemaakt van een gistcel, waarin een humane oestrogen receptor getransfecteerd is (de gistcel heeft deze zelf niet) plus het ERE en een reportergen (in dit geval het LacZ gen dat codeert voor ß-galactosidase). De activering van de ER-receptor leidt tot toenemende roodkleuring van het groeimedium (zie paragraaf 2.3.2). Dit geeft dus een maat voor de daadwerkelijke 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 grotere moleculen in het milieuextract aanwezig zijn, zullen ze geen respons geven in de YES-assay en daarmee een onderschatting van de oestrogene potentie. In de YES-assay blijkt dat stoffen met anti-oestrogene werking geen verlaging van de respons geven. Hierdoor zullen anti-oestrogenen geen rol spelen in de YES-respons, waardoor juist weer een overschatting van de oestrogene activiteit zou kunnen optreden.
In de ER-CALUX assay wordt in een humane borstkanker cellijn ook het hele proces van binding aan de receptor tot en met de activering van de genen gemeten. De respons is een resultante van zowel oestrogene als de anti-oestrogene activiteit. Voor zover bekend kunnen alle stoffen, zowel hydrofiele als lipofiele, zonder probleem de celwand passeren (zie paragraaf 2.3.3).
In onderstaand tabel worden de kenmerkende factoren van de drie geselecteerde *in vitro* screeningsassays weergegeven.

Tabel 1.3
Kenmerken van de drie geselecteerde *in vitro* assays ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay (+ positieve respons, - remming).

	oestrogenen	**anti-oestrogenen**
ER-CALUX	+	-
YES	+[1]	
ER-bindingsassay	+	+

[1] behalve grote en lipofiele moleculen.

Omdat de 3 genoemde bioassays nog niet eerder toegepast waren op enkele van de gekozen matrices, is in dit onderzoek en in het kader van een STOWA-onderzoek (Belfroid, 1999b) aandacht besteed aan het ontwikkelen van een voorbewerkingsmethode en een reproduceerbare standaardisatie hiervan.

2 Materiaal en methoden

2.1 Monstername en conservering

In het najaar van 1997 zijn op 11 locaties monsters verzameld van oppervlaktewater, zwevend stof en/of sediment (watersystemen).
Op 4 locaties is na twee maanden een tweede monster genomen van dezelfde matrices. In dezelfde periode is afvalwater twee keer bemonsterd op in totaal 8 verschillende locaties. Een overzicht van het aantal locaties en de uitgevoerde analyses per matrix in watersystemen en afvalwater is gegeven in tabel 2.1.

Tabel 2.1
Overzicht van het aantal locaties en de uitgevoerde analyses per matrix in watersystemen en afvalwater.

monstermatrix	hormonen[1]	bisfenol-A	ftalaten[2]	APE's[3]	*in vitro* assays
oppervlaktewater	11	11	5	3	4
zwevend stof		3	3	3	4
sediment		3	3	3	
biota			4	4	
influent, gefiltreerd	5	5	5		5
totaal influent	2	2	5	5	
rioolwater, gefiltreerd	3	3	3		3
totaal rioolwater	1	1	3	3	
effluent, gefiltreerd	5	5	5		5
totaal effluent			5	5	
riool-/zuiveringsslib	7	7	7	5	6

[1] 17ß-oestradiol, 17α-oestradiol, oestron en 17α-ethinyloestradiol.
[2] dimethylftalaat (DMP), diethylftalaat (DEP), di-n-butylftalaat (DBP), butylbenzyl-ftalaat (BBP), di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP) en di-n-octylftalaat (DOP).
[3] alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten.

Alle monsters zijn genomen in schoongespoelde flessen, om te voorkomen dat de te meten verbindingen via contaminatie aan de flessenwand of dop in het te analyseren watermonster worden geïntroduceerd. De monsters zijn verzameld in glazen flessen met een dop met teflon inlaag. Alle monsterflessen zijn voorgespoeld met HPLC water en vervolgens gedurende 10 uur gedroogd bij 250 °C. Vervolgens zijn ze gespoeld met achtereenvolgens tolueen en methanol (voor residu analyse). De flessen bedoeld voor de analyse van natuurlijke hormonen en bisfenol-A zijn na uitstoken eerst voorbehandeld met een dimethyldichloorsilane oplossing. Deze voorbehandeling heeft tot doel de zogenaamde actieve plaatsen op de glaswand, waaraan hormonen kunnen binden, te vullen. Bij de monsters bedoeld voor de analyse van APE's is direct na monstername 30 ml formaline (37% in aqua dest) per liter water toegevoegd, ter stabilisering van het monster.
Omdat bisfenol-A, alkylfenolethoxylaten en ftalaten in verscheidene (plastic) gebruiksvoorwerpen kunnen voorkomen, is de bemonsteringsmethode hierop aangepast en het gebruik van (plastic) hulpmiddelen

zo veel mogelijk vermeden. Na monstername zijn flessen zo snel mogelijk gesloten om achtergrond-contaminatie vanuit de lucht te voorkomen. Transport van de monsters heeft gekoeld binnen 1 dag plaatsgevonden naar het IVM, die zorg heeft gedragen voor verdere verwerking en/of verdere verdeling naar de andere laboratoria.

Oppervlaktewatersystemen

In de maanden september en november 1997 is de monstername van het oppervlaktewater en zwevend stof van de locaties Maassluis en Haringvlietsluizen uitgevoerd door directie Zuid-Holland van Rijkswaterstaat en van de locaties Lobith en Eysden door het RIZA. De monstername van oppervlaktewater, sediment, zwevend stof en biota van de overige locaties is uitgevoerd door het RIKZ in de periode 23 september tot en met 14 oktober 1997. Een uitgebreide beschrijving van de toegepaste bemonsteringsmethoden op de geselecteerde locaties is gegeven in bijlage 1. Tabel 2.2 geeft een overzicht van de analyseparameters voor de diverse oppervlaktewater-systeemmatrices.

Tabel 2.2
Overzicht van parameters geanalyseerd in verschillende matrices in oppervlaktewatersystemen tijdens de bemonsteringserie in september - december 1997.

uitvoerende instantie	oppervlaktewater			zwevend stof		sediment	biota
parameter	sept RIZA	sept RIKZ	nov RIZA	sept RIKZ	nov RIZA	sept/okt RIKZ	sept/okt RIKZ
IVM							
hormonen (α- en ß-oestradiol, oestron, α-ethinyloestradiol)	*	*	*				
hormonen (met ß deglucuronideren)	*						
bisfenol A	*	*	*	*		*	
ftalaten		*		*		*	*
RIVM							
ftalaten			*(dec)				
Moleculaire Tox.-VU							
ER-bindingsassay	*		*		*		
UvA							
alkylfenolethoxylaten		*		*		*	
alkylfenolen		*		*		*	
RIVO							
alkylfenolethoxylaten							*
alkylfenolen							*
WU-TOX							
ER-CALUX	*		*		*		
YES	*		*		*		
overige							
% droge stof						*	
% organische koolstof				*		*	
vetgehalte							*

Afvalwater en riool-/zuiveringsslib
In de maanden september en december 1997 heeft TAUW acht locaties bemonsterd. In bijlage 1 zijn de bemonsteringslocaties meer in detail beschreven.
In verband met mogelijke contaminatie door plastic bemonsteringsapparatuur en leidingen is 24-uurs tijdsproportionele en debietproportionele bemonstering met de bestaande op de locatie beschikbare apparatuur niet mogelijk. Het installeren van geschikte automatische bemonsteringsapparatuur werd voor dit oriënterend onderzoek als te arbeidsintensief en te kostbaar ervaren. Om deze reden zijn twee soorten verzamelmonsters van het afvalwater samengesteld, te weten:

- Een samengesteld verzamelmonster uit circa 15 steekmonsters. Tussen 8.00 en 15.00 uur zijn elk half uur steekmonsters van 1,5 liter met RVS voorwerpen genomen en gekoeld bewaard in een RVS-vat. Het totaal volume aan steekmonsters bedroeg aan het einde van de periode circa 20 liter, waarbij geen rekening is gehouden met debietfluctuaties in de afvalwaterstromen. Na 15.00 uur zijn de monsterflessen gevuld vanuit dit verzamelvat.
- Een volumeproportioneel verzamelmonster, dat met behulp van de aanwezige meet- en bemonsteringsapparatuur is verkregen in dezelfde periode van 8.00 - 15.00 uur.

Om inzicht te verkrijgen in de representativiteit van het samengestelde verzamelmonster zijn door TAUW tijdens beide bemonsteringsperioden in de twee typen verzamelmonster enkele klassieke parameters BZV, CZV, zwevende stof, NO_3/NO_2, NH_4, N-Kj en borium ter vergelijking bepaald. Uit deze vergelijking kan worden geconcludeerd dat er weinig verschil is tussen het samengesteld verzamelmonster en het volumeproportionele monster over de desbetreffende bemonsterde periode van deze dagen.
Van riool- en zuiveringsslib zijn alleen steekmonsters genomen. Op rwzi/awzi's zijn van het primaire en secundaire zuiveringsslib elk half uur tussen 8.00 - 15.00 uur steekmonsters van 0,5 liter genomen. De steekmonsters primair- en secundair zuiveringsslib zijn gescheiden bewaard in RVS-vaten. Aan het eind van de bemonsteringsperiode is van deze beide slibsoorten een verzamelmonster samengesteld op basis van de jaarlijkse verhouding primair en secundair slib. Er is geen rekening gehouden met de eventuele debietfluctuaties tijdens de bemonsteringsdag. Van het rioolslib van de twee industrieterreinen en de woonwijk zijn gedurende de bemonsteringsdag enkele steekmonsters met behulp van een zuigerboor genomen. Deze steekmonsters rioolslib zijn samengesteld tot een verzamelmonster.
In tabel 2.3 volgt een overzicht van de parameters die zijn geanalyseerd op al dan niet gezuiverd communaal en industrieel afvalwater of riool-/zuiveringsslib. De omstandigheden tijdens de monstername zijn vastgelegd in bemonsteringsformulieren, die gebruikt zijn bij de verdere interpretatie van de meetgegevens. Geregistreerd zijn o.a. de totale hoeveelheid aangevoerd afvalwater of slibstroom, de neerslagintensiteit, de temperatuur, enkele specifieke kentallen over de werking van de rwzi/awzi, visuele waarnemingen etc.

Tabel 2.3
Overzicht van parameters geanalyseerd in afvalwater en riool-/zuiveringsslib tijdens de bemonsteringsserie in september - december 1997.

uitvoerende instantie / parameter	afvalwater (samengesteld steekmonster)		afvalwater (proportioneel volumemonster)		riool-/zuiveringsslib (samengesteld streekmonster)	
	sept	dec	sept	dec	sept	dec
IVM						
hormonen (α- en ß-oestradiol, oestron, α-ethinyloestradiol)	*	*				*[1]
hormonen (ß-deglucuronideren)	*					
bisfenol A	*	*				*[1]
ftalaten	*	*				*[1]
RIVM						
ftalaten		*				
Moleculaire Tox.-VU						
ER-bindingsassay	*	*				*[1]
UvA						
alkylfenolethoxylaten	*	*			*	*
alkylfenolen	*	*			*	*
WU-TOX						
ER-CALUX	*	*				*[1]
YES	*	*				*[1]
TAUW						
BZV	*	*	*			
CZV	*	*	*	*		
NH_4, NKj	*	*	*	*		
NO_3/NO_2	*	*	*			
zwevend stof	*	*	*	*		
borium	*	*	*	*	*	*
indamprest					*	*
gloeirest					*	*

[1] Om logistieke redenen zijn deze parameters alleen in de decemberserie bepaald.

2.2 Chemische analyses

2.2.1 Hormonen en bisfenol-A

Hormonen/bisfenol-A in waterige matrices
De analyse van hormonen en bisfenol-A is uitgevoerd door het IVM (Belfroid, 1999a). Water is verzameld in gespoelde en uitgestookte fles-sen voorbehandeld met silyleringsreagens. Elk monster bestaat steeds uit 1 liter water. Het water werd bij binnenkomst op het laboratorium gefiltreerd over 0,45 µm en 1,2 µm glasfilters en geëxtraheerd met een SDB-XC disk. De stoffen op de disk werden

geëlueerd met methanol, waarna het extract werd ingedampt en opgenomen in hexaan.
De hexaan werd gezuiverd over een combinatie van C18 en NH_2 kolommen. Het extract na deze kolommen is opgenomen in HPLC eluens (methanol/water 65/35) en verder opgezuiverd met behulp van High Liquid Performance Chromatography (HPLC). De fractie die hormonen bevat en de fractie die bisfenol-A bevat zijn verzameld en drooggedampt. De extracten zijn gesilyleerd met SIL A reagens, gewassen met water en gedroogd over natriumsulfaat. De detectie is zowel voor de hormonen als voor bisfenol-A gedaan met GC-MS/MS. Ter controle is tevens bij elke meetserie van 6 monsters een blanco meegenomen. De belangrijkste prestatiekenmerken zijn samengevat in onderstaande tabel 2.4.
Van drie influenten zijn hormonen en bisfenol-A tevens gemeten in het residu na filtratie. De filters inclusief de achtergebleven matrix zijn gevriesdroogd en uitgeschud met DCM gedurende 30 minuten. Het monster is vervolgens ingedampt. De extracten zijn verder behandeld en geanalyseerd zoals hierboven beschreven.

Tabel 2.4
Prestatiekenmerken van analysemethode voor vier hormonen en bisfenol-A.

parameter	retentietijd GC-MS/MS	M_W gebruikte molecuul fragmenten	recovery[1] %	detectie limiet [2]		
				opper-vlaktewater (ng/l)	effluent (ng/l)	influent (ng/l)	rioolslib (in ng/g droge stof)
17α-oestradiol	23,4	285+326	88 ± 12	0,1	0,1-1,3	0,1-1,3	0,2-2,1
17ß-oestradiol	24,3	285+326	88 ± 9	0,3-0,6	0,4-0,6	<1	0,2-2,1
oestron	24,1	242+257	98 ± 14	0,1-0,3	0,1-0,4	<1	2,1-11
17α-ethinyloestradiol	26,5	193+231+303	96 ± 8	0,1-0,3	0,2-1,8	0,2-1,4	1,4-17
bisfenol-A	11,4	357 en 358[3]	80 ± 29	3,1-19	<10	<10	15-124

[1] recovery is bepaald met effluent matrix.
[2] detectie limiet varieert met de matrix.
[3] bisfenol-A is instabiel en wordt wisselend als 357 en 358 isotoop aangetroffen.

Hormoonglucuroniden
Omdat verondersteld werd dat hormonen voornamelijk als hormoonglucuroniden worden uitgescheiden, en in deze inactieve vorm in het milieu aanwezig zijn, is tevens de hoeveelheid hormoonglucuroniden bepaald. Dit is gedaan door het extract voor analyse te behandelen met het enzym ß-glucuronidase, waardoor de aanwezige hormoonglucuronides worden gehydrolyseerd naar de oorspronkelijke hormonen. Door zowel monsters behandeld met en zonder het enzym ß-glucuronidase te analyseren, kan de hoeveelheid hormoonglucuroniden worden afgeleid. Na elutie van de extractiedisk, werd de methanol ingedampt, en het residu opgelost in 5 ml 0,2 M natriumacetaatbuffer. Hieraan werd 50 µl ß-glucuronidase (type H2, ß-glucuronidase activiteit 100.000 E/ml, sulfatase activiteit 5.000 E/ml) toegevoegd, waarna gedurende de nacht werd gehydrolyseerd bij 37°C.
Na hydrolyse werd de buffer geëxtraheerd met een combinatie van

C18 (vooraf geactiveerd met methanol en water) en NH_2 kolommetjes (vooraf geactiveerd met ethylacetaat en water) van Baker. Elutie is met 3 x 1 ml ethylacetaat. Het eluaat is vervolgens ingedampt. Verdere clean-up met HPLC was zoals hierboven beschreven. De recovery van de procedure is getest met behulp van een standaard die op bovenbeschreven wijze werd behandeld en was 105 en 116% (duplo meting).

Hormonen/bisfenol-A in niet-waterige matrices
Voor de analyse van hormonen en bisfenol-A in zwevend stof, sediment, riool- en zuiveringsslib en/of biota is gebruik gemaakt van een accelerated solvent extractor (ASE) met als oplosmiddel dichloormethaan/aceton (50/50). Voorafgaand aan de extractie zijn de monsters gevriesdroogd, bij sediment, rioolslib en zuiveringsslib is dit een representatieve suspensie van 100 ml. Bij de ASE techniek is het monster gedurende 20 minuten onder hoge druk (200 psi) en bij 100 °C geëxtraheerd met het oplosmiddel. De extracten zijn verder behandeld en geanalyseerd zoals hierboven beschreven.

2.2.2 Ftalaten

Het IVM heeft de ftalaten bepaald voor de monsters afvalwater, riool-/zuiveringsslib, oppervlaktewater, sediment, zwevend stof en biota. Ter aanvulling hierop zijn de monsters oppervlaktewater en gezuiverd effluent van rwzi's uit de decemberserie ook bepaald op ftalaten door het RIVM.
Bij het IVM zijn de volgende 6 ftalaten gemeten: dimethylftalaat (DMP), diethylftalaat (DEP), di-*n*-butylftalaat (DBP), butylbenzylftalaat (BBP), di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP) en di-*n*-octylftalaat (DOP). Dit zijn tevens de belangrijkste ftalaten voor monitoring volgens de US-EPA. Het RIVM heeft daarnaast tevens dipropylftalaat (DPP), dimethyl-propylftalaat (DMPP) en dicyclohexylftalaat (DCHP) gemeten.

Bij de analyse van ftalaten wordt de detectiegrens vooral bepaald door de mate van contaminatie van de monsters en de beheersing daarvan. In veel typen plastics worden ftalaten toegepast, waardoor ftalaten gemakkelijk als contaminant in de bemonsterings- en/of analyseprocedure kunnen sluipen. Bij de gehele procedure van monstering tot en met analyse is daarom het gebruik van plastic gebruiksvoorwerpen (pipetpunten, binnenkant doppen, extractiemiddelen in plastic flessen) zoveel mogelijk vermeden. Bij het IVM is al het glaswerk dat tijdens de analyse werd gebruikt voorgespoeld met HPLC aceton en hexaan of diethylether en is voor de kwaliteitsborging per 6 monsters een blanco meegenomen. Bij het RIVM werd al het glaswerk vooraf gespoeld met aceton en gecontroleerd op mogelijke contaminatie. Ook de gebruikte oplosmiddelen werden batch-gewijs ingekocht en getest op zuiverheid voor ftalaten. Per monsterserie is bij elke 10 monsters een procedure blanco meegenomen of tenminste ca. 5 blanco's per serie.

Ftalaten in waterige matrices
Ftalaten zijn door het IVM gemeten volgens de methode van Ritsema (1989). Doordat de methode nog steeds wordt verbeterd zijn bij de watermonsters twee modificaties van deze techniek gehanteerd.
Alle watermonsters (steeds 500 ml) werden bij binnenkomst in het IVM-laboratorium gefiltreerd over een 1,2 µm glasfiberfilter (Wattman) en zijn vervolgens direct geëxtraheerd met een C18 speedisk (Baker). De speedisk werd vooraf gespoeld met hexaan/diethylether 75/25 en geactiveerd met methanol en HPLC water. Als voorzorgsmaatregel tegen het aanzuigen van ftalaten uit de lucht tijdens de extractie is

voor de pomp een extra speedisk in de extractie-opstelling gezet die deze ftalaten uit de lucht invangt. Elutie van de verbindingen van de disk gebeurde eveneens met hexaan/diethylether 75/25. (De oppervlaktewater monsters Kanaal Gent-Terneuzen, IJmuiden en Beneluxtunnel zijn per abuis gefiltreerd over 0,45 µm en 1,2 µm glasfilters en geëxtraheerd met een SDB-XC disk. Bij deze monsters zijn geen verdere voorzorgsmaatregelen genomen.)
De extracten van de effluentmonsters uit de septemberserie en de extracten van de oppervlaktewater monsters van Oosterschelde en Delfzijl werden vervolgens ingedampt en opgenomen in hexaan, waarna het zonder verdere opzuivering kon worden geanalyseerd met behulp van GC-ECD met een capillaire kolom (Hewlett-Packard HP-ULTRA 2, lengte 50 m, i.d. 0,2 mm, filmdikte 0,33 µm) en splitless mode injectie (modificatie A). Deze methode is vanwege de niet-specifieke detectietechniek verder ontwikkeld wat heeft geresulteerd in onderstaande methode B. Bij de overige monsters is vóór extractie een gedeutereerde ftalaat standaard van DMP*, DEP*, DBP*, BBP*, DEHP* en DOP* als interne standaard toegevoegd om per monster te kunnen corrigeren voor de recovery. Na extractie met de speedisk zijn de extracten ingedampt en opgenomen in iso-octaan. Detectie gebeurde met GC-MS/MS met Gerstel injector in ITD mode (iontrap detector in electron impact van MS/MS mode) (modificatie B). Gebruik is gemaakt van een 25 m SGE BPX5 kolom met 0,22 mm i.d. en 0,25 µm filmdikte. Identificatie en kwantificering werd gedaan op basis van retentie, massaselectie en piekoppervlakte waarbij is aangenomen dat de respons van gedeutereerde ftalaten gelijk is aan die van ongedeutereerde ftalaten. De gerapporteerde waarden werden hiermee gecorrigeerd voor recovery en voor achtergrondcontaminatie. De prestatiekarakteristieken van beide methodes zijn samengevat in tabel 2.5.

Tabel 2.5
Prestatiekarakteristieken van twee modificaties van de methode van Ritsema (1989) voor de analyse van ftalaten in waterige monsters uitgevoerd door het IVM.

ftalaten	modificatie A		modificatie B	
	recovery [1] (%)	detectielimiet (µg/l)	recovery (%)	detectielimiet (µg/l)
dimethylftalaat (DMP)	50	0,06	58 ± 31	0,01
diethylftalaat (DEP)	50	0,01	81 ± 3	0,01
di-n-butylftalaat (DBP)	50	0,05	100 ± 31	0,09
butylbenzylftalaat (BBP)	60	0,06	118 ± 44	0,04
di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP)	20	0,12	82 ± 10	0,34
di-n-octylftalaat (DOP)	20	0,01	70 ± 11	0,20

[1] Recovery en detectielimiet is bepaald in enkelvoud.

Op het RIVM werd van de 4 oppervlaktewatermonsters steeds een deelmonster van 250 ml voor de bepaling van de verschillende ftalaten in bewerking genomen. Watermonsters, welke deeltjes bevatten,

werden na 24 uur staan bij 4 °C gedecanteerd en vervolgens verder in bewerking genomen. Aan het water werden gedeutereerde ftalaat-standaarden diethylftalaat (DEP*); dibutylftalaat (DBP*); butylbenzylftalaat (BBP*); diethylhexylftalaat (DEHP*); dimethylftalaat (DMP*); dioctylftalaat (DOP*) als interne standaarden toegevoegd. Het deelmonster werd over een glazen SPE kolom gevuld met RP-C18PolarPlus gebracht waarna de kolom geëlueerd wordt met een mengsel pentaan-MTBE. Vervolgens werd aan dit extract een injectie standaard (diallylftalaat) toegevoegd. Het extract werd met behulp van capillaire gaschromatografie met massaselectieve detectie (GC-MS) geanalyseerd. Identificatie en kwantificering werd gedaan op basis van retentie, massaselectie en piekoppervlakte waarbij werd aangenomen dat de respons van gedeutereerde ftalaten gelijk is aan die van ongedeutereerde ftalaten. De gerapporteerde waarden werden hiermee gecorrigeerd voor recovery middels de toegevoegde gedeutereerde standaard en voor blanco bijdrage.
De bepalingsgrenzen voor ftalaten in water lagen bij het RIVM tussen 0,01 en 0,1 µg/l (voor DBP en DEHP) met een herhaalbaarheid van 5 tot 10%. De recovery lag voor de meeste komponenten tussen 82 en 99%; voor DEHP en DOP lag deze rond 60%; dit levert geen problemen op aangezien gewerkt werd met gedeutereerde standaarden.
De blancoprocedure bedroeg voor de meeste ftalaten 0,02 µg/l; voor DMPP, DBP en DEHP is dit 0,13 µg/l.

Ftalaten in niet-waterige matrices
Voor de analyse van ftalaten in zwevend stof, sediment, riool-/zuiveringsslib en/of biota bij het IVM is gebruik gemaakt van een accelerated solvent extractor (ASE) met als oplosmiddel dichloormethaan/aceton (50/50). Voorafgaand aan de extractie zijn de monsters gevriesdroogd, bij sediment, rioolslib en zuiveringsslib is dit een representatieve suspensie van 100 ml. Bij de ASE techniek is het monster gedurende 20 minuten onder hoge druk (200 psi) en bij 100 °C geëxtraheerd met het oplosmiddel. De extracten zijn verder behandeld en geanalyseerd zoals hierboven beschreven met GC-ITD. De prestatiekarakteristieken van deze methode zijn opgenomen in onderstaande tabel 2.6.

Tabel 2.6
Prestatiekarakteristieken voor de analysemethode van ftalaten in slib, sediment, zwevend stof en biota, uitgevoerd door IVM.

ftalaten	slib/sediment/zwevend stof		biota
	aantoonbaarheidsgrens[1] (µg/kg d.s.)	recovery[2] (%)	aantoonbaarheidsgrens[1] (µg/kg d.s.)
dimethylftalaat (DMP)	11-290	32	206
diethylftalaat (DEP)	11-580	68	206
di-n-butylftalaat (DBP)	22	100	206
butylbenzylftalaat (BBP)	25-940	106	516
di(2-ethylhexyl)ftalaat (DEHP)		124	1342
di-n-octylftalaat (DOP)	81-1470	112	206

[1] Aantoonbaarheidsgrens is afhankelijk van matrix.
[2] De recovery is in enkelvoud bepaald met een gespiked SETOC 713 monster en is dus een procedurele recovery en niet een extractie recovery. Er is geen correctie uitgevoerd voor de recovery.

Naast de bepaling van de ftalaten in de waterfractie is de vaste matrix (residu, dus wat op de filters is achtergebleven) van alle influent- en effluentmonsters, genomen in december (alle modificatie B monsters) eveneens geanalyseerd op ftalaten. Om logistieke redenen zijn deze monsters niet voorbehandeld met ASE maar zijn de filters inclusief de achtergebleven matrix gevriesdroogd en uitgeschud met DCM gedurende 30 minuten. Vaste deeltjes zijn vervolgens weggevangen met glaswol, waarna het monster is ingedampt en overgebracht in iso-octaan. De recovery van de extractie procedure is onbekend. Vooral voor de hydrofobe ftalaten (DEHP, DOP) wordt verwacht dat de extractie procedure niet optimaal is, maar dat mogelijk een deel van de verbindingen stevig gebonden aan de vaste matrix blijft.

2.2.3 Alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten

AP(E)'s in waterige matrices

Alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in oppervlakte- en afvalwater-monsters werden gemeten door MTC. De monsters werden direct na monstername gestabiliseerd met 3% formaline oplossing (37% w/w formaldehyde in water). Na binnenkomst op het laboratorium werden de watermonsters opgeslagen bij 4 °C. Na homogeniseren van de watermonsters door middel van zwenken werd een aliquot van 60 ml aangevuld met 35 ml methanol in een erlenmeijer en over een solid phase extractie (SPE) kolom (C18 patroon) gevoerd.
De erlenmeijer werd nagespoeld met 5 ml methanol en ook aan de SPE kolom toegevoegd. De analytes werden vervolgens van de SPE kolom geëlueerd met 10 ml methanol. Het eluaat werd ingedampt met stikstof en heropgelost in 1 ml dichloormethaan/hexaan (1:3, v/v). Voor een zuiveringsstap werd het DCM/hexaan extract op een adsorptiechromatografische kolom gebracht, bestaande uit (van onder naar boven) 7 g 5% (w/w) water-gedesactiveerde Al_2O_3, 0,6 g $AgNO_3$-geïmpregneerde SiO_2 (ter verwijdering van zwavelverbindingen), en 2 g watervrij Na_2SO_4 (voor droging van het extract). De kolom werd daarna geëlueerd met 90 ml DCM/hexaan (1:3, v/v). Het eluaat werd niet verder gebruikt. Voor het maken van de volgende fractie werd de kolom geëlueerd met 90 ml DCM/MeOH (8:2, v/v). Dit eluaat bevat de AP/APE en werd in een monsterflesje ingedampt tot ca. 1 ml.
De monsterextracten werden geanalyseerd met behulp van HPLC met fluorescentie-detectie. Voor de kwantitatieve analyse is gebruik gemaakt van een reversed-phase (RP) HPLC methode en commercieel beschikbare standaarden. Een aantal monsterextracten is tevens geanalyseerd met een normal phase methode, teneinde inzicht te krijgen in de aard van de oligomeersamenstelling welke in de monsters werd aangetroffen. Op grond van deze normal phase analyses is geconstateerd dat de oligomeersamenstelling in de monsters, voor zover het de nonylfenolethoxylaten betrof, meestal het best overeenkwam met die van de NP4E standaard, d.w.z. een mengsel van nonylfenolethoxylaten met gemiddeld 4 ethoxylaateenheden. In het geval van octylfenolethoxylaten was uitsluitend een standaard met gemiddeld 8 à 9 ethoxylaateenheden beschikbaar, zodat de kwantitatieve analyse van OPE daarop is gebaseerd. Octylfenol en nonylfenol werden gekwantificeerd met t-octylfenol en nonylfenol (een commercieel mengsel van verschillend vertakte nonyl-isomeren). De detectielimiet van de methode is ca. 0,10 µg/l, maar varieert per monster.
Voor RP-HPLC werd een 125 x 4 mm Lichrospher 100 RP-18 (5 µm) kolom gebruikt. De extracten werden isocratisch geëlueerd met een

flow van 1,0 ml/min. De mobiele fase bestond uit een mengsel van methanol/water (80:20 v/v). Detectie gebeurde met een fluorescentie-detector, waarbij een excitatiegolflengte van 225 nm en een emissie-golflengte van 301 nm werden gehanteerd. Voor de normal phase analyse werd een 100 x 4,6 mm Hypersil 3 NH2 (3 µm) kolom gebruikt. De samenstelling van de mobiele fase werd gevarieerd zoals is aangegeven in tabel 2.7. Detectie gebeurde met een fluorescentie detector bij dezelfde condities als bij RP-HPLC. De detectielimiet van de methode is ca. 0,10 µg/l en 10 µg/kg droge stof en varieert per monster.

Tabel 2.7
Samenstelling van de mobiele fase en het gradiënt elutieprogramma gebruikt bij de normal-phase HPLC analyse van AP(E).

time	flow (ml/min)	% n-hexaan	% 2-propanol	% H_2O	gradiënt
0	1,5	98	2	0	-
3	1,5	78	20	2	lineair
20	1,5	50	47	3	lineair
22	1,5	50	47	3	-
23	1,5	0	97	3	lineair

Voor de kwaliteitsborging is voor iedere afzonderlijke stap in de gehele analyseprocedure een optimalisatie uitgevoerd voorafgaand aan de analyses van de monsters. De optimalisaties werden beoordeeld aan de hand van de recovery van een mengsel van commerciële AP- en APE standaarden. Recoveries van elke stap dienden boven de 85 % te zijn voor een acceptabele optimalisatie. Per 6 monsters is steeds een blanco meegenomen. In het merendeel van de batches werd tevens een recoverymonster, een spike van de commerciële standaard NP4E, meegenomen. Deze recoverymonsters doorliepen de gehele procedure.
De recoverymonsters hadden een meervoudig doel, tw.: a] het vaststellen van de actuele recovery, b] vervanging van gecertificeerd referentiemateriaal bij gebrek aan zodanig materiaal en c] het signaleren van trends (control chart). Wanneer de recovery van het opnieuw geanalyseerde monster buiten het 75-125 % interval van het voorgaande gemiddelde zou treden diende dit als een signaal voor verdere controle van de analyseprocedure. Dit heeft zich halverwege tijdens het project inderdaad voorgedaan (recoveries daalden tot beneden de 75 %). Dit leidde tot inspectie van alle afzonderlijke stappen in de procedure. Uit deze inspecties bleek dat een nieuwe batch aluminiumoxide gebruikt voor de zuivering andere eigenschappen bleek te hebben dan in de initiële optimalisaties was vastgesteld. De desactiveringsgraad van het adsorbens bleek zeer kritisch. Een nieuwe optimalisatie bleek nodig. Deze leidde uiteindelijk tot een kleine aanpassing van elutieregime met als gevolg herstel van de recoverywaarden.

AP(E)'s in niet-waterige matrices
Sediment, zwevend stof en riool-/zuiveringsslib monsters werden na binnenkomst op het laboratorium opgeslagen bij <-20 °C. De analyse van AP(E)'s in deze monsters berust op hetzelfde principe als hierboven beschreven. De slib en sedimentmonsters werden zo goed mogelijk gehomogeniseerd door zwenken. Een aliquot werd overgeschonken in een centrifugebuis, gewogen en afgedraaid bij ca. 5000 rpm gedurende ca. 25 min. De waterlaag werd afgeschonken en gewogen en

het residu werd voor verdere bewerking (Soxhlet extractie) gebruikt. Een deel van het slib/sedimentresidu werd gebruikt voor de vochtbepaling. Daartoe werd een representatief deel van het residu afgewogen in een porceleinen schaaltje. Het schaaltje werd afgedekt met aluminiumfolie en in een oven geplaatst bij 105 °C, en gedroogd tot constant gewicht.
De monsters zwevende stof werden voor extractie alleen gedroogd. Indien de monsters bovenstaand water bevatten werd dit afgegoten. Van het resterende monster werd een aliquot overgebracht in een porceleinen schaaltje, afgedekt met aluminiumfolie en bij 40 °C gedroogd tot constant gewicht. Bij de zwevende stof monsters werd een lagere droogtemperatuur aangehouden aangezien (een gedeelte van) het gedroogde monster zelf verder in bewerking (Soxhlet extractie) werd genomen.
Ca. 10-50 g van de riool-/zuiveringsslib/sediment-/zwevend stof aliquots werd geëxtraheerd met methanol gedurende ca. 16 u met behulp van Soxhlet extractie. De glazen Soxhlet extractiehuls was vooraf voorzien van een laagje SiO_2. Het extract werd daarna ingedampt tot 35 ml, en 60 ml water werd toegevoegd. Het extract was daarmee gereed voor zuivering met de SPE kolom. De detectielimiet van de methode is 10 µg/kg droge stof, maar varieert per monster.

AP(E)'s in biota
Alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in biota zijn gemeten door RIVO-DLO. Voorafgaand aan de extractie zijn de monsters (ca. 10 gram) eerst voorbehandeld met galzouten om de aanwezige vetten te dispergeren. Extractie vond vervolgens plaats met behulp van stoomdestillatie onder neutrale pH (6,5-7). Het extract werd opgevangen in ethylacetaat en verder behandeld volgens boven beschreven methode voor sediment en zwevend stof. Detectielimiet voor de AP(E)'s bedroeg 0,15 mg/kg op natgewicht basis.

2.3 *In vitro* assays

De voorbewerking is uitgevoerd door IVM en de gevolgde procedure is vergelijkbaar met de eerste stappen voor de analyse van hormonen/-bisfenol-A. Het water werd bij binnenkomst op het laboratorium gefiltreerd over niet voorgespoelde 0,45 en 1,2 µm glasfilters (Whatman, GF/C filters) en geëxtraheerd met een SDB-XC disk. De stoffen op de disk werden geëlueerd met 3 x 5 ml methanol, waarna het extract werd ingedampt en opgenomen in DMSO. De monsters oppervlaktewater bestonden steeds uit 9 liter water. Per 1,5 liter werd 1 disk gebruikt. Na extractie werden de extracten samengevoegd en indien logistiek gewenst gesplitst voor toepassing in de ER-bindingsassay bij Moleculaire Toxicologie-VU en in de CALUX en YES-assay bij WU, sectie Toxicologie. Alle extracten zijn vervolgens onverdund of in een aantal verdunningen in DMSO toegepast in de *in vitro* assays. Al het glas-werk werd vooraf gespoeld met methanol om achtergrondcontaminatie te voorkomen.
Van het afvalwater (influent of effluent) is in eerste instantie per monster circa 3 liter geëxtraheerd (septemberserie). Later (decemberserie) werd steeds 2 liter effluent en 0,7-1 liter influent in behandeling genomen. Per 1 liter werd 1 extractiedisk gebruikt. De blanco's bestonden uit 1 liter HPLC water en werden identiek behandeld.
Extra monsters zijn geëxtraheerd voor behandeling met het enzym ß-glucuronidase. Uit de chemische analyses is bekend dat de gebruikte SDB-XC disks de glucuronidevorm van 17ß-oestradiol kunnen extra-

heren. De recovery in de chemische analyse van deze verbinding was 105 en 116 % (duplo meting). Na extractie werd het eluens in methanol ingedampt bij 60 °C, en het residu opgelost in 5 ml 0,2 M natrium-acetaatbuffer. Hieraan werd 50 µl glucuronidase (type H2, ß-glucuronidase activiteit 100.000 E/ml, sulfatase activiteit 5.000 E/ml) toege-voegd, en gedurende de nacht gehydrolyseerd bij 37 °C. Na hydrolyse werd de buffer geëxtraheerd met een combinatie van C18 (vooraf geactiveerd met methanol en water) en NH_2 kolommetjes (vooraf geactiveerd met ethylacetaat en water) van Baker. Elutie is uitgevoerd met 3 x 1 ml ethylacetaat. Het eluaat is vervolgens ingedampt en opgenomen in 100 µl DMSO. Er zijn extra blanco's meegenomen bestaande uit 100 µl methanol, 5 ml 0,2 M natrium-acetaatbuffer en 50 µl glucuronidase, die gedurende de verdere procedure meeliepen.

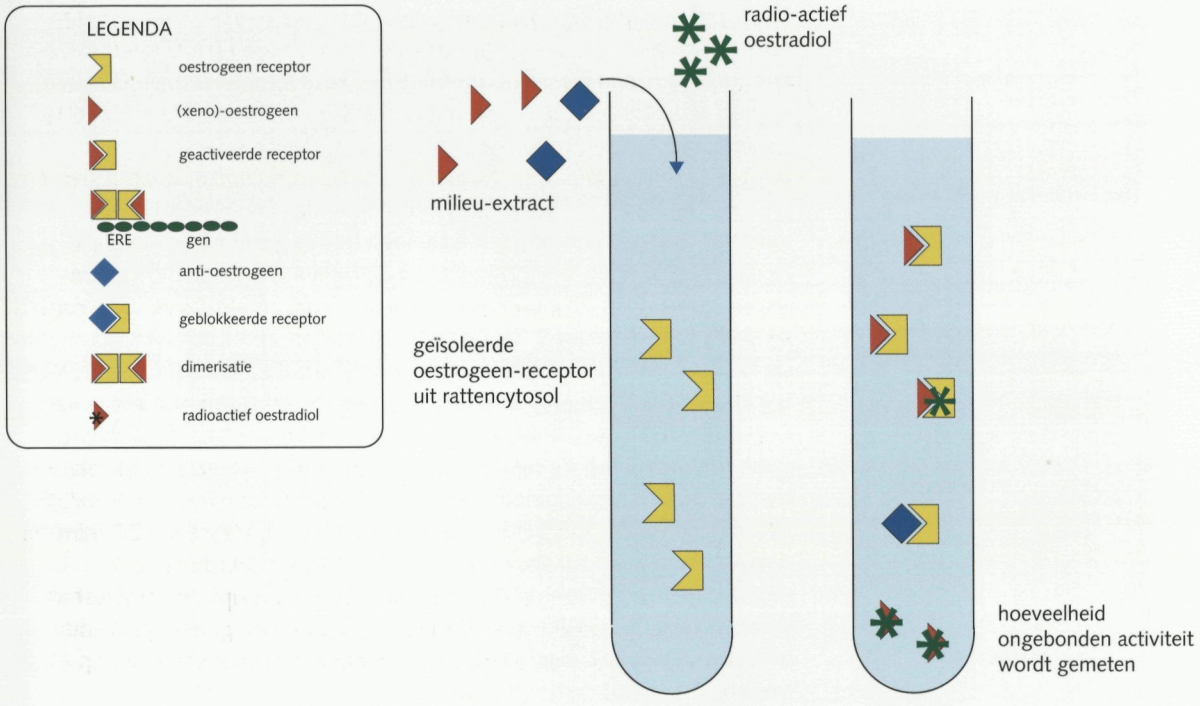
Van het riool-/zuiveringsslib werd een representatieve suspensie van 100 ml gevriesdroogd. Van het gevriesdroogde materiaal werd circa 1 gram vaste stof vervolgens geëxtraheerd met een accelerated solvent extractor (ASE) met als oplosmiddel dichloormethaan/aceton (50/50) of hexaan. Bij deze techniek wordt het monster gedurende 20 minuten onder hoge druk (200 psi) en bij 100 °C geëxtraheerd met het oplosmiddel. Het extract werd vervolgens ingedampt en opgelost in DMSO. De blanco bestond uit silica, die tijdens de gehele procedure inclusief vriesdrogen meeliep. De zwevende stof monsters zijn op identieke wijze als het slib behandeld.

2.3.1 ER-bindingsassay

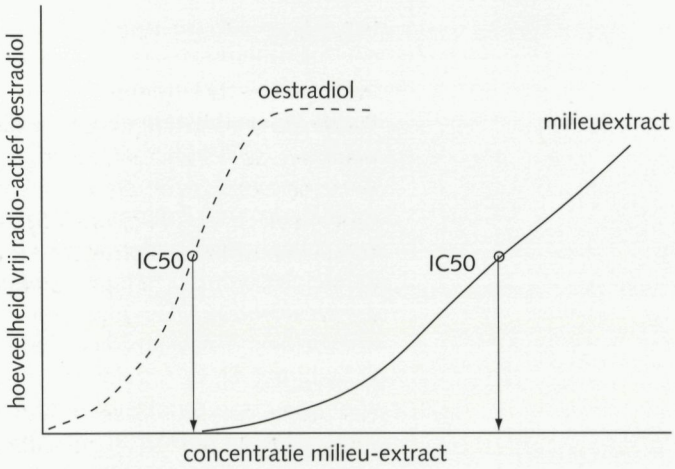
Principe van de bepaling
De oestrogeen bindingsassay is een competitieve verdringingsassay, waarmee de binding van zowel oestrogene als anti-oestrogene potentie wordt gemeten. Beide soorten stoffen geven een vergelijkbare type respons, zodat het uiteindelijke resultaat een maat is voor de totale hoeveelheid oestrogenen plus anti-oestrogenen in het monster. Geen uitsluitsel wordt gegeven over de resulterende activering of remming van de ER-receptor.

Methode
Rat uterus cytosol, waarin zich de ER-receptor bevindt, wordt gedurende 3 uur bij 4 °C geïncubeerd met het milieu-extract (oppervlaktewater, influent, effluent, riool-/zuiveringsslib of zwevend stof) in verschillende verdunningen opgelost in DMSO en met een vaste concentratie radioactief [^{3}H]-oestradiol in Tris-EDTA buffer. Na afloop van de reactie wordt de hoeveelheid radioactiviteit gemeten die niet receptorgebonden is. Dit is weergegeven in figuur 2.1.
Bij een kleine verdunning (dus veel monstermateriaal), kan er maar weinig radioactief [^{3}H]-oestradiol aan de receptor binden (er vindt veel binding aan de receptor plaats door oestrogene stoffen uit het milieu-monster) en wordt een hoge concentratie aan ongebonden radioactief [^{3}H]-oestradiol gemeten. Het % ongebonden radioactief gelabeld oestradiol wordt vervolgens grafisch uitgezet tegen de gebruikte verdunning in het milieumonster. Uit de gefitte curve kan vervolgens de IC_{50} worden berekend (verdunning van het milieumonster die resulteert in 50 % verdringing van [^{3}H]-oestradiol van de ER-receptor) (zie figuur 2.2). Op basis hiervan, en de IC_{50} van 17ß-oestradiol als referentiewaarde kan vervolgens het aantal oestrogene equivalenten (EEQ) in het oorspronkelijke milieumonster worden berekend.

Figuur 2.1
Principe van de ER-bindingsassay.



Figuur 2.2
Principe van de kwantificering van de oestrogene potentie in de ER-bindingsassay.



Op deze wijze wordt het eventuele probleem van de verschillende vorm (hellingshoek) van de dosis-effect curven omzeild. Hierbij dient aange-tekend te worden, dat sommige stoffen juist anti-oestrogeen zijn en ook een binding geven. Het resultaat is uitgedrukt in pmol/l wat een maat is voor totale hoeveelheid aan de ER-receptor gebonden stoffen en in ng/l oestradiol equivalenten zodat direct een vergelijking met de resultaten van de chemische estradiol equivalenten analyses van 17ß-oestradiol mogelijk is.

2.3.2 YES assay

Principe van de bepaling

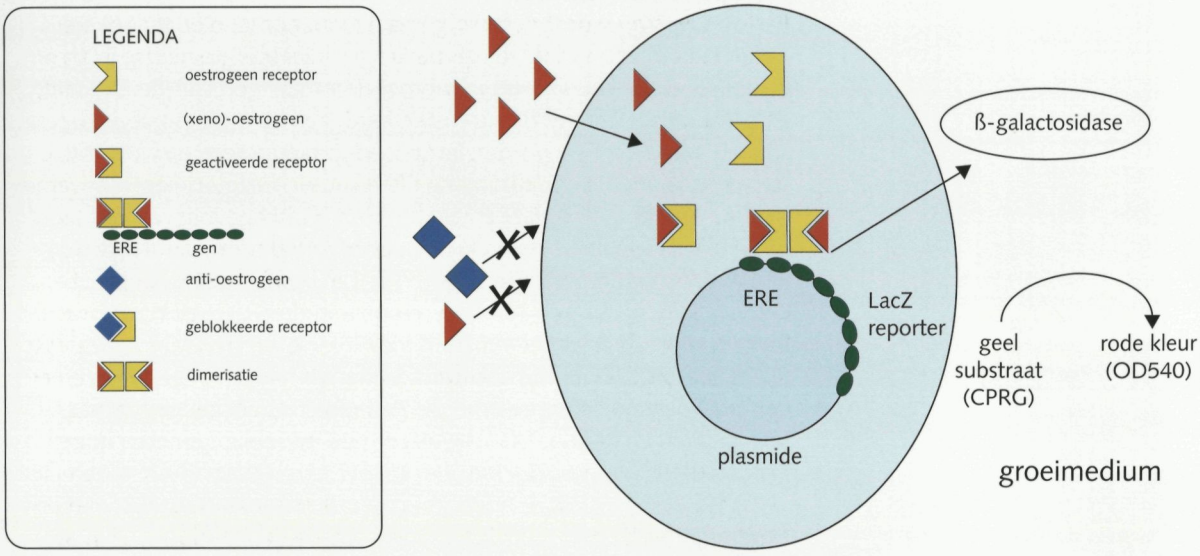
In de YES-assay wordt gebruik gemaakt van een gistcel, waarin een humane oestrogen receptor getransfecteerd is (de gistcel heeft deze zelf niet) plus een plasmide met het ERE (estrogen response element) en een reportergen (in dit geval het LacZ-gen dat codeert voor ß-galactosidase. Een (xeno-)oestrogene stof, die de celwand kan passeren zal zich binden aan de humane oestrogen receptor, deze activeren, waarna binding aan het ERE zal optreden. Het LacZ reporter gen zal vervolgens ß-galactosidase uitscheiden in het groeimedium van de gist. In dit groeimedium bevindt zich ook het gele substraat CPRG wat onder invloed van ß-galactosidase rood kleurt en gemeten kan worden bij 540 nm (zie figuur 2.3). Deze roodkleuring geeft dus een maat voor de (xeno-)oestrogenen met uitzondering van de grotere moleculen en vrij lipofiele moleculen, die niet of nauwelijks de celmembraan passeren. In de YES-assay blijkt dat stoffen met anti-oestrogene werking geen verlaging van de respons geven. Dit hangt waarschijnlijk samen met het beperkte stukje DNA dat in de cellen is ingebracht en met de beperkte doorlaatbaarheid van de celmembraan. Hierdoor zullen anti-oestrogenen geen rol spelen in de YES-respons, waardoor juist weer een overschatting van de oestrogene activiteit zou kunnen optreden. Wanneer de celwanden lek worden gemaakt met bijvoorbeeld het antibioticum Nystatine blijkt een anti-oestrogene respons wel op te kunnen treden. Dit wordt echter in een normale YES-assay niet gedaan.

Methode

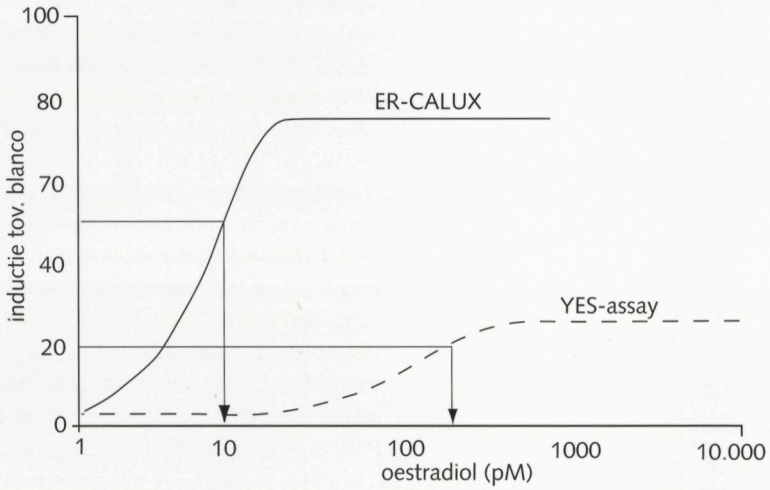
De YES-gistcelsuspensie wordt in een vaste dichtheid gepipetteerd in een microtiterplaat. Van de suspensie wordt daarom de optische dichtheid bij 620 nm op 1 gebracht (OD620=1) waarna 200 µl steriel wordt gepipetteerd in een 96-wells plaat. In het medium is het gele substraat (chlorophenol red-b-D-galactopyranoside, CPRG) aanwezig dat onder invloed van eventueel gevormd ß-galactosidase (de reporter) rood kleurt. Van ieder monster wordt in triplo 4 µl toegevoegd aan een well. Na goed schudden wordt de plaat 2 dagen geïncubeerd bij 32 °C. Iedere dag wordt 5 minuten geschud op een plaatschudder. Na 2 of 3 dagen wordt de OD_{540} gemeten voor de kleur (indicatief voor de hoeveelheid ß-galactosidase die is gevormd en de OD_{620} voor de gistcelgroei. Bij sterk gekleurde monsters is het nodig om te corrigeren voor de achtergrondkleur, omdat het monster bij de meting nog in de well aanwezig is. Daarom wordt bij gekleurde monsters ook een bepaling zonder gist uitgevoerd zodat hiervoor kan worden gecorrigeerd.

De hoeveelheid gemeten licht wordt geïnterpoleerd in de ijklijn van oestradiol, waarna de hoeveelheid oestradiol-equivalenten kan worden afgelezen (zie figuur 2.4).

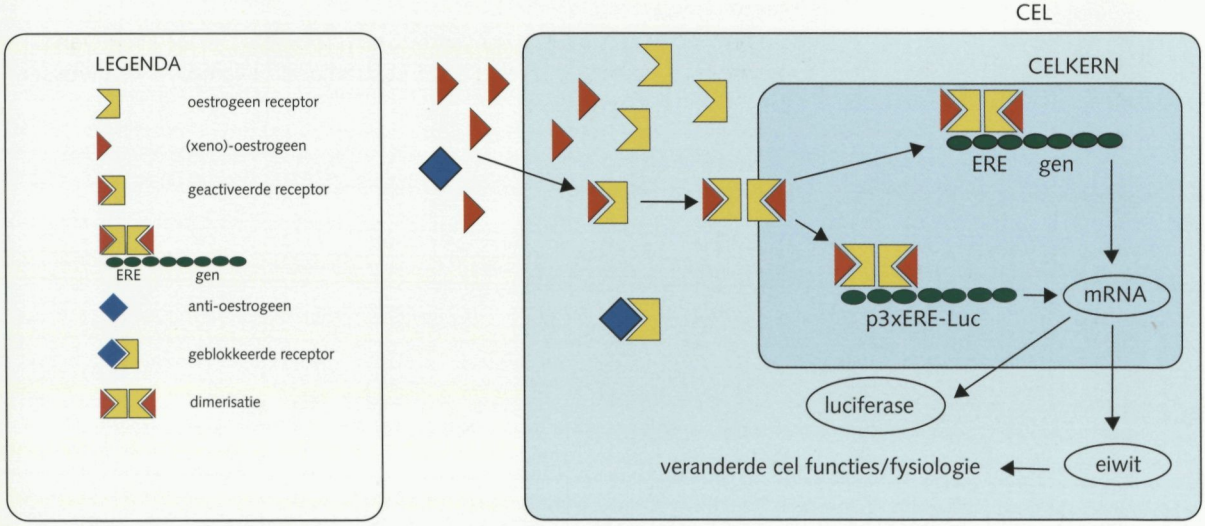
Figuur 2.3
Principe van de YES-assay.



Figuur 2.4
Principe van de kwantificering van de oestro-gene potentie in de YES-assay en de ER-CALUX assay.



Figuur 2.5
Principe van de ER-CALUX assay.



2.3.3 ER-CALUX assay

Principe van de methode
De ER-CALUX assay wordt uitgevoerd in de humane borstkanker T47D cellijn waarin van nature al een oestrogen receptor aanwezig is. In de celkern is stabiel een reportergen met 3 herhalingen van de ERE (estrogen responsive element) getransfecteerd. Wanneer (xeno-)oestrogene stoffen aan de cellen worden aangeboden zullen deze de celwand passeren, binden aan de humane ER-receptor, deze activeren, waarna binding aan de ERE optreedt (zie figuur 2.5). Als gevolg hiervan wordt er in de cel een hoeveelheid luciferase gevormd, deze is rechtstreeks een maat voor de oestrogene potentie van het aangeboden milieuextract. Anti-oestrogene stoffen remmen in de ER-CALUX assay de luciferase productie in een mate die overeenkomt met hun antagonistische potentie. Door het substraat luciferine toe te voegen wordt er een hoeveelheid licht gevormd die een maat is voor de gevormde hoeveelheid luciferase. Dit licht wordt heel gevoelig gemeten in een luminometer.

Methode
De cellen worden uitgeplaat in 100 µl assaymedium. In dit medium zitten, in tegenstelling tot het normale groeimedium (kweekmedium) van de cellen geen hormonen (vooral geen oestradiol) of fenol-rood, omdat dit een (xeno)-oestrogene stof is, waarop de cellen reageren. Om de resterende hormonen goed kwijt te raken wordt het assaymedium na 1 dag ververst, en nogmaals ververst bij de blootstelling. De blootstellingsperiode van het milieumonster is 24 uur, hierna worden de cellen gewassen met verdunde buffer om zoveel mogelijk zouten uit het assaymedium te verwijderen. Hierna wordt lysisbuffer met een zeer lage osmolariteit toegevoegd om de cellen te laten zwellen. Door de gezwollen cellen bij -80 °C in te vriezen knappen ze kapot en komt de gevormde luciferase vrij. In een luminometer wordt automatisch het substraat luciferine toegevoegd, en het lichtsignaal gemeten. De hoeveelheid gemeten licht wordt geïnterpoleerd in de ijklijn van oestradiol, waarna de hoeveelheid oestradiol-equivalenten kan worden afgelezen (zie figuur 2.4).

3 Resultaten

3.1 Hormonen

3.1.1 Mogelijkheden en beperkingen van analysemethode

Detectie van de hormonen is uitgevoerd met GC-MS/MS. Dit impliceert dat de gepresenteerde resultaten zijn gebaseerd op geïdentificeerde stoffen. De recovery van de gebruikte analysemethode is 88 tot 98% afhankelijk van de verbinding. De methode is geschikt voor het analyseren van gehalten in oppervlaktewater tot concentraties in de orde van 0,5-1 ng/l. Voor deze analyse is in principe 1 liter monster voldoende. De onderste detectielimiet wordt in sterke mate bepaald door de vervuilingsgraad van het monster.
De gebruikte analysemethode is eveneens geschikt voor het analyseren van hormonen in de meeste influent- en effluentmonsters, waarbij eveneens 1 liter water voldoende is.
Gehalten van hormonen in riool-/zuiveringsslib (de gehele matrix, dus zowel waterige fractie als vaste fractie) liggen vrijwel allen onder de (hoge) detectielimiet van 2 ng/g droge stof. Gezien de lage concentratie waarmee hormonen over het algemeen aanwezig zijn, kan derhalve op grond van deze resultaten geen uitspraak worden gedaan over de aanwezigheid van deze verbindingen in riool-/zuiveringsslib.
Niet alle oppervlaktewatermonsters bedoeld voor de analyse van hormonen zijn aangeleverd in gesilyleerde flessen. Uit aanvullend onderzoek is gebleken dat het geen noodzaak is om gesilyleerde flessen bij de monstername te gebruiken voor de analyse van hormonen.
Over de stabiliteit van hormonen in oppervlaktewater en afvalwater waren voor aanvang van deze oriënterende studie geen gegevens beschikbaar. Er is daarom naar gestreefd alle monsters binnen 1 dag op het laboratorium te verwerken. In een aantal gevallen, zoals alle afvalwatermonsters van de eerste meetserie in september is dit niet gelukt en zijn de monsters tot ca. 10 dagen opgeslagen in de koeling. Uit aanvullend onderzoek naar de stabiliteit van hormonen is gebleken dat opslag gedurende 10 dagen bij 4 °C geen duidelijke afname van de concentraties hormonen is te constateren.

3.1.2 Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen

Algemeen

Een overzicht van de aanwezigheid van de vrouwelijke hormonen 17α-oestradiol, 17ß-oestradiol, oestron en het 17α-ethinyloestradiol in de diverse matrices van oppervlaktewater en afvalwater is gegeven in tabel 3.1. Alle verkregen meetgegevens van de hormoonanalyses voor de diverse matrices zijn per locatie voor oppervlaktewater en afvalwater gegeven in respectievelijk bijlage 2 en 3.

Tabel 3.1
Gemeten concentratie ranges (in ng/l) van hormonen in diverse matrices.

	17ß-oestradiol	17α-oestradiol	oestron	17α-ethinyl oestradiol
milieumatrices				
oppervlaktewater	<d.l. - 5,5	<d.l. - 1,1	<d.l. - 5,3	<d.l. - 4,3
stedelijk afvalwater				
influent/rioolwater	10 - 48	<d.l. - 9	10 - 140	<d.l. - 10
riool-/zuiveringsslib[1]	<d.l. - 4,3[2]	<d.l.	<d.l.	<d.l.
effluent	<d.l. - 12	<d.l. - 5	<d.l. - 47	<d.l. - 8
industrieel afvalwater				
influent/rioolwater	1 - 25	<d.l. - 8	3 - 92	<d.l. - 8
riool-/zuiveringsslib[1]	<d.l.	<d.l.	<d.l.	<d.l.
effluent	<d.l. - 1,8	<d.l. - 2,1	<d.l. - 11	<d.l. - 3

[1] in µg/kg d.s.; gehalte bepaald in representatieve suspensie rioolslib.
[2] 17ß-oestradiol in alle monsters riool-/zuiveringsslib <detectielimiet, m.u.v. woonwijk Oostermeente te Steenwijk (OOST) waar 4,3 µg/kg ds werd aangetroffen.

De gehalten van hormonen in oppervlaktewater liggen vaak beneden of rond de detectielimiet (afhankelijk van de matrix 0,1 tot 0,4 ng/l). De hormonen 17ß-oestradiol en oestron werden het meest aangetroffen, terwijl de concentraties van 17α-oestradiol en 17α-ethinyloestradiol veelal onder de detectielimiet bleven.

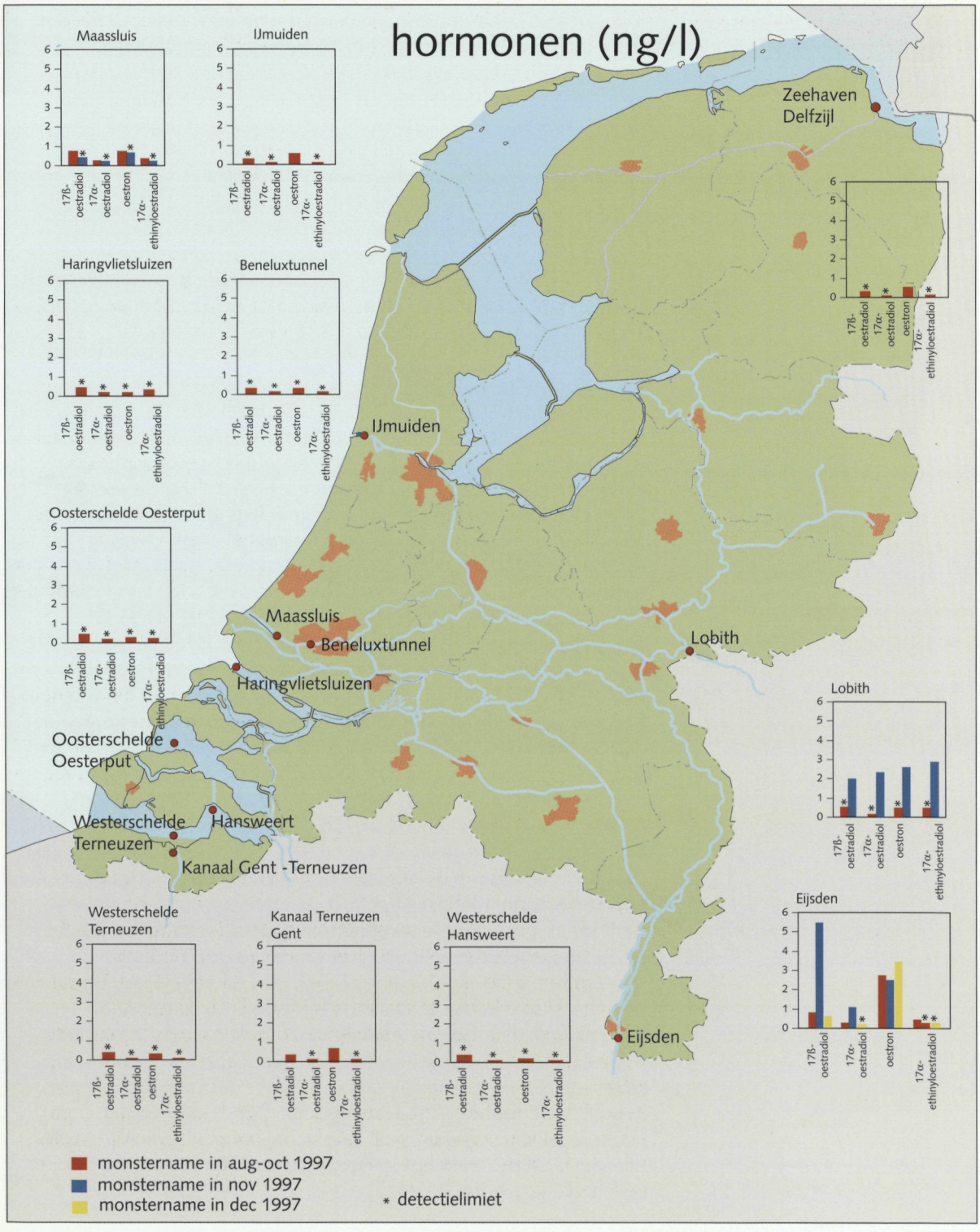
Voordat deze studie werd aangevangen, werd algemeen verondersteld dat hormonen grotendeels als inactieve hormoon-glucuroniden in het milieu aanwezig zouden zijn, omdat zij voornamelijk in deze vorm door mens en dier worden uitgescheiden. Deze hypothese is getoetst door het extract voor analyse te behandelen met het enzym ß-glucuronidase. Deze procedure is alleen uitgevoerd voor de eerste serie watermonsters (september 1997). De resultaten tonen aan dat hormonenglucuroniden niet of in gehalten onder de detectielimiet aanwezig waren.

Ook werd verwacht dat de hormonen op basis van hun fysisch/chemische eigenschappen zich voornamelijk bevinden in de waterige fase en niet geadsorbeerd aan zwevend stof. Dit wordt bevestigd door het monster Eijsden (december), waarbij weinig verschil kon worden aangetoond tussen het gefiltreerde (1,2 en 0,45 µm) en ongefiltreerde monster.

Locaties
De aanwezigheid van de hormonen per bemonsteringslocatie zijn gegeven in figuur 3.1.
De hoogste gehalten zijn aangetroffen bij Lobith en Eysden (tot 5,5 ng/l). De gemeten gehalten 17ß-oestradiol liggen hier boven de effectconcentratie van 0,3 ng/l 17α-ethinyloestradiol. Deze verbinding met vrijwel dezelfde potentie als 17ß-oestradiol resulteerde bij aanhoudende blootstelling gedurende 28 weken in een significante vitellogenine aanmaak bij mannelijke regenboogforellen (Sheanan, 1994).
In oppervlaktewatermonsters afkomstig uit grote open wateren en estuariene gebieden waar veel verdunning optreedt (Delfzijl, Westerschelde, Oosterschelde en Haringvlietsluizen) lijken hormonen niet of nauwelijks aanwezig.

Vergelijking Nederlandse situatie met omringende landen.
Ook in de ons omringende landen worden lage gehalten van hormonen in oppervlaktewater aangetroffen. In Groot-Brittannië werd in september 1982 met behulp van immuno-assays de aanwezigheid van 17α-ethinyloestradiol in rivieren aangetoond in concentraties kleiner dan 5 ng/l en 2-15 ng/l in augustus 1987 (Aherne, 1989). In Duitsland in het Ruhr-gebied werd eveneens 17α-ethinyloestradiol aangetoond

Figuur 3.1
Aanwezigheid van hormonen (in ng/l) in oppervlaktewater in Nederland.



in oppervlaktewater in concentraties tussen <1 tot 4 ng/l, terwijl 17ß-oestradiol en oestron beneden de detectielimiet van 1 ng/l bleven (Stumpf, 1996).

3.1.3 Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib

Algemeen
Zoals verwacht zijn de gehalten van hormonen in ruw rioolwater en influenten van rwzi's doorgaans hoger dan in het biologisch gezuiverde afvalwater. In afvalwater met een groot aandeel huishoudelijk afvalwater werden hogere concentraties hormonen aangetroffen dan in industrieel afvalwater. Dit is geheel in overstemming met de theorie dat mens en dier de grootste emissiebron van hormonen zijn.
Gehalten van hormonen in rioolslib (de gehele matrix, dus zowel waterige fractie als vaste fractie) liggen vrijwel allen onder de (hoge) detectielimiet.

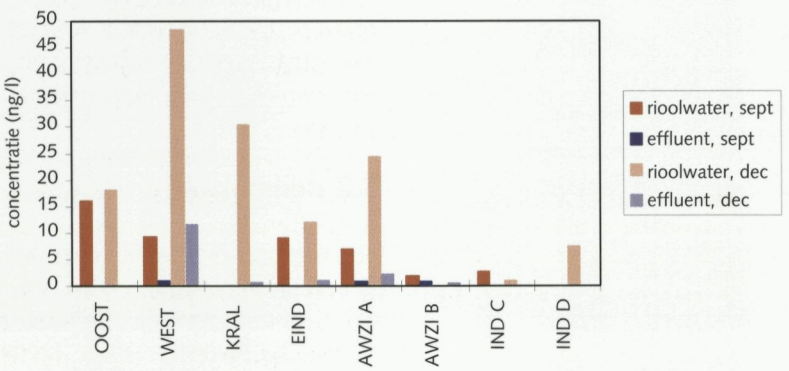
Het toevoegen van ß-glucuronidase resulteerde evenals bij het oppervlaktewater in vergelijkbare hormoonconcentraties. Dit betekent dat hormonenglucuroniden in ruw rioolwater, influent en effluent van rwzi's ofwel afwezig waren ofwel in veel lagere concentraties dan de actieve hormonen voorkwamen. Mogelijk worden deze metabolieten al ver vòòrdat het rioolwater op de rwzi wordt aangevoerd biologisch afgebroken of teruggevormd naar de actieve hormonen.

Van drie monsters rioolwater uit de decemberserie zijn hormonen tevens gemeten in het residu (>0,45 µm) na filtratie. De gehalten van hormonen in deze matrix bleven onder de detectielimiet, die bij de vaste matrix aanmerkelijk hoger ligt dan in gefiltreerde monsters. Desondanks kon vastgesteld worden dat bijna alle geselecteerde hormonen zich bevinden in de waterige fractie en slechts voor enkele procenten zich ophopen in de vaste matrix.

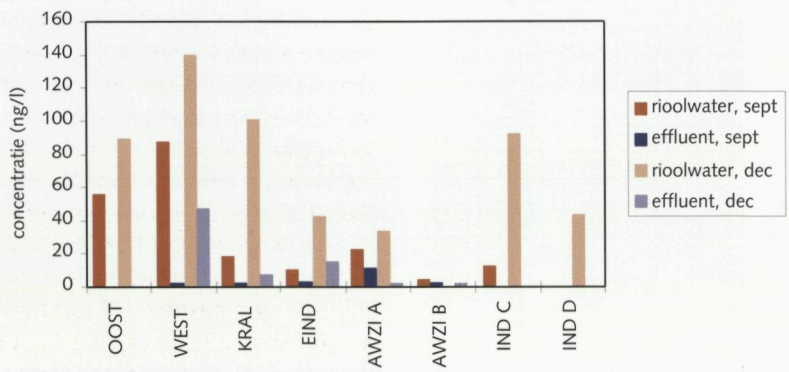
Locaties
In figuur 3.2 is het voorkomen van 17ß-oestradiol in de 5 rwzi's grafisch weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat gehalten in ruw rioolwater sterk kunnen verschillen. Gehalten in het aangevoerde rioolwater van WEST verschilt een factor vijf tussen de monsterseries van september en december. Gezien het feit dat steeds verzamelmonsters over een periode van 8 uur zijn genomen, kan het geconstateerde verschil tussen september en december niet worden toegeschreven aan de dagelijkse fluctuatie van samenstelling in afvalwater als gevolg van variatie in menselijke activiteiten. Opmerkelijk is wel dat in alle gevallen de gehalten 17ß-oestradiol in de decemberserie structureel hoger zijn dan in de septemberserie. Een betere biologische afbraak door een hogere afvalwatertemperatuur in september zou een reden kunnen zijn, ware het niet dat de watertemperatuur bij rwzi WEST in beide meetseries vergelijkbaar was. De concentraties aan hormonen 17ß-oestradiol, 17α-oestradiol, oestron en 17α-ethinyloestradiol vertonen tussen de diverse locaties een vergelijkbaar patroon.
Over het algemeen wordt in afvalwater van huishoudelijke oorsprong hogere concentraties hormonen aangetroffen dan in industrieel afvalwater. Dit is overeenkomstig de verwachting. Het humane uitscheidingspatroon oestron:17ß-oestradiol: 17α-ethinyloestradiol (=2:1:0.1) wordt regelmatig weerspiegeld door de data, vooral in ruw stedelijk rioolwater. Toch zijn er ook een groot aantal onvoorziene of zelfs tegenstrijdige meetresultaten. Zo waren bij ruw rioolwater van de

locaties OOST en WEST ongeveer gelijke gehalten hormonen te verwachten, omdat beide locaties worden gevoed met bijna uitsluitend huishoudelijk afvalwater en geen verdunning met regenwater kan optreden. Blijkbaar kunnen andere factoren een rol van betekenis spelen en de hormoongehalten beïnvloeden. Onduidelijk is welke, maar gedacht kan worden aan het percentage zwangere vrouwen, ziekenhuizen, etc. Bekend is dat zwangere vrouwen aanzienlijk meer (factor 1000 of meer) hormonen per dag kunnen uitscheiden dan gewoonlijk. Opmerkelijk hierbij is dat ook 17α-ethinyloestradiol sterk fluctueert tussen de locaties OOST en WEST. Mogelijk zijn bovengenoemde aannames niet juist, doch een sluitende verklaring voor het geconstateerde patroon ontbreekt vooralsnog.
Ook de verwijdering van de gemeten hormonen in de rwzi's is niet eenduidig en fluctueert sterk tussen de rwzi's onderling, maar ook voor één en dezelfde rwzi. De dataset aan meetgegevens is te summier om met percentages de verwijderingsefficiency van hormonen in de rwzi's aan te geven. Bovendien is het belangrijk in het oog te houden dat steeds sprake is van extreem lage concentraties die moeilijk te meten zijn. Op grond van deze dataset kan daarom alleen geconcludeerd worden dat de hormonen 17α-/17ß-oestradiol, oestron en 17α-ethinyloestradiol niet volledig in een rwzi worden afgebroken.

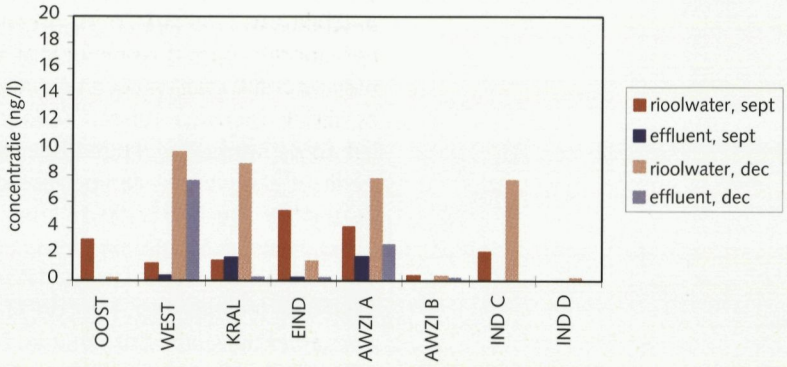
Vergelijking Nederlandse situatie met omringende landen.
De gehalten aan de geselecteerde hormonen in de ons omringende landen zijn zowel in het ruwe rioolwater als in effluenten van rwzi's hoger dan in Nederland. Vergelijking van de meetresultaten is echter moeilijk, zolang de gehanteerde analysemethoden nog van elkaar kunnen verschillen en er geen achtergrondinfomatie over de bemonsteringslocatie en omstandigheden beschikbaar zijn.



Figuur 3.2
Gehalten aan 17ß-oestradiol in 5 rwzi's en 3 rioolpunten. OOST is ruw rioolwater, WEST, KRAL en EIND zijn stedelijke rwzi's, AWZI A en B zijn industriële awzi's en IND C en D zijn locaties voor rioolwater van twee industrieterreinen.



Figuur 3.3
Gehalten aan oestron in 5 rwzi's en in 3 rioolputten.



Figuur 3.4
Gehalten aan 17α-ethinyloestradiol in 5 rwzi's en in 3 rioolputten.

In een Duitse studie werd 17α-ethinyloestradiol in alle 20 gemeten effluenten van rwzi's in concentraties groter dan 1 ng/l aangetroffen en in 15 effluenten zelfs groter dan 10 ng/l. De mediane concentratie was 17 ng/l en het maximum 62 ng/l. 17ß-Oestradiol werd gedetecteerd in 8 van de 20 effluenten (2 effluenten > 10 ng/l) met een maximum concentratie van 21 ng/l (Stumpf,1996). Kalbfus (1995) daarentegen rapporteert 17α-ethinyloestradiol gehalten in de orde van 0,3-0,5 ng/l in effluenten van een niet nader aangegeven aantal rwzi's. In Groot-Brittannië varieerden de concentraties hormonen in effluenten van rwzi's van 1-50 ng/l oestron, 2-50 ng/l 17ß-oestradiol en tot 7 ng/l 17α-ethinyloestradiol (Desbrow, 1997; Aherne, 1989). Ook deze gehalten zijn aanzienlijk hoger dan in de Nederlandse situatie.
Een nadere beschouwing van de studie van Desbrow wordt mogelijk, doordat beperkte achtergrondinformatie over het type rwzi's is opgenomen. Hierbij is met name de rwzi Rye Meads in Hertfordshire interessant die de meeste overeenkomst heeft met de bemonsterde Nederlandse rwzi's. Gehalten in effluent van deze rwzi waren 1,8-3,6 ng/l oestron, 2,7-6,3 ng/l 17ß-oestradiol en onder de detectielimiet voor 17α-ethinyloestradiol. Deze gehalten liggen in dezelfde orde als die gemeten in Nederland in dit oriënterend onderzoek.

3.2 Bisfenol-A

3.2.1 Mogelijkheden en beperkingen van analysemethode

Detectie van bisfenol-A is uitgevoerd met GC-MS/MS. Dit impliceert dat de gepresenteerde resultaten zijn gebaseerd op geïdentificeerde stoffen. De recovery van de gebruikte analysemethode is 80%.
De methode is geschikt voor de analyse van bisfenol-A in oppervlaktewater boven concentraties van circa 3 ng/l. De onderste detectielimiet wordt echter in sterke mate bepaald door de vervuilingsgraad van het monster en kan in oppervlaktewatermonsters met veel storende componenten oplopen tot 20 ng/l. De gebruikte analysemethode is eveneens geschikt voor het analyseren van bisfenol-A in al dan niet biologische gezuiverd afvalwater. Hoewel met name de ongezuiverde afvalwatermonsters zeer veel storende componenten kunnen bevatten, liggen de gehalten van bisfenol-A in deze watermonsters doorgaans voldoende hoog om een betrouwbaar meetresultaat te verkrijgen.
De analyse van bisfenol-A gebeurt in hetzelfde watermonster als voor hormonen. Dit betekent dat 1 liter water of enkele grammen slib, sediment of zwevend stof (op droogbasis) voor beide componenten voldoende is.
Over de stabiliteit van bisfenol-A in oppervlaktewater en afvalwater waren bij aanvang van deze oriënterende studie geen gegevens

beschikbaar. Er is daarom naar gestreefd alle monsters binnen 1 dag op het laboratorium te verwerken. In een aantal gevallen, zoals alle afvalwatermonsters van de eerste meetserie in september is dit niet gelukt en zijn de monsters tot ca. 10 dagen opgeslagen in de koeling.
Uit aanvullend stabiliteitsonderzoek is gebleken dat opslag gedurende 10 dagen bij 4 °C geen duidelijke afname van de concentraties bisfenol-A is te constateren.

De gebruikte extractie- en analysemethode voor vaste matrices bleek geschikt voor de analyse van bisfenol-A in riool-/zuiveringsslib en voor zwevend stof/sediment, maar de aantoonbaarheidsgrenzen waren verschillend.
De omrekening van het droge stof(ds)-gehalte naar het gehalte in de riool-/zuiveringsslib suspensie is gedaan met de % droge stof die door Tauw Milieu b.v. in de dezelfde slibmonsters zijn bepaald.
Mogelijkerwijs kan het droge stofgehalte in dit slibmonster iets verschillen ten opzichte van het % droge stof in de suspensie, die gebruikt is voor de analyse van bisfenol-A.

3.2.2 Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen

Algemeen

Een overzicht van de aanwezigheid van bisfenol-A in de diverse matrices van oppervlaktewater en afvalwater is gegeven in tabel 3.2; de afzonderlijke meetgegevens per matrix en per locatie staan vermeld in bijlage 2 en 3 voor respectievelijk oppervlaktewater en afvalwater.

Tabel 3.2
Gemeten concentratie ranges (in ng/l) van bisfenol-A in diverse matrices.

	bisfenol-A
milieumatrices	
oppervlaktewater	<d.l. - 160
sediment[1]	<d.l.
zwevend stof[2]	<d.l.
stedelijk afvalwater	
influent/rioolwater	240 - 1.000
riool-/zuiveringsslib[3]	<d.l. - 270
effluent	33 - 370
industrieel afvalwater	
influent/rioolwater	420 - 2.000
riool-/zuiveringsslib[3]	<d.l. -120
effluent	22 - 100

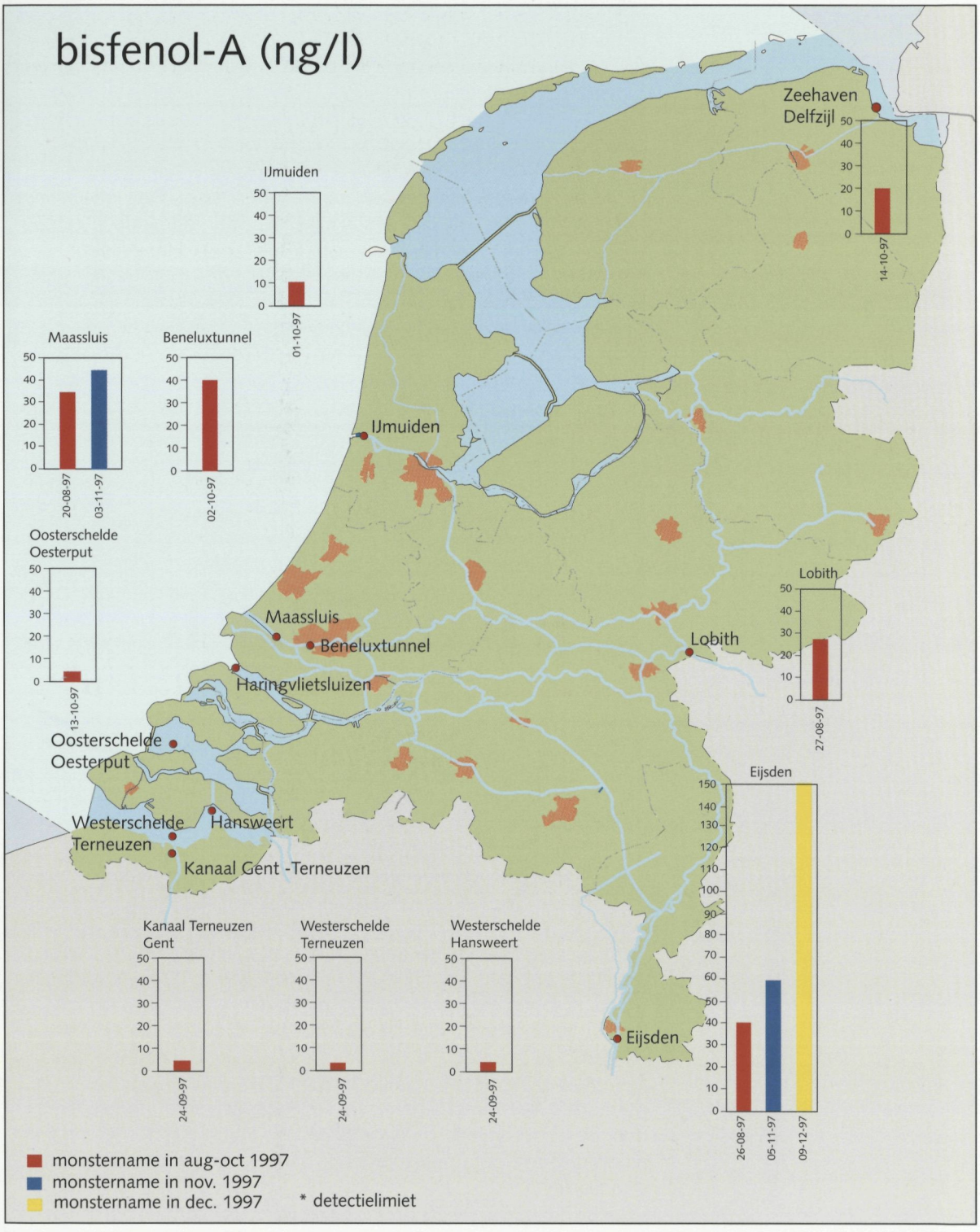
[1] uitgedrukt in µg/kg droge stof, echter bisfenol-A is geanalyseerd in de sediment suspensie; n=3, locatie Kanaal Gent Terneuzen, Noordzeekanaal bij IJmuiden en Nieuwe Waterweg bij Beneluxtunnel.
[2] uitgedrukt in µg/kg droge stof; echter bisfenol-A is geanalyseerd in het natte zwevende stof; incl. aanhangend water n=3, locatie Terneuzen, Noordzeekanaal bij IJmuiden en Nieuwe Waterweg bij Beneluxtunnel.
[3] in µg/kg droge stof; gehalte bepaald in representatieve suspensie riool-/zuiveringsslib.

Bisfenol-A is op alle bemonsterde locaties in het oppervlaktewater aangetroffen. Het algehele beeld voor bisfenol-A is dat concentraties in oppervlaktewater met name in rivieren en bij riviermondingen hoger liggen dan op de overige locaties (gemiddeld rond 40 ng/l tegenover elders 4 ng/l). In de bemonsterde sedimenten en zwevend stof daarentegen bleef de concentratie bisfenol-A steeds onder de detectielimiet van 0,05-0,25 µg/kg droge stof.

Locaties
In figuur 3.5 zijn de concentraties van bisfenol-A op de diverse bemonsteringslocaties in Nederland weergegeven. In rivieren en riviermondingen liggen deze concentraties (± 40 ng/l) een factor 10 hoger dan op de overige locaties (± 4 ng/l). Uitzondering hierop zijn de meetgegevens van Lobith op 11 november.
De data van Eysden laten zien dat op verschillende dagen sprake kan zijn van een forse fluctuatie (factor 4) in bisfenol-A gehalten.
Bisfenol-A tenslotte blijft in alle geanalyseerde monsters zwevend stof en sediment ruim onder de detectielimiet. Dit is overeenkomstig de verwachting, aangezien bisfenol-A een hydrofiele verbinding is. Op basis van de gemeten concentratie in water (40 ng/l), een veronderstelde sorptieconstante van 1000 (genormaliseerd voor OC; Staples, 1998) en een OC gehalte van 2% kan het gehalte in sediment berekend worden op 0,8 µg/kg. Dit is aanzienlijk lager dan de detectielimiet van 15-124 µg/kg droge stof voor riool-/zuiveringsslib.

Vergelijking Nederlandse situatie met omringende landen.
Er zijn bijzonder weinig meetgegevens in de openbare literatuur gerapporteerd over het voorkomen van bisfenol-A. In 1996 werd in Spanje in mariene oppervlaktewater en in bronwater geen bisfenol-A aangetroffen (De Olmo, 1997). In Japan werd in de periode 1974-1978 in oppervlaktewater afkomstig van rivieren 60 tot 1900 ng/l aangetroffen (Howard, 1989). Deze getallen zijn hoger dan gemeten in Nederland, doch het betreft hier de zeventiger jaren, waardoor een vergelijking met de situatie in Nederland anno 1997/1998 niet goed mogelijk is.

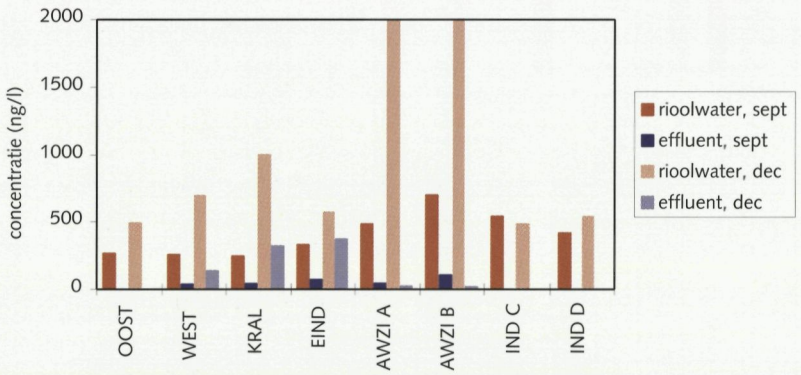
Figuur 3.5
Aanwezigheid van bisfenol-A (in ng/l) in oppervlaktewater in Nederland.



3.2.3 Aanwezigheid in afvalwater en riool-zuiveringsslib

Algemeen, locaties

In figuur 3.6 is het voorkomen van bisfenol-A in 5 rwzi/awzi's en op 3 locaties in rioolstelsels van een woonwijk (OOST) en industrieterreinen (IND C/D) grafisch weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat de gehalten bisfenol-A in industrieel en stedelijk afvalwater in dezelfde orde van grootte (300-700 ng/l) liggen. Bij het influent van de industriële AWZI-A en B zijn bisfenol-A concentraties van > 2000 ng/l aangetroffen, terwijl deze in de andere meetserie vergelijkbaar waren met de hierboven genoemde doorgaans aangetroffen range. De verwijderings-efficiency in de rwzi/awzi's was aanzienlijk, wat resulteerde in gehalten van bisfenol-A in het effluent van 20-400 ng/l. Het gehalte bisfenol-A in het residu van afvalwater is voor drie monsters bepaald en bedroeg minder dan 5% .
Gehalten van bisfenol-A in riool-/zuiveringsslib zijn over het algemeen hoog en variëren van <116-7000 ng/l (<15 tot 270 ng/g droge stof).



Figuur 3.6
Gehalten aan bisfenol-A in 5 rwzi's en in 3 rioolputten.

3.3 Ftalaten

3.3.1 Mogelijkheden en beperkingen van de analysemethode

IVM

Bij de hier gepresenteerde data van ftalaten zijn door het IVM twee methodes gebruikt: modificatie A en modificatie B. Bij beide methodes is vooraf gefiltreerd over 1,2 µm. De getallen van modificatie A zijn minder betrouwbaar, doordat deze met de minder specifieke methode GC-ECD zijn gemeten. Hierbij is dus geen sprake van een specifieke identificatie, die wel bij modificatie B met GC-MS/MS gebeurt. Methode B heeft dus verreweg de voorkeur. Dit wordt onderstreept door de recovery getallen, die variëren van 58 tot 118 %. Voor deze recovery wordt gecorrigeerd door de toegevoegde gelabelde interne standaarden.
Voor de analyse is steeds circa 0,5 liter water (oppervlaktewater en afvalwater) of enkele grammen (op droogbasis) zwevend stof, sediment, slib of biota in gebruik genomen.

RIVM

Bij de keuze voor de bepaling van ftalaten in water is door het RIVM een SPE extractie methode gebruikt. Bij deze methode is ervoor gekozen om de deeltjes uit de watermonsters niet te verwijderen middels filtratie of centrifugeren, omdat elke extra stap in de voorbereiding

van watermonsters een mogelijke contaminatie van ftalaten uit de omgeving kan opleveren. Bij het RIVM zijn de deeltjes voor het merendeel verwijderd door de monsters na 24 uur staan bij 4 °C en vervolgens te decanteren. Het nadeel hiervan is dat niet alle deeltjes verwijderd worden, met name de lichtere/kleinere deeltjes blijven zweven in de waterige fractie. Deze fractie wordt vervolgens meegenomen in de opwerking en kan een overschatting t.o.v. de IVM-methode van met name het ftalaatgehalte van de zwaardere componenten in de waterige fractie opleveren.
De recovery van de methode varieert tussen 60 en 99 %, waarbij hiervoor direct gecorrigeerd wordt door de toegevoegde gelabelde interne standaarden, met een herhaalbaarheid van 5 tot 10 %.
Het niveau van de procedure blanco ligt tussen de 0,02 en 0,2 µg/l, maar kan per serie monsters enige variatie opleveren.

De verschillende procedures van opwerking bij het IVM en RIVM impliceert dat de data series die door beide instituten zijn gemeten niet vergelijkbaar zijn. Immers, bij het IVM zijn deeltjes groter dan 1,2 µm apart geanalyseerd en opgeteld bij de hoeveelheid ftalaten in de waterige fractie, terwijl bij het RIVM alleen de waterige fractie is gemeten waarbij niet exact bekend is tot welke grootte deeltjes zijn meegenomen. Voor de kleine meer hydrofiele ftalaten maakt de verschillende opwerkingsprocedure weinig uit, doordat deze stoffen vooral in de waterige fase zitten. Voor de grotere hydrofobe ftalaten, zoals DEHP, is de verschillende procedure wel van wezenlijk belang, doordat deze stoffen voornamelijk aan de vaste fractie zijn geadsorbeerd.
Gehalten van ftalaten in oppervlaktewater (n=2) liggen dicht bij de detectielimiet die kan worden bereikt met modificatie B. Ook in effluent zijn regelmatig gehalten aangetroffen nabij de detectielimiet.
Dit geldt daarentegen veel minder voor gehalten in influent, riool-/zuiveringsslib, sediment, zwevend stof en biota. Concentraties van ftalaten (met name DBP, BBP en DEHP) in deze voornamelijk vaste matrices zijn over het algemeen voldoende hoog om ftalaten nauwkeurig te kunnen bepalen.
Van ftalaten is bekend dat opslag van oppervlaktewatermonsters bij 4 °C resulteert in gedeeltelijke afbraak na 4 dagen. In deze studie zijn alle monsters voor analyse enkele maanden opgeslagen geweest in de vriezer. Uit voorlopige conclusies uit aanvullend onderzoek is gebleken dat het concentratieniveau van ftalaten in watermonsters tijdens diepgevroren opslag in een vergelijkbare tijd niet noemenswaardig afnam.

De sedimentmonsters zijn verzameld in glazen potten met plastic binnendeksel. Doordat de monsters zeer waterig van structuur waren is tijdens het transport van de monsterlocatie naar het laboratorium contact geweest tussen het monster en de plastic deksel. Hierdoor zijn mogelijk ftalaten geïntroduceerd in de monsters. Hoewel de data niet direct duiden op een grote mate van achtergrondcontaminatie, verdient het aanbeveling dit type contaminatie in de toekomst te vermijden.
De vaste matrix (residu) van influent en effluent zijn geëxtraheerd met dichloormethaan door middel van koude extractie. Deze methode is verder niet gevalideerd maar de verwachting is dat DCM in een goede extractie resulteert (Van der Velde, mondelinge mededeling).
Indien de extractie niet optimaal was voor bijvoorbeeld sterk adsorberende ftalaten, dan zal dit resulteren in een onderschatting van de werkelijke concentratie.
De omrekening van het droge stof gehalte naar het gehalte in de riool-/zuiveringsslib suspensie is gedaan met de % droge stof die door

TAUW in dit slib zijn bepaald. Deze zijn mogelijk niet representatief voor het % droge stof in de suspensie die gebruikt is voor de analyse van ftalaten.

3.3.2 Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen

Algemeen

Ftalaten betreffen een groep van verbindingen met uiteenlopende eigenschappen. De kleinste ftalaat in deze serie, DMP, is hydrofiel (log K_{ow} van 1,6) en bindt nauwelijks aan organisch materiaal (K_{oc} van 80-360; Staples, 1997). De grootste ftalaat in deze serie, DOP, is zeer hydrofoob (log K_{ow} van 8.6) en lost nauwelijks op in water. DOP zal voornamelijk sorberen aan vaste matrix. Ook DEHP met een K_{oc} van 87.000 bindt voornamelijk aan sediment (Staples, 1997). De overige ftalaten zitten wat betreft hun eigenschappen tussen deze twee extremen in. Dit patroon van het gedrag van ftalaten wordt weerspiegeld door de data in tabel 3.3. De kleine ftalaten zijn vooral aanwezig in de waterige fractie; de grotere ftalaten vooral in de vaste matices.
Alle meetgegevens uit deze oriënterende studie van de verschillende ftalaten-methoden zijn per locatie voor het oppervlaktewater, zwevend stof en biota gegeven in bijlage 2 en voor afvalwater en riool-/ zuiveringsslib vermeld in bijlage 3.

Tabel 3.3
Gemeten concentratie ranges (in µg/l) van zes ftalaten in diverse matrices.

	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DOP
milieumatrices						
oppervlaktewater[1]	0,07 - 0,5	<d.l.- 2,6	<d.l.- 0,5	<d.l.	0,04 - 1,9	<d.l.
sediment[2]	<d.l.	<d.l.- 33	<d.l.- 114	<d.l.- 56	106 - 2.866	<d.l.
zwevend stof[3]	<d.l.- 58	22 - 40	98 - 1.500	<d.l.- 705	590 - 2.7000	<d.l.
biota[4]	<d.l.	58 - 660	190 - 4.380	<d.l.- 1.730	<d.l.- 8.040	<d.l.
stedelijk afvalw.						
influent/rioolw.[5]	1,1 - 4,6	7 - 30	1,8 - 5,6	0,3 - 2,0	8,7 - 27,2	<b.g.- 0,4
tot. infl./rioolw.[6]	0,04 - 3,9	0,08 - 25	0,19 - 15	<d.l.- 2,4	d.l.- 8,2	<d.l.
riool-/zuiv.-slib[7]	<d.l.- 430	d.l.- 1.500	690 - 1.100	<d.l.- 2.300	1600 - 98.000	<d.l.- 2.000
effluent[8]	0,2	0,4 - 1,8	0,8 - 2,1	<b.g.	1,0 - 2,9	<b.g.
totaal effluent[9]	<d.l.- 0,05	0,01 - 0,04	0,07 - 0,13	<d.l.- 0,07	0,46	<d.l.
industrieel afvalw.						
influent/rioolw.[5]	0,3 - 1,9	1,0 - 77	1,0 - 9,6	<b.g.- 0,5	<0,4 - 26,3	<b.g.- 0,4
tot. infl./rioolw.[6]	0,09 - 1	0,03 - 41	<d.l.- 9,5	0,05 - 0,75	d.l.-10	<d.l.
riool-/zuiv.-slib[7]	<d.l.- 580	<d.l.- 2.800	720 - 3.200	<d.l.- 990	8.000-258.000	<d.l.-17.000
effluent[8]	0,1- 0,3	1,2 - 1,4	0,6 - 0,8	<b.g.	0,7 - 4,1	<b.g.
totaal effluent[9]	<d.l.- 0,05	<d.l.- 0,01	0,2 - 0,4	<d.l.	0,08 - 0,44	<d.l.

[1] locatie Oosterschelde en locatie Delfzijl gemeten door IVM in gefiltreerde monsters, Lobith, Eysden, Maassluis en Haringvlietsluizen gemeten door RIVM in gedecanteerde monsters.
[2] uitgedrukt in µg/kg droge stof echter ftalaten zijn geanalyseerd in de sediment suspensie; n=3, locatie Kanaal Gent Terneuzen, IJmuiden en Beneluxtunnel.
[3] uitgedrukt in µg/kg droge stof; echter ftalaten zijn geanalyseerd in het natte zwevende stof; incl. aanhangend water; n=3, locatie Westerschelde-Terneuzen, IJmuiden en Beneluxtunnel.
[4] in µg/kg droge stof; n=4, locatie Westerschelde-Terneuzen, Beneluxtunnel en Oosterschelde.
[5] influent gedecanteerd dus met een onbekend deel van de vaste fractie, alleen decemberserie. B.g. is bepalingsgrens
[6] totaal influent/rioolwater, dus in waterige fractie + vaste fractie.
[7] uitgedrukt in µg/kg droge stof echter ftalaten zijn geanalyseerd in representatieve suspensie rioolslib.
[8] effluent gedecanteerd dus met een onbekend deel van de vaste fractie, alleen decemberserie. B.g. is bepalingsgrens.
[9] totaal effluent, dus in waterige fractie + vaste fractie. Gehalten gemeten in effluent in september-serie (met onbetrouwbare GC-ECD detectietechniek en alleen in waterige fractie) zijn hierin niet meegenomen.

Locaties

Oppervlaktewater

In deze oriënterende studie zijn op totaal 6 locaties met de twee methoden van IVM en RIVM analyses verricht op ftalaten in oppervlaktewater. Hieruit bleek dat op alle locaties de concentraties laag zijn. De hoogste gehalten in oppervlaktewater worden gevonden voor DBP en DEHP. Daarbij lijken de gehalten in het mariene milieu van estuaria (Oosterschelde en Delfzijl) lager dan in de 4 zoetwaterlocaties Lobith, Eysden, Maassluis en Haringvliet. In figuur 3.7 zijn de concentraties van ftalaten in oppervlaktewater grafisch weergegeven.
Gehalten van ftalaten in de twee gefiltreerde oppervlaktewatermonsters genomen in de Oosterschelde en bij Delfzijl liggen over het algemeen onder de detectielimiet; alleen de hydrofiele DMP en de algemeen voorkomende DEHP zijn aangetroffen. In de gedecanteerde monsters afkomstig van de locaties Lobith, Eijsden, Haringvlietsluizen en Maassluis werden tevens DEP, DBP en DMPP aangetroffen. BBP en DOP werd met geen van beide technieken in de 6 bemonsterde oppervlaktewateren gesignaleerd.

Sediment en zwevend stof

Het voorkomen van ftalaten in sediment en zwevend stof is nogal variabel. Over het algemeen zijn de gehalten van ftalaten laag, en alleen DEHP wordt op alle vier bemonsterde locaties (Beneluxtunnel, IJmui-den, kanaal Gent-Terneuzen, Westerschelde-Terneuzen) aangetroffen in concentraties tot bijna 3 mg/kg in sediment en 26 mg/kg zwevend stof.

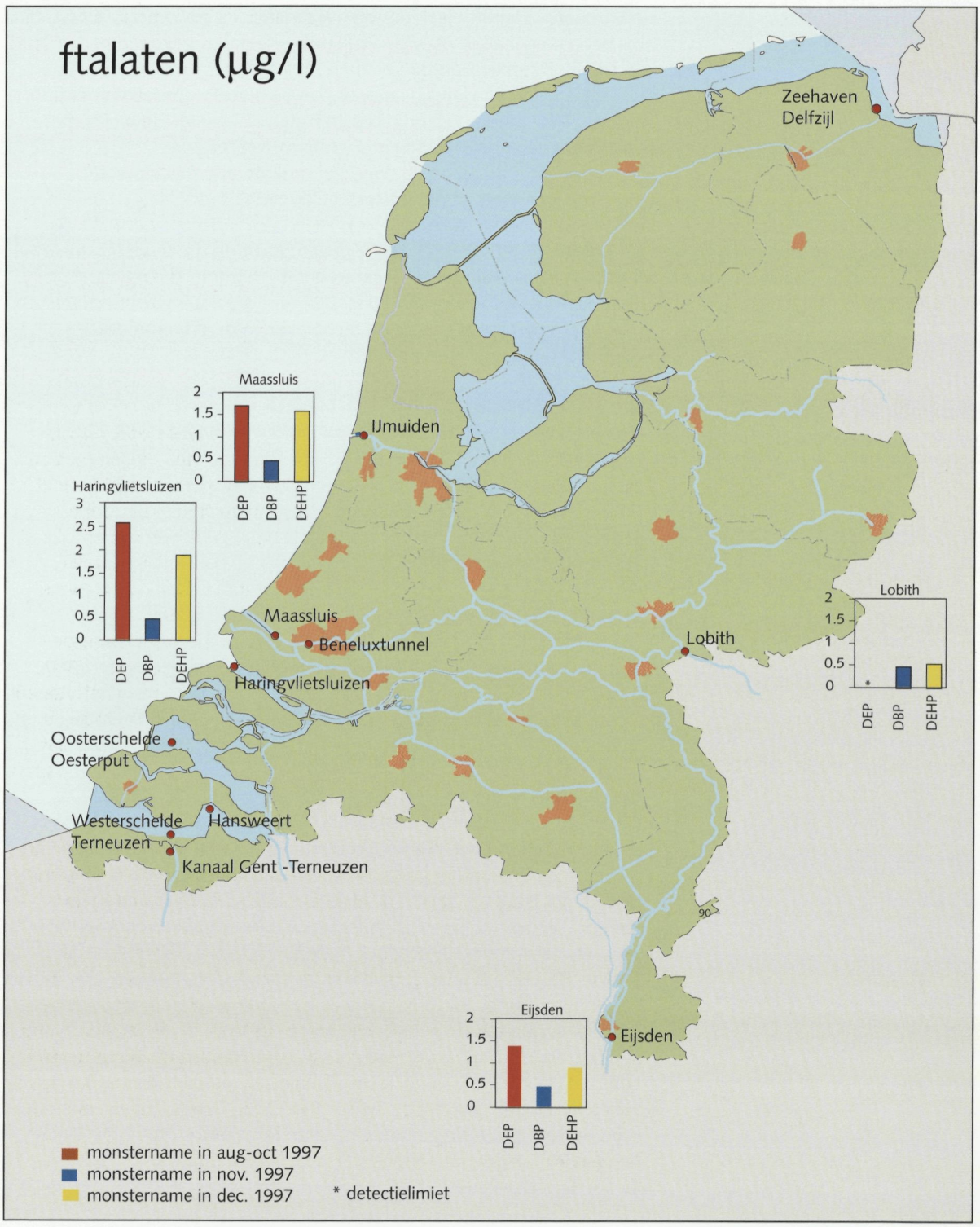
Biota

Ftalaten werden in mosselen, afkomstig van locatie Westerschelde-Terneuzen, nauwelijks aangetroffen. In botlever daarentegen zijn de ftalaatgehalten op de bemonsterde locaties IJmuiden, Beneluxtunnel en Oosterschelde, relatief hoog, vooral die van de lipofiele DBP, DEHP en DOP.

Vergelijking Nederlandse situatie met omringende landen.

Behalve de in deze oriënterende studie gemeten gehalten zijn tevens gegevens bekend van het voorkomen van ftalaten in oppervlaktewater van het IJsselmeer, Rijn, Maas (Eysden) en Westerschelde in 1986 in Nederland. Uit deze gegevens blijkt dat ook in 1986 in oppervlaktewater in Nederland DEHP in de hoogste concentraties voorkomt tot 50 µg/l, gevolgd door DBP (tot 1,2 µg/l).
Ook in 1986 zijn ftalaat-gehalten in zwevend stof gemeten. Een grove vergelijking van de twee data sets is gemaakt in tabel 3.4. Uit deze gegevens blijkt dat de gehalten gemeten in 1997 bij de Beneluxtunnel in dezelfde orde van grootte liggen als in 1986 stroomopwaarts bij Lobith. De gehalten in de Westerschelde zijn minder goed vergelijkbaar, doordat in 1986 bij de Schaar van Oude Doel (Schelde-monding) is bemonsterd. Dat de gehalten op deze locatie in 1986 hoger waren dan in 1997 midden op de Westerschelde-Terneuzen bij boei 20 valt in de lijn der verwachting.

Figuur 3.7
Aanwezigheid van ftalaten DEP, DBP en DEHP (in µg/l) in oppervlaktewater in Nederland.



Tabel 3.4
Aanwezigheid van ftalaten in Nederland in 1986 (Ritsema 1987,1989) en 1997 (deze studie) in zwevend stof.

	Rijn, Lobith	Rijn, Beneluxtunnel	Westerschelde, Schelde-monding	Westerschelde-Terneuzen, Boei 20
	1986 ng/g	**1997** ng/g	**1986** ng/g	**1997** ng/g
DMP	<100	<26	<100	22
DEP	100 - 150	40	400	22
DBP	300 - 900	280	<100	98
BBP	100 - 900	705	100	<49
DEHP	20.000 - 100.000	11.000	15.000	586
DOP	100 - 900	224	<100	<112

De ftalaat-gehalten die in 1997 en 1986 in Nederlands oppervlaktewater, sediment en/of zwevend stof zijn aangetroffen, liggen in dezelfde orde als de gehalten in de ons omringende landen. In 1991/1992 werden door Furtmann (1994) ftalaten aangetroffen in het oppervlaktewater van de Rijn in Duitsland tot 3,4 µg/l. Alleen het gehalte van DEHP lag aanmerkelijk hoger tot 10 µg/l. In Groot-Brittannië werden in 1984 concentratieranges van ftalaten in oppervlaktewater gemeten, die varieerden van 0,4 µg/l tot 34 µg/l (Fatoki, 1990). Opmerkelijk bij deze studie is dat de hoogste gehalten gevonden worden voor DBP in plaats van DEHP. Een Zweedse studie uit 1997 (Parkman, 1997) toonde ftalaten aan in oppervlaktewater nabij steden (concentraties tot 0,38 µg/l) maar ook in oppervlaktewater in zogenaamde niet verontreinigde meertjes (tot 0,021 µg/l). Ook hier bleek DEHP niet in hogere gehalten aanwezig te zijn dan de andere gemeten ftalaten DMP, DEP, BBP en DBP.
De in deze studie gemeten gehalten van ftalaten in sediment liggen eveneens in dezelfde orde als in andere landen. De Zweedse studie van Parkman en Remberger (1997) rapporteert ranges van 1 tot 68 µg/kg DBP, 2-1500 µg/kg DEHP en tot 97 µg/kg DOP in sediment nabij steden.
In biota is alleen het gehalte DEHP gerapporteerd. Deze varieerde, afhankelijk van het type vis van kleiner dan de detectielimiet (roodbaars en schol) tot ca 5 mg/kg nat gewicht (haring, makreel, kabeljauw) (Musial, 1981). In tegenstelling tot deze studie waar werd gemeten in visfilets, werd in de onderhavige Nederlandse studie gemeten in botlever waarin, naar wordt aangenomen, contaminanten zich concentreren. Het DEHP gehalte dat in botlever werd aangetroffen varieerde van 2 tot 8 mg/kg droge stof, wat overeenkomt met 0,8 tot 2,7 mg/kg nat gewicht.

3.3.3 Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib

Algemeen
Ftalaten zijn in vrijwel alle monsters influent/effluent van de rwzi/-awzi's en riool-/zuiveringsslib aangetroffen. Daarbij werd weinig verschil gezien tussen de concentraties in stedelijk en in industrieel afvalwater. De twee meest voorkomende ftalaten in al dan niet gezuiverd

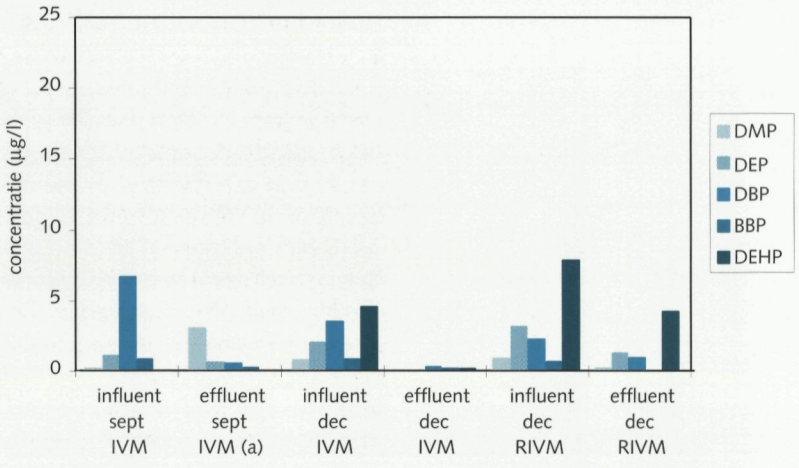
afvalwater zijn DEP en DEHP, gevolgd door DMP en DBP. De verwijderingsefficiency tijdens zuivering is aanzienlijk en afhankelijk van de specifieke ftalaat het gevolg van biologische afbraak of adsorptie aan het slib. Gehalten van ftalaten in riool/zuiveringsslib, uitgedrukt op droge stof basis, zijn over het algemeen hoog.

In dezelfde afvalwatermonsters van de decemberserie zijn op twee verschillende manieren, zoals een andere wijze van voorbewerking, ftalaten bepaald door RIVM en IVM. De gehalten 'totaal afvalwater' zijn tot stand gekomen na filtratie over 1,2 µm en na optelling van de gehalten aan ftalaten in de 'opgeloste waterige fractie' en in het 'vaste residu' (IVM). De gehaltes in de vaste matrix zijn mogelijk onderschat doordat de gebruikte extractiemethode voor de filters vooral voor de sterk sorberende verbindingen waarschijnlijk niet optimaal is geweest. De voorbewerking van de RIVM-methode bestond uit decanteren van het afvalwatermonster gedurende 24 uur en vervolgens door de waterige fracties in bewerking te nemen. De resultaten lijken uit te wijzen dat desondanks de gehalten in gedecanteerd afvalwater hoger liggen dan in 'totaal afvalwater'.
De afzonderlijke gehalten die in de twee matrices opgelost fractie en vaste matrix zijn bepaald zijn opgenomen in de bijlage 3. Samengevat kan hieruit worden gesteld dat DMP en DEP voornamelijk zijn opgelost; DMP is niet in de vaste matrix aangetroffen en DEP slechts zelden. Voor DEP geldt dat de opgeloste fractie 0,98 ± 0,02 is (n=15). Voor DBP is de opgeloste fractie 0,53 ± 0,10 (n=10) en voor BBP 0,44 ± 0,21 (n=10). Voor DEHP en DOP kon de opgeloste fractie niet worden bepaald.

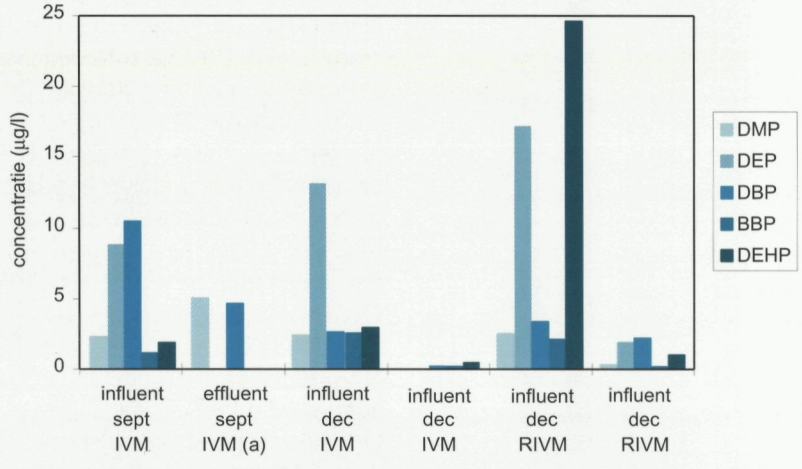
Locaties
In figuur 3.8 en 3.9 is het voorkomen van 5 ftalaten (DOP is meestal onder de detectielimiet en is niet meegenomen) in de industriële AWZI A en stedelijke rwzi Amsterdam Westpoort (huishoudelijk). Overeenkomstig het algemene beeld blijken ook op deze locaties DEP, DBP en DEHP en DBP veel in het afvalwater voor te komen. Er is weinig verschil zichtbaar tussen stedelijk en industrieel afvalwater.
De waargenomen verschillen in de analyseresultaten van IVM en RIVM zijn in de vorige paragraaf reeds besproken en houden verband met de verschillende voorbewerkingen van de monsters.

De concentraties van ftalaten in de september- en decemberserie kunnen per locatie sterk verschillen, maar zijn soms ook goed op één en dezelfde locatie goed te vergelijken. Een voorbeeld van locaties, waarbij de concentraties in september en december goed zijn te vergelijken, zijn de locaties rwzi WEST en AWZI A (zie figuur 3.8 en 3.9). Voorbeelden van locaties, waarbij grote fluctuaties in ftalaten-gehalten in de tijd optraden, zijn het influent van de rwzi Kralingseveer en het rioolwater van verzamelpunt industrieterrein D.

Figuur 3.8
Gehalten van 5 ftalaten in een industriële afvalwaterzuiveringsinstallatie (AWZI A).



Figuur 3.9
Gehalten van 5 ftalaten in een stedelijke rwzi (WEST).



Vergelijking Nederlandse situatie met omringende landen
Ook in het buitenland zijn enkele metingen van ftalaten in afvalwater verricht. Het is onduidelijk of de analysemethoden te vergelijken zijn en doorgaans is geen achtergrondinformatie over de bemonsteringssituatie vermeld. Een goede vergelijking is dus niet mogelijk. Ter indicatie volgen hier enkele gemeten gehalten. In Groot-Brittannië zijn in effluenten van rwzi's ftalaat-gehalten aangetroffen in de range van 0,4-6 µg/l, waarbij de hoogste gehalte DBP was (Fatoki,1990).

3.4 Alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten

3.4.1 Mogelijkheden en beperkingen van analysemethode

De monsterextracten werden geanalyseerd met behulp van HPLC met fluorescentie-detectie. Voor de kwantitatieve analyse is gebruik gemaakt van een reversed-phase (RP) HPLC methode en commercieel beschikbare standaarden. De monsterextracten zijn tevens geanalyseerd met een normal phase (NP-HPLC) methode, teneinde inzicht te krijgen in de aard van de oligomeersamenstelling welke in de monsters werd aangetroffen. De verschillen in oligomeersamenstelling tussen veldmonsters en commerciële standaarden maken dat een kwantitatieve analyse gebaseerd op RP-HPLC, waarbij alle oligomeren geïntegreerd in een piek verschijnen, praktischer is. Kwantitatieve analyse met NP-HPLC is bovendien zeer (veel meer) bewerkelijk door het grotere aantal individuele componenten waarvoor de berekeningen moeten worden gemaakt. Tenslotte wordt de kwantificering in NP-HPLC bemoeilijkt door de mogelijke co-elutie van OP(E) en NP(E) oligomeren. De Voogt (1997) hebben aangetoond dat kwantificering met RP- en NP-HPLC tot goed overeenkomende resultaten leidt wanneer monster en standaard qua oligomeersamenstelling goed op elkaar lijken. Of dit ook opgaat wanneer deze samenstellingen verschillen is voor zover bekend niet grondig onderzocht. Op grond van de normal phase analyses is geconstateerd dat de oligomeer-samenstelling in de monsters, voor zover het de nonylfenolethoxylaten betrof, meestal het best overeenkwam met die van de NP4E standaard, d.w.z. een mengsel van nonylphenol-ethoxylaten met gemiddeld 4 ethoxylaateenheden. Dit laatste mengsel is derhalve voor de kwantificering m.b.v. RP-HPLC gebruikt. In het geval van octylfenol-ethoxylaten was uitsluitend een standaard met gemiddeld 8 à 9 ethoxylaat-eenheden beschikbaar, zodat de kwantitatieve analyse van OPE daarop is gebaseerd. Octylfenol en nonylfenol werden gekwantificeerd met t-octylfenol en nonylfenol (een commercieel mengsel van verschillend vertakte nonyl-isomeren). De detectielimiet van de methode is ca. 0,10 µg/l in afval- en oppervlaktewater, 10 µg/kg droge stof in sediment, zwevend stof en riool-/zuiveringsslib. Hiertoe werd steeds ca. 60 ml water of 10-50 g pellet in gebruik genomen. In biota bedroeg de detectielimiet 0,15 mg/kg op natgewicht basis.
Belangrijk is te vermelden dat alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in afwijkende matrices zijn gemeten vergeleken bij de hormonen, bisfenol-A, ftalaten en *in vitro* assays. In tegenstelling tot deze analyses, waarbij gemeten werd in gefiltreerd afvalwater, zijn de APE's gemeten in de ongefiltreerde suspensie van afvalwater. Hierbij zijn dus zowel de componenten opgelost in water als die gebonden aan deeltjes bepaald. Ook het riool-/zuiveringsslib is anders voorbewerkt. In plaats van een suspensie is de pellet na centrifugeren bij 2000-3000 rpm in gebruik genomen voor de analyse van de APE's.

Het gedrag van APE's, opgelost in water of gebonden aan vaste deeltjes, is nog steeds onderwerp van discussie. Daardoor is niet duidelijk in hoeverre de geconstateerde gehalten in het afvalwater worden bepaald door de hoeveelheid suspensiedeeltjes in deze matrix en in rioolslib-/zuiveringsslib door het watergehalte. Daarbij moet bovendien worden aangetekend dat de deeltjes in het ruwe afvalwater zeer heterogeen van oorsprong zijn, en dus een verschillende mate van bindingscapaciteit kunnen vertonen. Aanbevolen wordt om het gedrag van deze groep in een aparte studie nader te onderzoeken, zodat een betere keuze gemaakt kan worden welke (deel van de) matrix voor de analyse van APE's dient te worden gebruikt.

3.4.2 Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen

Een overzicht van het voorkomen van alkylfenolen en alkylfenol-ethoxylaten is gegeven in tabel 3.5. De oligomeersamenstelling in de monsters, voor zover het de nonylfenolethoxylaten betrof, kwam meestal overeen met die van de NP4E standaard, d.w.z. een mengsel van nonylphenol-ethoxylaten met gemiddeld 4 ethoxylaateenheden.

Tabel 3.5
Gemeten concentratie ranges (in µg/l) van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in diverse matrices.

	OPE	OP	NPE	NP
milieumatrices				
oppervlaktewater[1]	<d.l.	<d.l.	<d.l.	<d.l.- 0,14
sediment[2]	<d.l.	<d.l.	2,6 - 5,7	0,63 - 1,70
zwevend stof[3]	<d.l.- 0,0003	<d.l.	0,70 - 8,0	0,21 - 0,62
biota[4]			<d.l.	<d.l.
stedelijk afvalwater				
influent/rioolwater[5]	<d.l.- 27	<d.l.- 0,1	2,1 - 170	<d.l.- 23
riool-/zuiveringsslib[6]	<d.l.- 28	<d.l.- 2	0,7 - 880	<d.l.- 125
effluent[5]	<d.l.- 1,3	<d.l.- 0,2	<d.l.- 6,1	<d.l.- 1,0
industrieel afvalwater				
influent/rioolwater[5]	<d.l.- 5.350	<d.l.- 100	<d.l.- 2.270	<d.l.- 400
riool-/zuiveringsslib[6]	<d.l.- 50	<d.l.- 24	<d.l.- 2.400	<d.l.- 2.500
effluent[5]	<d.l.- 8,7	<d.l.- 0,13	0,9 - 15	<d.l.- 1,2

[1] in µg/l; n=3, locatie kanaal Gent-Terneuzen, IJmuiden en Beneluxtunnel.
[2] uitgedrukt in µg/g droge stof; n=3, locatie kanaal Gent-Terneuzen, IJmuiden en Amerikahaven.
[3] uitgedrukt in µg/g droge stof; n=3, locatie Westerschelde-Terneuzen, IJmuiden en Beneluxtunnel.
[4] uitgedrukt in µg/g droge stof; n=4, locatie Westerschelde-Terneuzen, Beneluxtunnel en Oosterschelde.
[5] in µg/l; totaal influent/rioolwater/effluent, dus inclusief daarin aanwezig zwevend stof.
[6] in µg/g droge stof.

Alle verkregen meetgegevens van de alkylfenol(-ethoxylaten) analyses voor de diverse matrices zijn per locatie voor oppervlaktewater en afvalwater gegeven in respectievelijk bijlage 2 en 3.

Locaties

Oppervlaktewater

Gehaltes van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in oppervlaktewater bleven over het algemeen onder de detectielimiet, met uitzondering van kanaal Gent-Terneuzen waar nonylfenol in een laag gehalte (0,14 µg/l) werd aangetroffen. In sediment en zwevend stof daarentegen zijn nonylfenol en nonylfenol-ethoxylaten in alle vijf bemonsterde locaties (Amerikahaven, Westerschelde-Terneuzen, kanaal Gent-Terneuzen, IJmuiden en Beneluxtunnel) aangetroffen. De gehaltes nonylfenol bleven een kwart tot de helft onder die van de ethoxylaten. Octylfenol en octylfenolethoxylaten zijn op geen van de bemonsterde locaties aangetroffen.

Biota

De resultaten in de biota monsters op de locaties Beneluxtunnel, IJmuiden, Westerschelde-Terneuzen en Oosterschelde tonen dat nonylfenol in de monsters niet kon worden aangetoond boven de detectiegrens van 0,15 mg/kg. De resultaten wezen er tevens op dat ook de ethoxylaatgehalten de detectiegrens van 0,15 mg/kg niet te boven gaan.

Dit meetgegeven kan worden bevestigd aan de hand van de enige gemeten concentratie nonylfenol in het kanaal Gent-Terneuzen van 0,14 µg/l en de bioconcentratie factor voor biota (1000-10 000). Op basis hiervan kan dus een concentratie in biota verwacht worden van 140 tot 1400 µg/kg vetgewicht. Bij een vetgehalte van 14 g/kg (mosselen bij Terneuzen) betekent dit 10-100 µg/kg natgewicht, dat ruimschoots onder de huidige detectielimiet van 150 µg/kg natgewicht ligt.

Vergelijking van Nederlandse situatie met omringende landen
Eerder zijn in Nederland concentraties van totaal NPE of OPE in estuariene en mariene sedimenten en industrieel rioolslib bepaald door de Voogt (1997). In alle mariene en estuariene monsters werden APE aangetroffen met een predominantie van oligomeren die 1-3 ethoxylaat eenheden bevatten. De niveaus van totaal NPE (10-400 µg/kg d.s.) of OPE (0,2-16 µg/kg d.s.) in estuariene en mariene gebieden waren 4-100 maal hoger dan de corresponderende totaal NP (0,1-17 µg/kg d.s.) of OP (<d.l.-2 µg/kg d.s.) niveaus. Dit wijst er op dat de ethoxylaten aanwezig in het mariene milieu niet in belangrijke mate worden omgezet in respectievelijk NP of OP. De gevonden verdeling van ethoxylaten oligomeren suggereert echter dat veranderingen in oligomeer verdeling, vergeleken met de oorspronkelijke bronnen van deze stoffen, kunnen optreden. Immers een predominantie van O/NPE met 1-3 ethoxylaat eenheden werd waargenomen in plaats van de hoger geëthoxyleerde profielen die doorgaans in de commerciële mengsels wordt toegepast. Blijkbaar is de omzetting naar O/NP (1-3)E een belangrijke eerste stap in het afbraakproces.

Gehalten van NP en NPE in rivieren zijn uit de literatuur bekend voor onder meer Groot-Brittannië, Zwitserland, Duitsland en Noord-Amerika. Een overzicht van in de literatuur gerapporteerde concentraties in rivierwater is gegeven in tabel 3.6. Deze gehalten liggen in het algemeen veel hoger dan werd gemeten in oppervlaktewater in Nederland in de onderhavige studie.
Ook zijn elders in de wereld alkylfenol(-ethoxylaten) in biota (spier/lever van vis) APE gemeten en aangetroffen. Gehalten bedroegen daar maximaal 10 µg/g. Tabel 3.7 geeft een overzicht van in de literatuur gerapporteerde waarden voor biota.

Tabel 3.6
Voorkomen van APE's in rivierwater in Groot-Brittannië, Canada, Verenigde Staten, Zwitserland en Duitsland (Blackburn, 1995; Bennie, 1997; Naylor, 1992; Ahel, 1987/1994 en Thiele, 1997).

rivier	'totaal' NP (µg/l)	'opgelost' NP (µg/l)	'totaal' NPE+NP2E (µg/l)	'opgelost' NPE+NP2E (µg/l)
Groot-Brittannië				
Lea	<d.l. - 12	<d.l. - 9,0	<d.l.	<d.l.
Dee, Thames, Exe	<d.l. - 2,3	<d.l. - 0,7	<d.l.	<d.l.
Mersey estuary	3,3 - 6,2	2,6 - 2,9	3,2 - 4,5	0,5 - 3,5
Aire	82 - 180	24 - 53	max 46	max 32
Canada (35 locaties)	<0,01 - 0,92		<0,02 - 17,8	
Verenigde staten (30 rivieren)	0,2 - 180		0,04 - 0,37 (NPE)	
Zwitserland Glatt	<0,3 - 45		<0,3 - 99	
Duitsland (14 locaties)	0,01 - 0,4			

Tabel 3.7
Aanwezigheid van alkylfenol(-ethoxylaten) in vissen in rivier de Aire (Groot-Brittannië) en Glatt vallei (Zwitserland) (CEFAS, 1998; Ahel, 1993).

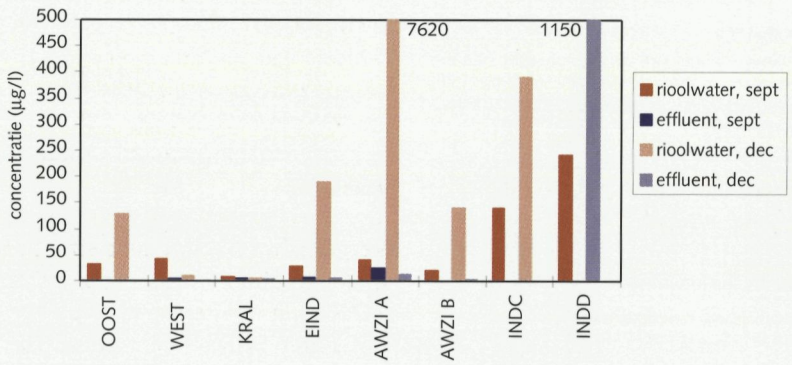
soort	weefseltype	NP (mg/g)	OP (mg/g)	NPEO+NP2EO (mg/g)
baars, blankvoorn, kopvoorn, riviergrondel	spier	max. 0,8	niet gedetecteerd	max. 4,2
kopvoorn	lever	niet bepaald	niet gedetecteerd	9,5
kopvoorn	lever	1,0	niet gedetecteerd	3,2
	spier	0,18	niet gedetecteerd	0,31

3.4.3 Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib

Algemeen
Het patroon van voorkomen van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in afvalwater en riool-/zuiveringsslib is grillig.
Nonylfenolethoxylaten werden in alle stedelijke afvalwatermonsters, al dan niet gezuiverd aangetroffen. Octylfenolethoxylaten en nonylfenol zijn weliswaar op alle bemonsteringslocaties van stedelijk afvalwater een keer aangetroffen, maar in het monster van de andere meetserie van dezelfde locatie bleken zij niet in meetbare concentraties aanwezig te zijn. Octylfenol is slechts eenmaal in een zeer lage concentratie in stedelijk afvalwater te meten geweest. De APE-gehalten in stedelijk afvalwater waren over het algemeen laag, en bedroegen gemiddeld respectievelijk 55 µg/l totaal APE voor ruw rioolwater en 4 µg/l voor het effluent van een rwzi.

In industrieel afvalwater waren de verschillen in de gehalten van AP(E)ís tussen de beide meetseries op dezelfde locaties nog groter dan in stedelijk afvalwater. Nonylfenolethoxylaten werden in bijna alle afvalwatermonsters aangetroffen, octylfenolethoxylaten 4 van de 8 keer, nonylfenol 3 van de 8 keer en octylfenol werd éénmaal aangetroffen. De gehalten APE in industriëel afvalwater zijn gemiddeld ca. 10-20 keer zo hoog als die in stedelijk rioolwater.
In riool-/zuiveringsslib werd een grote range aan gehalten van AP(E)'s gevonden. In het stedelijk slib varieerden de concentraties nonylfenolethoxylaten van 0,7 tot 880 µg/g d.s. Ook het zuiveringsslib van de overige rwzi's laten grote fluctuaties in concentraties van nonylfenolethoxylaten in de tijd zien. Bij hogere gehalten aan nonylfenolethoxylaten waren doorgaans ook de octylfenolethoxylaten en nonylfenolen in meetbare hoeveelheden in het slib aanwezig. Ook bij de industriële bemonsteringslocaties (range <d.l.-2400 µg NPE/g) is soms een dergelijk grillig patroon herkenbaar, zoals bij de meetseries van rioolslib van industrieterrein C in september en december.

Locaties
In figuur 3.10 is het voorkomen van totaal APE in rioolwater en de rwzi/awzi's grafisch weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat de hoogste APE gehalten worden gevonden in industrieel afvalwater. Zowel in industrieel als stedelijk afvalwater zijn er grote fluctuaties van de aangetroffen concentraties in de tijd.



Figuur 3.10
Gehalten aan som van octyl- en nonylfenolethoxylaten in 5 rwzi's en in 3 rioolputten.

Intermezzo
De oplosbaarheid in water van NPE neemt af met afnemend aantal ethoxylaat(EO) eenheden. Als gevolg hiervan hebben NP en de lagere oligomeren (NP1E, NP2E) de neiging te zich te verplaatsen naar een meer 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 (n EO > 8) al omgezet naar de lagere, slecht in water oplosbare verbindingen.
Zo kan in ruw rioolwater al 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 omzettingsprodukten (vooral NP1E, NP2E en NP en gecarboxyleerde derivaten, zie Thiele,1997). Deze produkten zijn resistent tegen verdere biologische afbraak en verlaten de rwzi gedeeltelijk via het effluent. Het grootste gedeelte van de gevormde lagere oligomeren (NP1E, NP2E en NP) adsorbeert door hun lipofiele karakter echter aan het slib. In anaeroob slib is verdere omzetting van NP1E en NP2E tot NP aangetoond (Giger, 1984).

De resultaten van met name de industriële afvalwater- en slibmonsters laten zien dat APE geloosd worden in afvalwatersystemen. Zo is in het rioolslib van IND C een zeer hoog gehalte aan nonylfenol van circa 2500 µg/g d.s. aangetroffen. Uit de literatuur is bekend dat hoger geëthoxyleerde alkylfenolen worden afgebroken in lager geëthoxyleerde verbindingen en mogelijk nonylfenol (Giger, 1986; Ahel, 1987/-1994; Thiele, 1997). Een getal van 2500 µg/g droge stof nonylfenol is waarschijnlijk niet (alleen) het gevolg van afbraak, aangezien de groep potentiële moederverbindingen, te weten de nonylfenolethoxylaten, op 1 van beide monsterdata geheel in slib afwezig was. Veelal verschilt het geloosde APE qua samenstelling niet veel in vergelijking tot het mengsel dat is toegepast (de Voogt, 1997). Een als detergent relatief vaak gebruikte commerciële toepassing is een mengsel dat bestaat uit oligomeren met een gemiddelde ethoxylaatketenlengte van 10 eenheden (NP10E; de Voogt, 1997). Opvallend is dat in de eerste meetserie slechts in één influent NP10E werd aangetroffen, terwijl in de tweede meetserie in zeven van de acht bemonsterde influenten NP10E werd gevonden.
In het effluent blijkt vrijwel geen of geen NP10E patroon meer voor te komen. Dit bevestigt hetgeen uit de literatuur bekend is, nl. dat in rwzi's de hogere oligomeren worden omgezet in de lagere (en eventueel verder in NP).

In de slibmonsters werden voornamelijk NP2E en NP4E patronen gevonden (hetgeen overeenkomt met mengsels van oligomeren met 1-5 ethoxylaat-eenheden). In vier van de twaalf onderzochte zuiveringsslibmonsters werden overigens naast de lagere oligomeren ook hogere oligomeren aangetroffen, zij het in relatief kleine hoeveelheden vergeleken met de lagere. Dit wijst erop dat deze verbindingen wel degelijk aan slib kunnen adsorberen, en dat hun afbraak niet zeer snel verloopt.

Vergelijking Nederlandse situatie met omringende landen
In de literatuur worden voor influenten gehalten variërend van 3-2500 µg NP/l en 4-9000 µg NPE/l gerapporteerd (Thiele, 1997). Effluenten bevatten een totaal van 1-760 µg/l NP en 2-480 µg/l NPE (Di Corcia, 1994; Kubeck, 1990; Thiele, 1997). In riool-/zuiveringsslib werd NP aangetroffen in gehalten tussen 0,002-2,5 g/kg droog, en NPE concentraties variërend van 8 mg tot 1 g/kg droge stof. Recentelijk heeft Thiele (1997) in een review gerapporteerd over de gehalten in rwzi's. Een overzicht van de aangetroffen ranges staat in tabel 3.8.
De in deze oriënterende studie gemeten concentraties aan NPE in afvalwater komen goed overeen met de in de literatuur gerapporteerde ranges. Opvallend is dat de in de oriënterende studie gemeten gehalten van NP en NPE in effluenten in het lage gebied van de in de literatuur gerapporteerde ranges vallen.

Tabel 3.8
Overzicht van NP en NPE concentratieranges aangetroffen in rwzi's (Thiele, 1997).

stof(fen)	influent (µg/l)	influent NL (deze studie) (µg/l)	effluent (µg/l)	effluent NL (deze studie) (µg/l)	slib (µg/g d.s.).	slib NL (deze studie) (µg/g d.s.)
NP	3 - 2.500	0 - 400	0,1 - 760	0 - 1,2	2 - 2.530	0 - 2.500
NPE	4 - 9.000	2 - 2.300	2 - 480	0 - 15	8 - 900	0 - 2.400

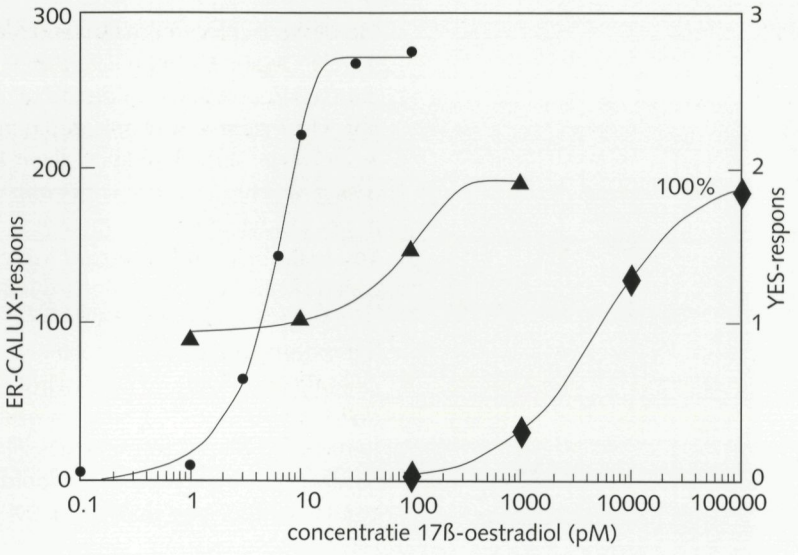
De in riool-/zuiveringsslib gevonden concentraties in de oriënterende studie komen eveneens goed overeen met in de literatuur gerapporteerde waarden. Zo zijn de hoge concentraties (tot enkele g/kg d.s.) van NPE in stedelijk riool-/zuiveringslib en van NPE en NP in slib van IND C ook elders in Europa (Duitsland, Zwitserland) aangetroffen.

3.5 *In vitro* assays

3.5.1 Mogelijkheden en beperkingen van *in vitro* assays

De drie gebruikte *in vitro* screeningsassays laten allen oestrogene potentie zien in diverse matrices, doch de gemeten waarden voor eenzelfde locatie kunnen vooral tussen de ER-CALUX en YES enerzijds en de ER-bindingsassay anderzijds zeer verschillen. Met de ER-bindingsassay wordt over het algemeen een duidelijk grotere respons gevonden dan met de beide celsystemen. Dit houdt waarschijnlijk verband met het feit dat zowel agonisten als antagonisten in de ER-bindingsassay op dezelfde wijze aan de respons bijdragen. Ook bevat de ER-bindingsassay geen natuurlijke barrières voor stoffen in de vorm van een celwand. De ER-CALUX en YES-assay geven over het algemeen een vergelijkbare respons.

Figuur 3.11 geeft een normale ijklijn voor 17ß-oestradiol in de ER-CALUX, de YES-assay en de ER-bindingsassay. Tabel 3.9 vat de prestatiekenmerken samen. De variatiecoëfficiënt van de ER-CALUX metingen ligt tussen de 5-10%, van de YES-assay tussen 10-25%, en van de ER-bindingsassay 15-25%. De maximum inductiefactor voor 17ß-oestradiol in de ER-CALUX assay (bereikt bij 30 pM) is 80-100, voor de YES-assay (bij 1000 pM) 5-14. De ER-bindingsassay bereikt de maximale verdringing pas bij een concentratie van 100.000 pM 17ß-oestradiol. Dit lijkt in eerste instantie vreemd omdat bij deze *in vitro* assay de toegankelijkheid van de receptor veel groter is dan bij celsystemen waar een celwand moet worden gepasseerd. Door de aard van het type assay, een competitieve bindingsassay waarbij het gaat om een evenwicht tussen 17ß-oestradiol en de (xeno)-oestrogenen, is het echter logisch dat relatief veel materiaal nodig is om alle 17ß-oestradiol van de receptor te verdringen. Doordat de detectielimiet van de YES-assay ongeveer een factor 10 hoger is dan van de CALUX assay, is bij dezelfde concentratie van het extract ongeveer 10 maal meer monster nodig. Voor de bindingsassay is nog meer monster nodig omdat de maximale verdringing bij een 100 maal hogere concentratie wordt bereikt dan bij de YES-assay en bovendien een hele verdunningsreeks wordt gemaakt voor correctie van aspecifieke bindingen.
Bij de ER-bindingsassay is steeds een groot verschil te zien tussen monsters die onder de detectielimiet vielen en de wel meetbare monsters. Dit hangt samen met de hoge detectielimiet van de ER-bindingsassay.
De hoeveelheid materiaal die nodig is van iedere matrix voor een ER-CALUX, YES of ER-bindingsassay is als gevolg van de verschillende prestatiekarakteristieken eveneens verschillend. In onderstaande tabel 3.10 is de in één test well voor de blootstelling gebruikte hoeveelheid maal 10 weergegeven. De gepresenteerde getallen betreffen een range van een relatief schoon monster tot een relatief verontreinigd monster. In verband met de hanteerbaarheid van de monsters en de mogelijkheid om er nog wat combinatieblootstellingen mee te doen is het soms raadzaam om de hoeveelheid op te werken monster toch iets te vergroten. Bovendien gaven enkele blanco filter extracten een relatief



Figuur 3.11
Standaardcurves van 17ß-oestradiol in de ER-CALUX (cirkels), YES (driehoekjes) en de ER-bindingsassay (wiebertjes). De lijn van de ER-bindingsassay loopt van 0 tot 100% verdringing, die van de ER-CALUX en YES van de waarde voor de blanco t/m de maximale respons.

Tabel 3.9
Prestatiekarakteristieken van de drie toegepaste *in vitro* assays ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay.

	variatie-coëfficiënt (%)	**detectie-limiet** (pM E2)	**maximaal inductiefactor** (bij conc. pM)	**hoeveelheid DMSO/well** (µl)
ER-CALUX	5 - 10	0,5	80 - 100 (30)	0,2 - 0,4
YES	10 - 25	10	5 - 14 (1.000)	4
ER-bindingsassay	15 - 25	1.000	n.v.t. (100.000)	12,5

Tabel 3.10
Benodigde hoeveelheid materiaal voor het bepalen van oestrogene potentie met de *in vitro* assays ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay.

	oppervlaktewater ml	**zwevend stof** g	**ruw rioolwater** ml	**effluent** ml	**riool-/zuiveringsslib** g
ER-CALUX	6 - 30	16 - 40	0,2 - 2,5	0,9 - 9	0.5 - 4
YES	60 - 250	50 - 400	4 - 100	10 - 100	5 - 40
ER-bindingsassay	± 950	± 1.500	± 400	± 400	± 150

hoge respons, maar door de sterke verdunning die voor de ER-CALUX en YES-assay nodig is bij de in dit oriënterend onderzoek nog toegepaste monsterhoeveelheden, had dit geen effect op de uiteindelijke respons. Bij kleinere hoeveelheden hadden dergelijke hoge blanco's echter wel nadelig kunnen werken.
In tabel 3.11 is te zien dat wanneer zwevend stof wordt geëxtraheerd met hexaan de oestrogene potentie gemeten met de ER-CALUX assay ongeveer een factor 3,5 lager is dan wanneer hetzelfde zwevende stof wordt geëxtraheerd met een dichloormethaan/aceton mengsel. In de YES-assay echter, zijn alle hexaan-extracten lager dan de detectielimiet

terwijl de dichloormethaan/aceton extracten wel gewoon een respons geven. Deze resultaten lijken te bevestigen dat meer lipofiele componenten de celwand van de gistcel moeilijk kunnen passeren. Wat zeker ook sterk zal meespelen is dat in het groeimedium van de gistcellen geen carrier voor zeer lipofiele stoffen aanwezig is zoals bij CALUX-assays wel het geval is. Uit eerder onderzoek is gebleken dat wanneer in het celkweekmedium minimaal 5% serum aanwezig is (standaard is 10%) lipofiele stoffen goed beschikbaar blijven voor opname door de cellen (Murk, pers. mededeling). Bij lagere concentraties serum treedt er zeer snel verlies op van de lipofiele stoffen aan de wanden van de microtiter plaat. Dit effect zal het sterkst zijn wanneer het extract als eerste aan de wells of buis wordt toegevoegd, omdat anders de stoffen ook nog aan b.v. de gistcellen of eiwitten kunnen adsorberen.
Behalve de 3 hexaan-extracties zijn alle, binnen het in dit rapport beschreven onderzoek, uitgevoerde extracties gericht op meer polaire componenten. Van de ER-CALUX is bekend dat ook lipofiele stoffen de celwand goed kunnen passeren, het meer apolaire extract van zwevend stof blijkt hierin dan ook een meetbaar signaal te geven.

Tabel 3.11
Resultaten van *in vitro* assays ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay na extractie van zwevend stof met het hydrofobe hexaan of extractie met de meer hydrofiele combinatie dichloormethaan/aceton (50/50 v/v).

monster	EEQ in ER-CALUX	EEQ in YES	EEQ in ER-bindingsassay
	pmol EEQ/g	pmol EEQ/g	pmol EEQ/g
extractie met hexaan			
blanco[1]	< 0	< 0	
Haringvliet sluizen, 12/9	0,30	< 0	
Maassluis, 8/9	0,26	< 0	
Eijsden, 24/9	0,31	< 0	
extractie met DCM/aceton			
blanco[1]	< 0	< 0	0
Haringvliet sluizen, 12/9	0,91	1,06	66,6
Maassluis, 8/9	0,28	0,18	302
Eijsden, 24/9	1,86	0,84	0

[1] De EEQ in de blanco is omgerekend naar dezelfde verdunning als gebruikt voor de analyse van de monsters.

In vivo validatie van *in vitro* assays

Net zoals bij andere *in vitro* assays geldt dat wanneer de relatie tussen de oestrogene respons van een monster de *in vitro* en de *in vivo* respons in een experiment of in veldmonsters bekend is, aangegeven kan worden wat de kritische respons (bijvoorbeeld alarmwaarde en grenswaarde) in een *in vitro* assay is. Voor (xeno)-oestrogene stoffen is dit momenteel nog niet bekend, maar er wordt al wel onderzoek naar gedaan (Legler, 1999).

3.5.2 Aanwezigheid in oppervlaktewatersystemen

Algemeen

De *in vitro* assays zijn uitgevoerd in dezelfde fractie waarin hormonen en bisfenol-A zijn bepaald, dus na filtratie over 1,2 en 0,45 µm. Deze fractie kan worden gekenschetst als de hydrofiele fractie. In tabel 3.12 is een overzicht gegeven van de oestrogene potentie in diverse milieumatrices, zoals gemeten met de *in vitro* assays ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay. Zoals verwacht is de oestrogene potentie gemeten in de drie assays sterk verschillend met ER-CALUX $\approx$ YES < ER-bindingsassay. De oestrogene potentie in zowel de waterfase van het oppervlakte-water als in het zwevend stof is laag: veelal 1-10 pmol 17ß-oestradiol equivalenten (EEQs)/l of 1 pmol EEQ/g, wat gelijk staat aan 0,3-2,7 ng 17ß-oes-tradiol/l en 0,3 ng 17ß-oestradiol/g. Echter met de ER-bindingsassay worden in zwevend stof aanmerkelijk hogere getallen gevonden.

Tabel 3.12
Gemeten oestrogene potentie met behulp van de *in vitro* assays ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay (in pmol EEQ/l) in diverse matrices.

	ER-bindingsassay	ER-CALUX	YES-assay
milieumatrices			
oppervlaktewater	<d.l. - 9,4	0,25 - 1,72	<d.l. - 4
zwevend stof[1]	0 - 302	0,26 - 2,49	0 - 1,06
stedelijk afvalwater			
influent/rioolwater	<d.l. - 5.270	66 - 440	0,5 - 317
riool-/zuiveringsslib[2]	600 - 1.500	2,9 - 6,4	<d.l. - 5
effluent	<d.l. - 230	4,7 - 20,5	1,4 - 29
industrieel afvalwater			
influent/rioolwater	<d.l. - 1.520	4,3 - 120	<d.l. - 77
riool-/zuiveringsslib[2]	360 - 2.000	1,6 - 41	<d.l. - 2.750
effluent	<d.l. - 116	0,1 - 59	0,35 - 58

[1] in pmol EEQ/g droge stof.
[2] in pmol EEQ/g droge stof; gehalte bepaald in representatieve suspensie rioolslib.

Het behandelen van monsters met het enzym ß-glucuronidase laat geen aantoonbare verhoging zien van de oestrogene potentie in de ER-CALUX, YES en de ER-bindingsassay (zie bijlage 2 en 3). In overeenstemming met wat werd geconcludeerd bij de chemische analyses lijken hormonen niet of nauwelijks als glucuronide aanwezig te zijn.

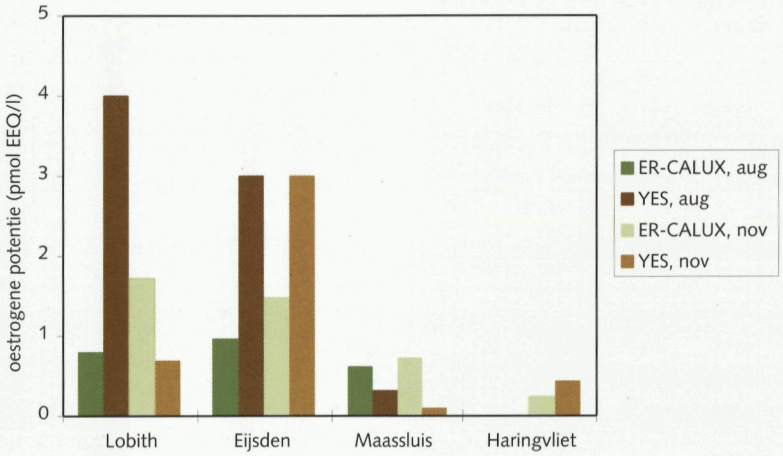
Alle verkregen meetgegevens van de *in vitro* assays ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay voor de diverse matrices zijn per locatie voor oppervlaktewater en afvalwater gegeven in respectievelijk bijlage 2 en 3.

Locaties

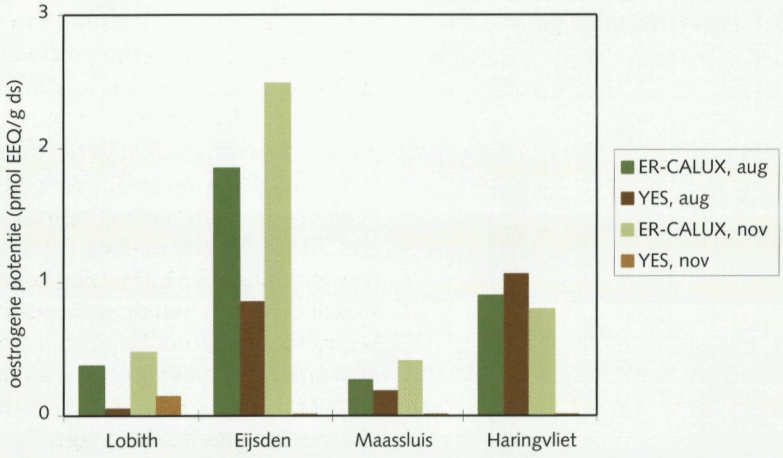
In de figuur 3.12 en 3.13 is de aanwezigheid van de oestrogene potentie in respectievelijk oppervlaktewater en zwevend stof op de locaties Lobith, Eijsden, Maassluis en Haringvlietsluizen, gemeten met de *in vitro* assays ER-CALUX en YES-assay weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat de oestrogene potentie tussen de locaties sterk kunnen verschillen, maar ook de matrix waarin deze voorkomt.

Opgemerkt dient te worden dat de zwevend stofextracties zijn uitgevoerd met het meer polaire dichloormethaan/aceton extractiemiddel en niet met hexaan. De resultaten uit tabel 3.11 laten zien dat ook de meer apolaire extrac-ten aan de oestrogene potentie kunnen bijdragen.
Bij Lobith is de gemeten oestrogene potentie in de waterige fractie hoog ten opzichte van de overige drie locaties en laag in de vaste matrix van zwevend stof. Bij Eijsden is de gemeten oestrogene potentie in zowel de waterige als vaste fractie hoog. De gemeten waarden met behulp van de YES-assay voor Eijsden in november valt hiermee uit de toon. Het getoonde beeld van de oestrogene potentie in de waterige fracties komt redelijk overeen met de gehalten aan hormonen, die in deze oppervlaktewaterserie zijn gemeten.
De resultaten met de ER-bindingsassay zijn in beide figuren niet getoond omdat de gemeten waarden ofwel onder de detectielimiet liggen ofwel hoge getallen waren die buiten de meetrange van ER-CALUX en YES-assay lagen. Dit beeld komt overeen met de gehalten aan hormonen die in deze oppervlaktewaterserie gemeten zijn.

Figuur 3.12
Aanwezigheid van oestrogene potentie in oppervlaktewater op 4 locaties in Nederland, gemeten met de *in vitro* assays ER-CALUX en YES.



Figuur 3.13
Aanwezigheid van oestrogene potentie in zwevend stof op 4 locaties in Nederland, gemeten met de *in vitro* assays ER-CALUX en YES.



3.5.3 Aanwezigheid in afvalwater en riool-/zuiveringsslib

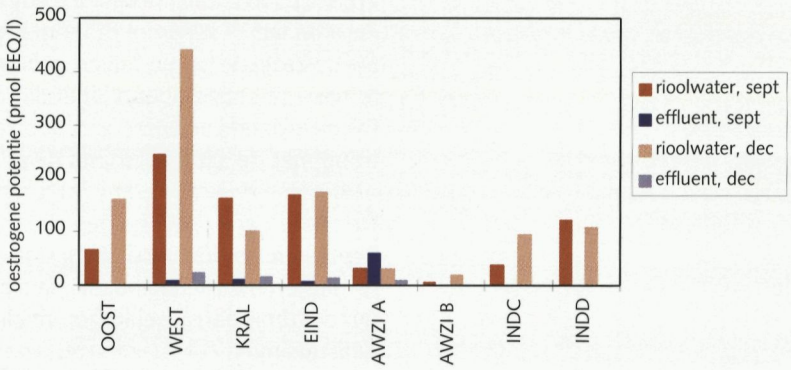
Algemeen
De oestrogene potentie in afvalwater is hoger dan in oppervlaktewater. Voor het gefiltreerde stedelijke rioolwater en influent ligt de oestrogene potentie in de orde van grootte van 50-450 pmol EEQ/l (ER-CALUX), 0,5-300 pmol EEQ/l (YES) en <d.l.-5000 pmol EEQ/l (ER-bindingsassay). In de rwzi's vindt een aanzienlijke (factor 10 tot 20) reductie plaats, hetgeen resulteert in lagere gehalten in effluent, in de orde van 5-20 pmol EEQ/l (ER-CALUX).
De oestrogene potentie van gefiltreerd rioolwater vanaf industrieterreinen ligt beduidend lager dan bij stedelijk afvalwater.
De oestrogene activiteit van riool- en zuiveringsslib vertoont een gelijke trend met de activiteit in het ruwe afvalwater.

De oestrogene potentie bepaald met de ER-CALUX en de YES-assay liggen in dezelfde orde van grootte en volgen hetzelfde patroon. De resultaten met de ER-bindingsassay zijn veel grilliger. De meetsignalen waren doorgaans veel hoger, maar ook lagen deze vaker onder de detectielimiet.
Evenals bij oppervlaktewater zijn bij afvalwater geen consistente verhogingen van de oestrogene potentie waargenomen na behandeling met het enzym ß-glucuronidase, m.u.v. rioolwater van de woonwijk. Alleen bij deze woonwijk is de tijdsperiode tussen uitscheiding door de mens en de monstername slechts 1-2 uur. Daardoor zijn wellicht nog niet alle hormoonglucuroniden afgebroken. Hoewel dit niet bevestigd wordt door de resultaten van de chemische analyses, komt dit wel overeen met de resultaten van experimenteel onderzoek naar deglucuronidering in actief slib, waarin E-coli's aanwezig zijn (Legler, persoonlijke mededeling).

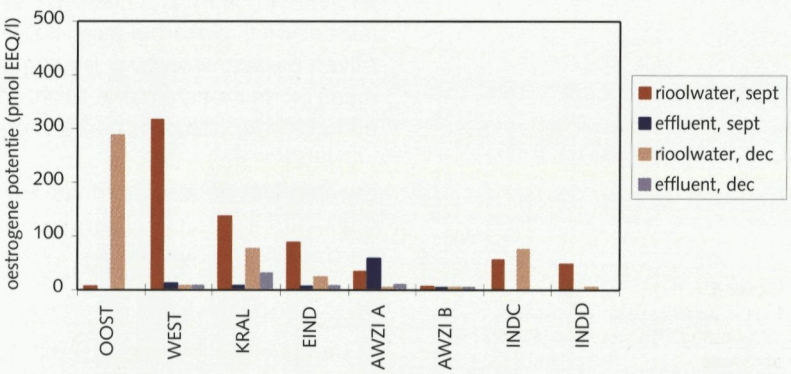
Locaties
In de figuren 3.14 t/m 3.16 zijn de resultaten van respectievelijk de ER-CALUX, YES en de ER-bindingsassay gegeven.
In alle rwzi's is de oestrogene potentie in het effluent duidelijk lager dan die in het influent. Voor gefiltreerd stedelijk rioolwater ligt de oestrogene potentie in de orde van grootte van 50-450 pmol EEQ/l voor ER-CALUX, 0,5-300 pmol EEQ/l voor YES en <d.l.-5000 pmol EEQ/l voor de ER-bindingsassay. In een rwzi vindt er een aanzienlijke reductie plaats, hetgeen resulteert in waarden voor gefiltreerd biologisch gezuiverd effluent in de range 5-20 pmol EEQ/l voor ER-CALUX, 1-30 pmol EEQ/l voor YES en <d.l.-250 pmol EEQ/l voor de ER bindings-assay. Alleen het patroon van oestrogene potentie gemeten met de ER-CALUX is steeds vergelijkbaar met dat van de hormonen (figuren 3.2 en 3.3). De hoogste potentie werd gevonden in de stedelijke rwzi's en de laagste activiteit in de industriële watermonsters.
De oestrogene potentie voor gefiltreerd rioolwater vanaf industrieterreinen ligt met 5-120 pmol EEQ/l voor ER-CALUX, <d.l.-75 pmol EEQ/l voor YES en <d.l.-1500 pmol EEQ/l voor de ER-bindingsassay beduidend lager.
De oestrogene activiteit in riool-/zuiveringsslib loopt een gelijke trend met het rioolwater en ligt doorgaans onder de 10 pmol EEQ/g droge stof voor ER-CALUX en YES. Alleen de oestrogene potentie in rioolslib afkomstig van industrieterrein C is zeer hoog. De gemeten waarden voor de oestrogene potentie van het rioolwater van deze locatie was niet opvallend hoog. Overigens is hetzelfde beeld voor nonylfenol aangetroffen op deze locatie. Ook hier werden extreem hoge concentraties nonylfenol in het rioolslib gevonden en weinig in het rioolwater.

Mogelijkerwijs is bij dit monster nonylfenol de belangrijkste verantwoordelijke component voor de verhoging van de oestrogene potentie. Opgemerkt dient te worden dat de slibextracties zijn uitgevoerd met het meer polaire dichloormethaan/aceton extractiemiddel en niet met hexaan, waardoor ook de meer apolaire (xeno)-oestrogene verbindingen kunnen bijdragen aan de verhoging van de oestrogene potentie.

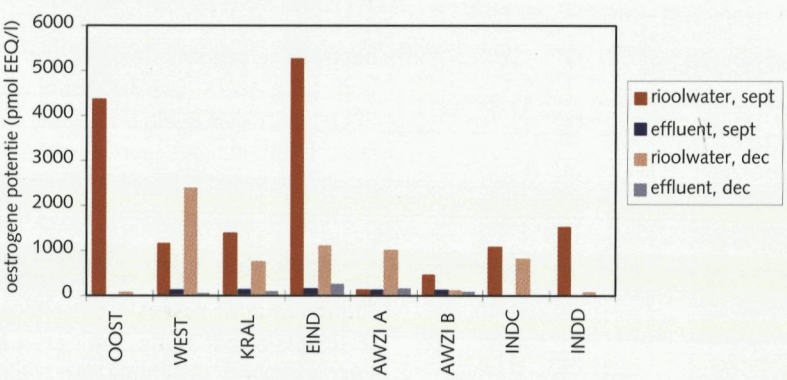
Figuur 3.14
Voorkomen van oestrogene potentie, gemeten met ER-CALUX assay in 5 rwzi's en in 3 rioolputten.



Figuur 3.15
Voorkomen van oestrogene potentie, gemeten met YES-assay in 5 rwzi's en in 3 rioolputten.



Figuur 3.16
Voorkomen van oestrogene potentie, gemeten met ER-bindingsassay in 5 rwzi's en in 3 rioolputten.



4 Relaties tussen chemische analyses en *in vitro* assays

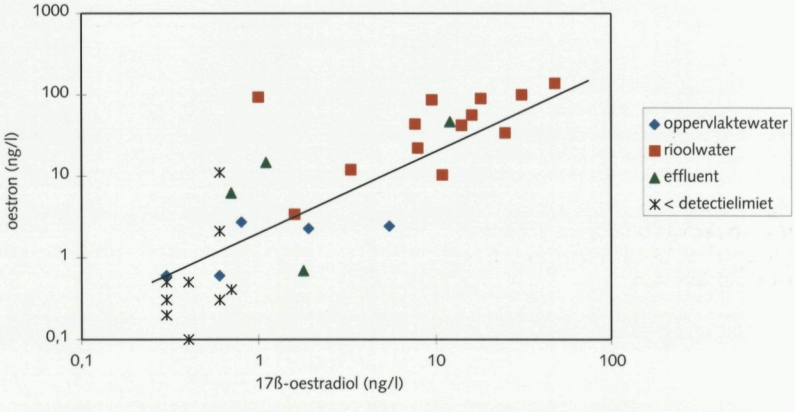
4.1 Trends

Over het algemeen is de data set van de chemische analyses en de *in vitro* assays te gering om trends per matrix te kunnen vaststellen. Ook zijn enkele bemonsteringslocaties erg specifiek, die een mogelijke trend kunnen verstoren. Desondanks wordt in deze paragraaf met deze summiere dataset een poging gedaan om mogelijke relaties zowel tussen de chemische parameters en de *in vitro* assays onderling als tussen beide type meetgegevens te vinden.

Trends chemische analyses
Bij de hormonen en specifiek in stedelijk rioolwater zou het normale uitscheidingspatroon bij de mens in de ratio 2:1:0,1 voor oestron : 17ß-oestradiol : 17α-ethinyloestradiol herkenbaar moeten zijn. In onderstaande figuur 4.1 is het oestrongehalte tegen het 17ß-oestradiol gehalte in oppervlaktewater en afvalwater uitgezet. Uit deze figuur blijkt dat het oestrongehalte doorgaans hoger is dan op basis van bovenstaande ratio mag worden verwacht. De reden hiervan in niet duidelijk, maar kan verband houden met het verschil in afbraaksnelheden van de verschillende componenten.

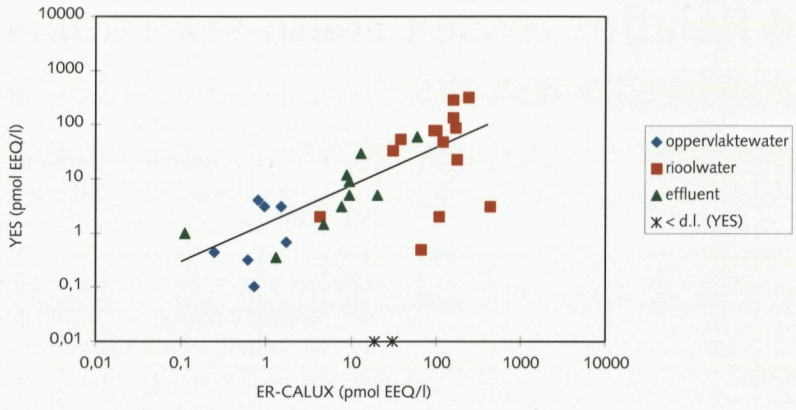
Tussen de overige verbindingen werden geen trends gevonden.

Figuur 4.1
Relatie tussen gehalte oestron en 17ß-oestradiol in oppervlaktewater en afvalwater.

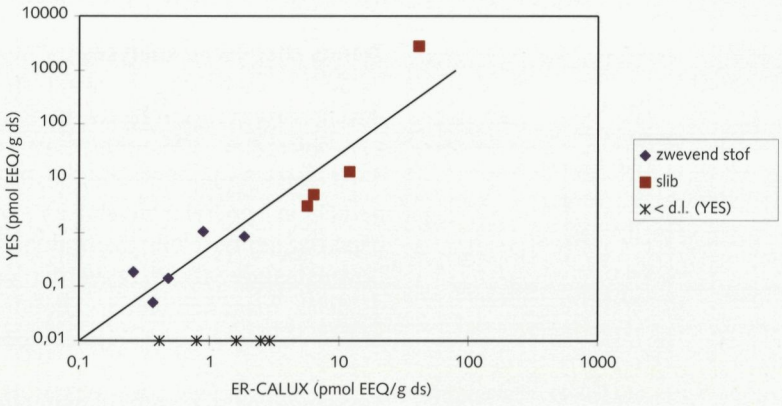


Trends *in vitro* assays
In onderstaande figuren 4.2 en 4.3 is de relatie tussen resultaten van ER-CALUX en YES-assay voor respectievelijk oppervlaktewater/afvalwater en de vaste matixmonsters (zwevend stof, riool-/zuiveringsslib) gegegeven. Zoals uit deze figuren blijkt is de correlatie tussen deze twee assays redelijk (r2 is respectievelijk 0,66 en 0,86), mits de resultaten van de YES-assay die onder de detectielimiet vallen buiten beschouwing worden gelaten. De correlatie tussen ER-CALUX en ER-bindingsassay ligt in dezelfde orde van grootte: voor de watermonsters en vaste matrixmonsters respectievelijk 0,79 en 0,56 (zie figuur 4.4 en 4.5).

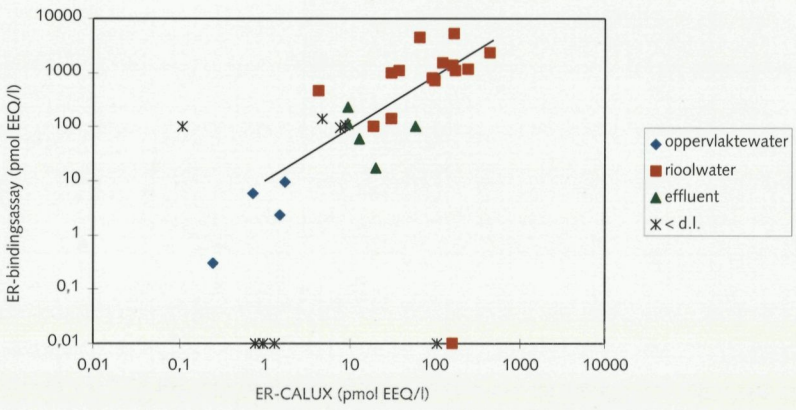
Figuur 4.2
Correlaties tussen ER-CALUX en YES-resultaten voor alle waterige monsters (r^2=0,66; waarbij de YES-monsters <d.l. niet zijn meegenomen).



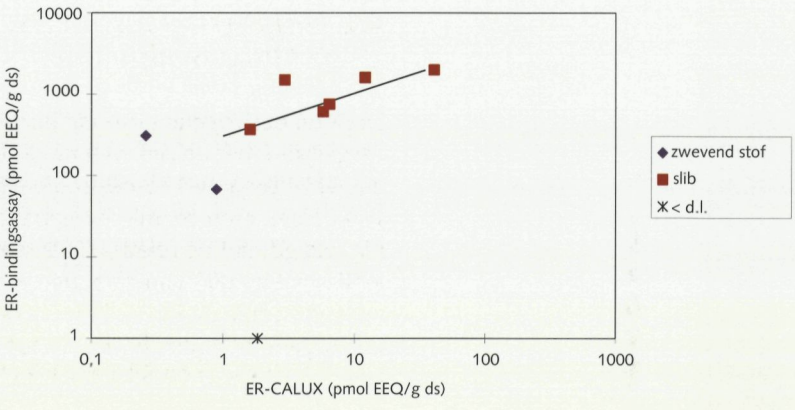
Figuur 4.3
Correlaties tussen ER-CALUX en YES-resultaten voor alle vaste monsters (r^2=0,86; waarbij de YES-monsters <d.l. niet zijn meegenomen).



Figuur 4.4
Correlaties tussen ER-CALUX en ER-bindingsassay-resultaten voor waterige monsters (r^2=0,79; waarbij de ER-bindings-assay-monsters <d.l. niet zijn meegenomen).

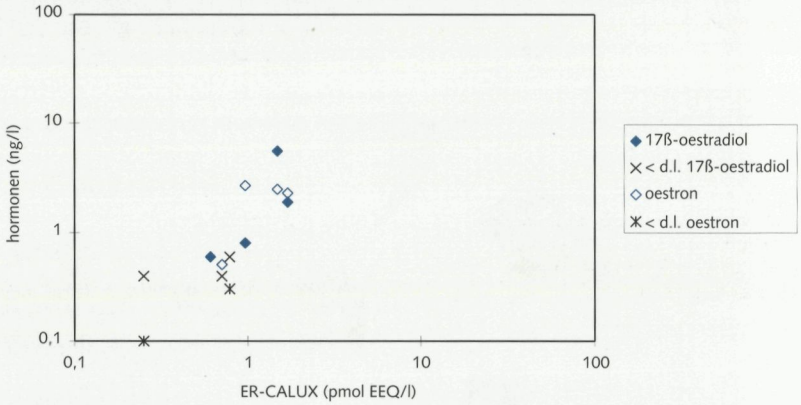


Figuur 4.5
Correlaties tussen ER-CALUX en ER-bindingsassay-resultaten voor vaste monsters (r^2=0,56; waarbij de ER-bindingsassay-monsters <d.l. niet zijn meegenomen).

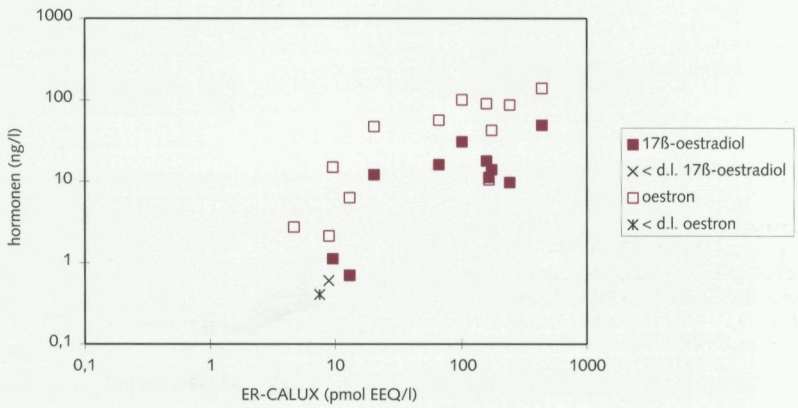


Trends tussen chemische analyses en *in vitro* assays
In oppervlaktewater werd een lineaire relatie gevonden tussen de gehalten van 17ß-oestradiol en oestron met de meetwaarden, die verkregen waren met de ER-CALUX assay (figuur 4.6). De correlaties met de twee andere *in vitro* assays vertoonden een te grote spreiding. In al dan niet gezuiverd stedelijk afvalwater afvalwater is geen relatie gevonden tussen de oestrogene potentie gemeten met ER-CALUX en de gehalten aan de hormonen 17ß-oestradiol en oestron.

Figuur 4.6
Oestrogene potentie gemeten met ER-CALUX versus concentratie van respectievelijk 17ß-oestradiol en oestron in oppervlaktewater (r^2 is respectievelijk 0,80 en 0,84 op log/log basis).



Figuur 4.7
Oestrogene potentie gemeten met ER-CALUX versus concentratie van respectievelijk 17ß-oestradiol en oestron in al dan niet gezuiverd stedelijk afwater (r^2 < 0,50).



Voor de overige gemeten chemische parameters en de meetwaarden verkregen met de *in vitro* assays zijn geen relaties aan te geven. Ook de correlatiecoëfficiënt r^2 van de log/log correlatie tussen de oestrogene potentie gemeten met ER-CALUX en het gehalte nonylfenol was slechts 0,45.

4.2 Vergelijking tussen de berekende en de gemeten oestrogene potentie

Door de oestrogene potentie gemeten met een *in vitro* bioassay te vergelijken met de oestrogene potentie (uitgedrukt in oestrogene equivalenten van 17ß-oestradiol, EEQ), die berekend wordt op basis van de gemeten chemische gehalten aan individuele stoffen vermenigvuldigd met de relatieve oestrogene potentie (oestrogene equivalentie factor, EEF) van elke afzonderlijke stof, kan verklaard worden welke bijdrage de individuele stoffen leveren aan de totale gemeten oestrogene potentie, of dat er nog een onverklaard deel aanwezig is (zie ook Belfroid, 1999b). Deze benadering is toegepast voor de data

verkregen in dit oriënterend onderzoek. De EEQs berekening is noodzakelijkerwijs uitsluitend gebaseerd op de in deze oriënterende studie gemeten stoffen de natuurlijke homonen (17ß-oestradiol, 17α-oestradiol, oestron), het synthetische hormoon 17α-ethinyloestradiol, bisfenol-A, ftalaten (DMP, DEP, DPP, DMPP, DBP, DCHP, DEHP en DNOP) en de gemeten alkylfenol(ethoxylaten). Monsters waarin 17ß-oestradiol niet is gemeten, zijn niet meegenomen in deze data analyse. Tevens zijn alle oppervlaktewatermonsters, waarin 17ß-oestradiol gehalten onder de detectielimiet bleven niet meegewogen. Dit laatste is gedaan omdat het gehalte weliswaar onder de 0,3 ng/l ligt, maar dan bijvoorbeeld 0,2 ng/l kan zijn en derhalve nog een flinke oestrogene potentie kan hebben. Omdat gebleken is dat deglucuronideren geen verandering in oestrogene potentie of specifieke stofgehalten oplevert zijn deze extracten meegenomen in de vergelijking. Ze zijn namelijk apart opgewerkt en gemeten zodat de vergelijking daardoor gebaseerd kan worden op meer monsters.
Tabel 4.1 toont per matrix in welke mate de respons verkregen uit de *in vitro* screeningsassays de berekende respons op basis van de chemische analyse kan verklaren, waarbij de *in vitro* assay respons op 100 % is gesteld. Een laag % betekent dat de berekende EEQ op basis van chemische analyseresultaten kleiner was dan wat de *in vitro* assay EEQ als meetrespons registreerde. Voor het zwevend stof in oppervlaktewater is deze vergelijking niet uitgevoerd, aangezien vrijwel geen meetgegevens van chemische analyses beschikbaar zijn.

Tabel 4.1
De gemeten oestrogene potentie, gemiddeld per matrix, en de mate waarin de respons, berekend op basis van de chemische analyseresultaten, deze gemeten respons van *in vitro* assays kan verklaren.

matrix	gemeten oestrogene potentie (gemiddelde/matrix) EEQ (pmol/l)			berekende oestrogene potentie (% van de chemie t.o.v. *in vitro* assays, die op 100 % zijn gesteld) (gemiddelde/matrix)		
	ER-CALUX	**YES**	**ER-bindings-assay**	**ER-CALUX**	**YES**	**ER-bindings-assay**
oppervlaktewater	0,69	1,97	< d.l.	602 ± 202	544 ± 520	159 en 886
rioolwater/influent	153	86	1.465	67 ± 46	127 ± 136*	10 ± 10
effluent	9,5	11,5	142	28 ± 27	76 ± 88	6 ± 4
riool-/zuiveringsslib	12	7,0	1.140	5.000 ± 6.000	14.000 ± 18.000	66 ± 72

* Bij deze berekening zijn 4 uitbijters, waarbij de YES assay een veel lagere respons had dan de ER-CALUX, niet meegenomen. Als deze uitbuiters niet worden verworpen, maar toch bij de berekening worden meegenomen, zou het percentage (on)verklaard met 2262 ± 5129 % veel hoger uitkomen.

Uit deze berekening blijkt dat in ruw rioolwater en effluenten van rwzi/awzi's de *in vitro* assays een hoger oestrogene potentie registreren dan op basis van de chemische analyses kan worden berekend. In ruw rioolwater kan bijna 70 % van de oestrogene potentie gemeten met de ER-CALUX verklaard worden door de berekende oestrogene potentie. In het effluent is dit slechts 20 % Dit geldt nog sterker bij de ER-bindingsassay. Daarentegen is bij de YES assay juist de berekende oestrogene potentie hoger dan de rechtstreeks gemeten potentie met behulp van deze *in vitro* assay. Hiervoor is vooralsnog geen verklaring.

Voor oppervlaktewater en riool-/zuiveringsslib geven de ER-CALUX en YES-assay een lager respons dan de berekende waarde op basis van de gemeten gehalten aan oestrogene stoffen. Mogelijke verklaring is dat de gemeten gehalten van bijvoorbeeld de hormonen in zowel oppervlaktewater als in riool-/zuiveringsslib dicht tegen de detectie-limiet van de hormoonanalyse liggen, waardoor de onzekerheid toe-neemt.

Op basis van dezelfde omrekening - vermenigvuldiging van de ge-meten gehalten aan individuele oestrogeen-actieve stoffen met de EEF's van deze afzonderlijke stoffen - is het ook mogelijk de relatieve bijdrage van deze oestrogeen-actieve stoffen aan de berekende totale oestrogene potentie van een mengsel (monster) uit te rekenen (Belfroid, 1999b). Voor de groep hormonen is deze relatieve bijdrage aan totale (berekende) oestrogene potentie berekend voor ruw rioolwater en effluenten van rwzi/awzi's ten opzichte van de in dit oriënterend onderzoek gemeten concentraties aan overige stoffen (bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol-(ethoxylaten). Deze relatieve bijdrage van de hormonen aan de bere-kende oestrogene potentie - d.i. het in tabel 4.1 verklaarde deel van de totale oestrogene respons met behulp van een *in vitro* assay - ligt in de orde van grootte van 90 %. Dit is volgens verwachting aangezien de EEF voor 17ß-oestradiol voor de verschillende *in vitro* op één is gesteld en de overige oestrogeen-actieve stoffen ten opzichte van 17ß-oestradiol een veel lagere relatieve oestrogene potentie bezitten.
Opgemerkt dient te worden dat het belang van deze relatieve bijdrage niet doorvertaald kan worden naar daadwerkelijke milieurisico's, aangezien nog geen informatie beschikbaar is over de realatie tussen een respons (affiniteit van een stof voor een oestrogeen-receptor) en een oestrogeen effect in een organisme. Ook is het waarschijnlijk dat diverse (xeno)-oestrogene stoffen zich verschillend in een organisme zullen gedragen en op verschillende manieren de hormoonhuishouding kunnen verstoren.

5 Conclusies en aanbevelingen

Deze oriënterende studie is in 1997/1998 uitgevoerd ter voorbereiding op het 'Landelijk Onderzoek oEstrogene stoffen' (LOES) naar het optreden van oestrogene effecten bij vispopulaties ten gevolge van de aanwezigheid van (xeno)-oestrogene stoffen in diverse aquatische compartimenten in Nederland. In het LOES-project, dat in 1999 is gestart, 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. Ook zal de oestrogene potentie in dezelfde milieumatrices door middel van *in vitro* en *in vivo* oestrogeniteitsassays worden vastgelegd. Daarnaast zullen bij in het veld verzamelde vissen oestrogene effecten en de mogelijke gevolgen voor de reproductie worden geïnventariseerd.
De conclusies en aanbevelingen, die voortkomen uit deze oriënterende studie, kunnen worden onderverdeeld naar enerzijds de logistiek en de bruikbaarheid van de toegepaste analysemethoden en anderzijds de aanwezigheid van de (xeno-)oestrogenen en oestrogene potentie in de diverse milieumatrices in Nederland. Het is echter belangrijk vooraf te constateren dat enkele van de in dit oriënterend onderzoek toegepaste analysemethoden voor de chemische parameters en *in vitro* screeningsassays recent ontwikkeld zijn en tijdens deze onderzoeksperiode aanvullende informatie beschikbaar is gekomen voor verdere optimalisering. Ook het aantal meetgegevens, waardoor een eerste indruk wordt verkregen van de aanwezigheid van deze (xeno-)oestrogene verbindingen en oestrogene potentie, is beperkt geweest.

5.1 Conclusies

5.1.1 Logistiek en bruikbaarheid analysemethoden

- Deze orienterende studie heeft geleerd dat een veldstudie waarbij verschillende matrices worden aangeleverd door verschillende instanties met verschillende tussenpersonen, en waarbij de voorbewerking maar ook de uiteindelijke analyse voor zeer uiteenlopende verbindingen en bioassays worden uitgevoerd door verschillende instituten, uiteindelijk resulteert in een complex project dat een goede voorbereiding behoeft. De studie heeft ons tevens geleerd dat in het multidisciplinaire kader waarin gewerkt is een zeer gedetailleerde voorbespreking van alle methoden wenselijk is en dit vast te leggen in gestandaardiseerde protocollen voor monstername, voorbewerking en analyse/bepalingsmethoden.
- De methode gebruikt voor de analyse van hormonen en bisfenol-A bleek geschikt voor de bepaling van deze verbindingen in oppervlaktewater en afvalwater, maar voor vaste matrix dient de methode verder geoptimaliseerd te worden. Ftalaten bleken voldoende gevoelig te kunnen worden geanalyseerd in zowel de opgeloste fractie als de vaste matrix. Ook alkylfenol(ethoxylaten) kunnen voldoende nauwkeurig worden geanalyseerd in beide fracties.
- De drie toegepaste *in vitro* screeningsassays bleken allen in staat om de oestrogene potentie in de opgeloste fractie en vaste matrix te detecteren. Echter uitgedrukt in oestrogene potentie, kunnen zij zeer uiteenlopende resultaten opleveren voor eenzelfde monster.

De ER-CALUX en YES assay geven over het algemeen een vergelijkbare respons; de ER-bindingsassay duidelijk hoger. Mogelijke verklaring hiervoor is dat in de ER-bindingsassay zowel agonisten als antagonisten op dezelfde wijze bijdragen aan een respons en verder is er geen natuurlijke barrière in de vorm van een celwand.
De bepaling van oestrogene potentie met behulp van ER-CALUX en YES assay vindt daarentegen wel plaats binnen de cel, waarbij de oestrogene respons van de ER-CALUX een resultante is van de agonisten en antagonisten.

- Analyses van verbindingen in gedifferentieerde matrices zoals afvalwater en slib kunnen worden gedaan in de waterfractie, in de vaste fractie (zwevend stof of slibdeeltjes) of in beiden. De keuze hangt in sterke mate af van de karakteristieken van de te bepalen verbinding alsmede van de (on)mogelijkheden van de analysemethode. In alle gevallen is een goede bepaling van de hoeveelheid van het vaste materiaal noodzakelijk.

5.1.2 Aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen en oestrogene potentie.

In onderstaande tabellen zijn de concentratie-ranges voor de gemeten (xeno)-oestrogene stoffen en de oestrogene potentie voor de *in vitro* assays per matrix gegeven.

Tabel 5.1
Concentratie-ranges van oestrogene hormonen (som van 17α- en 17ß-oestradiol, 17α-ethinyloestradiol, oestron), bisfenol-A, totaal ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) per matrix.

matrix	oestrogene hormonen	bisfenol-A	totaal ftalaten	AP+APE
oppervlaktewater (ng/l)	< d.l. - 9	< d.l. - 160	100 - 5.500	< d.l. - 140
zwevend stof (µg/g ds)	-	< d.l.	0,7 - 30	1 - 8
sediment (µg/g ds)	-	< d.l.	0,1 - 3	3,2 - 7,2
biota (µg/g ds)	-	-	6 - 15	< d.l.
rioolwater/influent (ng/l)	5 - 200	250 - >2.000	1.000 - 70.000	3.000 - 8,1 x 10^6
effluent (ng/l)	< d.l. - 70	20 - 400	500 - 7.000	870 - 23.700
riool-/zuiveringsslib (µg/g ds)	-	< d.l. - 0,27	2,3 - 250	0,7 - 4.000

Tabel 5.2
Oestrogene potenties gemeten met ER-CALUX, YES en ER-bindingsassay per matrix.

matrix	ER-CALUX	YES	ER-bindingsassay
oppervlaktewater (pmol EEQ/l)	0,25 - 1,7	< d.l. - 4	< d.l. - 9
zwevend stof (pmol EEQ/g ds)	0,2 - 2,5	< d.l. - 1	< d.l. - 300
sediment (pmol EEQ/g)	-	-	-
biota (pmol EEQ/g)	-	-	-
rioolwater/influent (pmol EEQ/l)	4 - 450	< d.l. - 300	< d.l. - 5.000
effluent (pmol EEQ/l)	0,1 - 60	0,3 - 60	< d.l. - 230
riool-/zuiveringsslib (pmol EEQ/g ds)	1,5 - 40	< d.l. - 2.750	350 - 2.000

Op basis van deze gemeten gehalten (xeno)-oestrogene stoffen en de oestrogene potenties kunnen (nog) geen uitspraken worden gedaan over de risico's van deze stoffen voor het Nederlands aquatisch milieu. Hiervoor is o.a. meer inzicht nodig in de relatie tussen de aanwezigheid van deze (xeno)-oestrogene stoffen en de optredende oestrogene effecten op (populaties van) dieren in deze watersystemen.

Oppervlaktewatersystemen

- In zoet, brak en zout oppervlaktewater zijn de natuurlijke oestrogene hormonen, het synthetische oestrogene hormoon en de potentiële xeno-oestrogene verbindingen bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) in een aantal gevallen aangetroffen.
  - De oestrogene hormonen worden vooral aangetroffen op locaties nabij stedelijke agglomeraties, maar niet in open wateren waar veel verdunning heeft kunnen optreden. De gemeten gehalten zijn laag, maar liggen op enkele locaties wel boven een bepaald effectnivo (d.i. de drempelwaarde van oestrogeengestuurde aanmaak van dooiereiwit/vitellogenine bij mannelijke regenboogforellen bij langdurige blootstelling). De hormonen 17ß-oestradiol en oestron werden het meest aangetroffen, terwijl de concentraties van 17α-oestradiol en 17α-ethinyloestradiol veelal onder de detectielimiet bleven. Uit de voorbehandeling met ß-glucuronidase is gebleken dat de hormonen vooral in de biologisch actieve vorm in oppervlaktewater aanwezig zijn.
  - Bisfenol-A werd in oppervlaktewater aangetroffen in concentraties tot 0,16 µg/l, maar werd niet gedetecteerd in zwevend stof en sediment. Ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) werden vooral in zwevend stof en sediment aangetroffen. De gehalten liepen hierbij op tot 27000 µg/kg DEHP en 8000 µg/kg nonylfenolethxylaten. In biota werden ftalaten aangetroffen, doch geen alkylfenol(ethoxylaten). Voor deze laatste groep verbindingen is de huidige detectielimiet in biota te hoog om bij de huidige concentraties in oppervlaktewater iets te kunnen meten.
  - De oestrogene potentie -gemeten met *in vitro* assays- in oppervlaktewater en zwevend stof verschillen sterk tussen de bemonsteringslocaties Lobith, Eijsden, Maassluis en Haringvlietsluizen, maar ook tussen de matrices. In oppervlaktewater is de oestrogene potentie over het algemeen laag (0,25-1,7 pmol EEQ/l voor ER-CALUX; waarden tot 4 pmol EEQ/l voor YES). Voor zwevend stof lag de oestrogene potentie tussen 0,2-2,5 pmol EEQ/g droge stof. De oestrogene potentie, gemeten met de ER-bindingsassay, is -indien deze boven de detectiegrens uitkwam- altijd veel hoger (tot 10 pmol EEQ/l voor waterige fractie en tot 300 pmol EEQ/g droge stof voor zwevend stof).

Afvalwater en riool-/zuiveringsslib

- In al dan niet gezuiverd stedelijk- of industrieel afvalwater zijn de natuurlijke oestrogene hormonen, het synthetische oestrogene hormoon, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) in een groot aantal gevallen aangetroffen.
  - De totale gehalten aan oestrogene hormonen in ruw rioolwater en influenten van rwzi's variëren van 5-200 ng/l, waarbij 17ß-oestradiol en oestron het grootste deel vormen. Het gehalte aan 17α-ethinyloestradiol lag onder de 10 ng/l. In het gezuiverde effluent ligt het totale gehalte oestrogene hormonen onder de 70 ng/l. Hormonenglucuroniden zijn niet aangetroffen.
    De geselecteerde hormonen bevinden zich bijna uitsluitend in de opgeloste fractie van het afvalwater.

Het gehalte aan hormonen is in stedelijk afvalwater beduidend hoger dan in industrieel afvalwater.
  * De gehalten aan bisfenol-A liggen in industrieel en stedelijk afvalwater in dezelfde orde van grootte (250-2000 ng/l). Na zuivering in een rwzi/awzi is de concentratie bisfenol-A gereduceerd tot 20-400 ng/l. Het gehalte bisfenol-A in het vaste residu na filtratie (0,45 µm) van ruw rioolwater bedraagt minder dan 5 %.
  * De twee meest voorkomende ftalaten in al dan niet gezuiverd afvalwater zijn DEP en DEHP, gevolgd door DMP en DBP. De gehalten DEP en DEHP bedroegen in ruw rioolwater tot 30 µg/l en waren na zuivering in rwzi/awzi gereduceerd tot minder dan 5 µg/l. De kleinste ftalaten DMP en DEP zijn voornamelijk opgelost; terwijl DEHP ook geadsor-beerd is aan de vaste matrix.
  * Het patroon van voorkomen van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten (APE) in afvalwater is grillig; doordat afwisselend deze verbindingen wel dan weer niet worden aangetroffen. De APE-gehalten bedraagt gemiddeld 55 µg/l voor ruw stedelijk rioolwater en 4 µg/l voor het effluent van een rwzi. De gehalten APE in industrieel afvalwater zijn vele malen hoger als in stedelijk rioolwater.
- In alle rwzi's is de oestrogene potentie in het effluent duidelijk lager dan die in het influent. Voor gefiltreerd stedelijk rioolwater ligt de oestrogene activiteit in de orde van grootte van 1-450 pmol EEQ/l voor de ER-CALUX en YES assay; d.i. equivalent met 0,3-120 ng/l 17ß-oestradiol. Voor de ER-bindingsassay liggen de aangetroffen waarden aanzienlijk hoger (<d.l.-5000 pmol EEQ/l). In een rwzi vindt er een aanzienlijke reductie plaats, hetgeen resulteert in waarden voor gefiltreerd biologisch gezuiverd effluent in de range 1-30 pmol EEQ/l voor de ER-CALUX en YES assay en voor de ER-bindingsassay 15-230 pmol EEQ/l. De oestrogene potentie van het gefiltreerde rioolwater vanaf industrieterreinen ligt met 5-120 pmol EEQ/l voor ER-CALUX, tot 75 pmol EEQ/l voor YES en tot 1500 pmol EEQ/l voor de ER-bindingsassay lager dan ongezuiverd stedelijk afvalwater.
- In riool-/zuiveringsslib werden voornamelijk ftalaten en alkylfenol-(ethoxylaten) aangetroffen. Ook werd in vrijwel alle slibmonsters oestrogene potentie gemeten. Hormonen bleven, op 1 uitzondering na, steeds onder de (hoge) detectielimiet, terwijl ook bisfenol-A in slechts enkele gevallen boven de (hoge) detectielimiet werd aangetroffen.

Trends
- De gehalten van hormonen en ftalaten in milieumatrices zijn vergelijkbaar met die in ons omringende landen. De gehalten van alkylfenol(ethoxylaten) zijn in Nederland over het algemeen lager dan in andere landen. Momenteel is er nog te weinig informatie beschikbaar om een dergelijke vergelijking ook voor de gemeten oestrogene potenties met de *in vitro* screeningsssays uit te voeren.
- De met ER-CALUX gemeten oestrogene activiteit in oppervlaktewater en afvalwater correleert redelijk met de gehalten van oestrogene hormonen in deze matrices.
- Op basis van de relatieve oestrogene potentie (EEF) - bepaald met de *in vitro* screeningsassays - van elk afzonderlijke (xeno)-oestrogene stof is berekend dat de totale (berekende) oestrogene potentie in al dan niet gezuiverd afvalwater voor een belangrijk deel wordt bepaald door de aanwezigheid van de oestrogene hormonen. Het resultaat van deze berekening is inherent aan de vastgestelde EEF's per (xeno)-oestrogene stof behorend bij een bepaalde *in vitro* screeningsassay.

- Bij vergelijking van de gemeten oestrogene potentie met een *in vitro* screeningassay en de berekende oestrogene potentie op basis van de aangetroffen gehalten aan de (xeno)-oestrogene stoffen hormonen, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten) vermenigvuldigd met de EEF's van deze stoffen, blijkt voor afvalwater dat de *in vitro* assays een hogere oestrogene potentie registreren dan op basis van de chemische parameters is berekend. Voor ruw rioolwater kan 70 % van de met de ER-CALUX gemeten oestrogene potentie verklaard worden; voor het effluent slechts 20 %. Voor oppervlaktewater en riool-/zuiveringsslib daarentegen zijn de gemeten oestrogene potenties vele orden van grootte lager dan de berekende waarden op basis van de aangetroffen concentratie-ranges van de gemeten (xeno)-oestrogene stoffen.

5.2 Aanbevelingen

- Vanwege het multidisciplinaire karakter, waarin dit onderzoek plaats vindt, wordt aanbevolen om in het LOES-project het gehele bemonstering/analyse traject zoveel mogelijk te laten plaatsvinden aan de hand van gestandaardiseerde protocollen voor o.a. de bemonstering, het transport en voorbewerking van de monsters en de analyse-/bepalingsmethoden.
- Aanbevolen wordt verder om hormonen en bisfenol-A alleen in de waterige fractie van de afvalwater- en oppervlaktewatermonsters te analyseren. Gehalten van hormonen in riool-/zuiveringsslib lagen vrijwel allen onder de detectielimiet, die hoog is voor deze matrix. Bovendien zijn hormonen hydrofiel, waardoor sterke binding aan rioolslib niet in de lijn van de verwachting ligt. Derhalve wordt aanbevolen om op basis van deze informatie hormonen in de vaste matrix niet meer in het vervolgonderzoek te betrekken.
- Aangezien de biologisch inactieve hormoonglucuroniden in de verschillende monstermatrices niet (meer dan) in detecteerbare hoeveelheden aanwezig waren kan het routinematig meten van deze verbindingen in het LOES-project achterwege blijven.
- Ftalaten kunnen het beste geanalyseerd worden met GC-MS/MS, tezamen met een gedeutereerde recovery standaard. Omdat de groep van ftalaten uiteenlopende fysisch-chemische eigenschappen heeft blijft het noodzakelijk om deze verbindingen in zowel de vaste matrix als de waterige fractie te bepalen. Het is niet duidelijk in hoeverre concentraties van vooral hydrofobe ftalaten variëren onder invloed van variërende suspensiedichtheden. De vaste matrix (residu) van influent en effluent zijn voor de ftalaatanalyses geëxtraheerd met dichloormethaan door middel van koude extractie. Deze methode is verder niet gevalideerd en mogelijk niet optimaal voor de extractie van deze sterk sorberende verbindingen.
  De verwachting is derhalve dat bij deze monsters een deel in de vaste matrix is blijven zitten. De hier opgegeven getallen geven dus een onderschatting van de werkelijke concentratie.
- Het verdient aanbeveling om na te gaan onder welke condities monsters bedoeld voor de analyse van ftalaten het beste kunnen worden opgeslagen.
- Het gedrag van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten APE's, opgelost in water of gebonden aan vaste deeltjes, is nog steeds onderwerp van discussie. Daardoor is niet duidelijk in hoeverre de geconstateerde gehalten in ruw rioolwater en effluent beïnvloed zijn door de hoeveelheid suspensiedeeltjes in deze matrix en in riool-/zuiveringsslib door het watergehalte.

Aanbevolen wordt daarom het gedrag van deze groep stoffen in een matrixproef nader te onder-zoeken om te kunnen vaststellen welk van de afzonderlijke matrices significant bijdraagt aan het totaatgehalte van APE's in dit water/-slib-monster. Deze studie zou kunnen worden gecombineerd met een vergelijkbare studie noodzakelijk voor ftalaten.

- Voor de APE-analyse wordt uit voorzorg om bacteriële afbraak tegen te gaan formaldehyde als conserveermiddel aan de water- en slibmonsters direct na monstername toegevoegd. Vergelijking met andere niet-geconserveerde monsters, waarin bijvoorbeeld de oestrogene potentie wordt bepaald, is niet goed meer mogelijk. Indien de bacteriële afbraak zonder formaldehyde als conserveermiddel niet significant is ten opzichte van koelen bij 4 °C en -18 °C, heeft koeling de voorkeur. Aanbevolen wordt beide conserveringsmethoden te vergelijken.
- Aangezien op basis van de aangetroffen lage gehalten aan alkylfenol-(ethoxylaten) in oppervlaktewater geen aantoonbare hoeveelheden in biota zijn te verwachten, is het niet zinvol om in het vervolg met de huidige detetectielimiet alkylfenol(ethoxylaten in biota te bepalen.
- Gelet op het onderscheidend vermogen in de oestrogene potentie van de ER-bindingsassay vergeleken met de ER-CALUX en YES-assay, wordt aanbevolen alleen de laatste twee als *in vitro* screeningsassays in het LOES-onderzoek mee te nemen. Tevens wordt aanbevolen om bij het maken van extracten van zwevend stof en andere vaste matrices de voorkeur te geven aan dichloormethaan/aceton in plaats van hexaan.
- Nader onderzoek is wenselijk naar de vraag of de oestrogene potentie kan worden verklaard op basis van de huidige set (xeno)-oestrogene stoffen (natuurlijke en synthetische oestrogene hormonen, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenol(ethoxylaten), of dat ook andere (groepen van) stoffen een aanzienlijke bijdrage kunnen leveren aan de oestrogene potentie. Door toepassing van 'Toxicity Identification Evaluation'(TIE) procedures met *in vitro*-gestuurde fractionering kunnen mogelijk de verantwoordelijke oestrogeen-actieve fracties of individuele stoffen worden geïdentificeerd.
- Nader onderzoek is nodig naar de effecten van de (gemeten) (xeno)-oestrogene stoffen op de aquatische organismen en de relatie tussen *in vitro* en *in vivo* oestrogeniteitsassays met de waargenomen effecten bij in wild levende populaties in het Nederlandse oppervlaktewater door het verrichten van veldstudies.

6 Referenties

Ahel M., T. Conrad and W. Giger (1987). Persistent organic chemicals in sewage effluents. 3) Determinations of nonylphenoxy carboxilic acids by high-resolution gas chomatography/mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. Environ. Sci. Technol. 21: 697-703.

Ahel M., J. McEvoy and W. Giger (1993). Bioaccumulation of the lipohilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. Environ. Poll. 79: 243-248.

Ahel, M., W. Giger and C. Schaffner (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. II. Occurrence and transformaton in rivers. Water Res. 28: 1131.

Aherne, G.W. and R. Briggs (1989). The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. J. Pharm. Pharmacol. 41: 735-736.

Allen, Y., P. Matthiessen, S. Haworth, J.E. Thain and S. Feist (1998). A survey of estrogenic activity in UK estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1783-1790.

Belfroid, A.C., A. van der Horst, A.D. Vethaak, A. Schäfer, G. Rijs and W.P. Cofino (1999a). Analysis of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. Sci. Total Environ. 225: 101-108.

Belfroid. A.C., A.G.M. van Hattum en J.H.N. Meerman (1999b). Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met *in vitro* bioassays. STOWA rapport 99/18 (in druk).

Bennie, D.T., C.A. Sullivan, H.B. Lee, T.E. Peart and R.J. Maguire (1997). Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes Basin and the Upper St. Lawrence River. Sci. Total Environ. 193: 2263-2275.

Blackburn, M.A. and M.J. Waldock (1995). Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. Wat. Res. 29: 1623-1629.

CEFAS (1998). Personal communication CEFAS (MAFF), Burnham-on-Crouch, UK.

Di Corcia A., R. Samperi and A. Marcomini (1994). Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromotography. Environ. Sci. Technol. 28: 850-858.

Desbrow, C., E. Routledge, D. Sheahan, M. Waldock and J. Sumpter (1997). The identification and assessment of oestrogenic substances in sewage treatment works effluents. MAFF report P2-i490/7, Bristol, UK.

Desbrow, C., E. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter and M. Waldock (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. Environ. Sci. Technol. 32: 1549–1558.

Dirksen, S., T.J. Boudewijn, L.K. Slager, R.G. Mes, M.J. van Schaick and P. de Voogt (1995). Reduced breeding succes of cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) in relation to persistent organochlorine pollution of aquatic habitats in The Netherlands. Environ. Pollut. 88: 119-132.

Fatoki, O.S. and F. Vernon (1990). Phthalate esters in rivers of the greater Manchester area, UK. Sci. Total Environ. 95: 227-232.

Furtmann, K. (1994). Phthalates in surface water - a method for routine trace level analysis. Fresenius J. Anal. Chem. 348: 291-296.

Gezondheidsraad (1997). Hormoonontregelaars en de humane voortplanting en ontwikkeling. Hormoonontregelaars in de mens. Rijswijk. Publ.nr. 1997/08.

Gezondheidsraad (1999). Hormoonontregelaars in ecosystemen. Rijswijk. Publ.nr. 1999/13.

Giger, W., P. Brunner and C. Schaffner (1984). 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites form nonionic surfactants. Science 225: 623.

Giger W., M. Ahel and M. Koch (1986). Das verhalten von alkylphenolpolyethoxylat-tensiden in der mechanisch-biologischen abwasserreinigung. Vom Wasser 67: 69-81.

Gillesby, B.E., R. Zarcharewski (1998). Exo-estrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. Environ. Toxicol. Chem. 17, 1: 3-14.

Harries, J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, J.P. Sumpter, T. Tylor and N. Zaman (1996). A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. Environ. Toxicol. Chem. 15: 1993-2002.

Howard, P.H. (1989). Handbook of environmental fate and exposure data. Vol 1. Lewis Publishers, Chelsea, MI.

James, H.A., M.J. Waldock, C. Kelly, A. Sutton and O. Franklin (1998). Unifying analytical methods for the determination of oestrone, oestradiol and ethinyloestradiol in water. CEFAS Report DWI 4445/1. Medmenham, UK.

Jobling, S., D.A. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, J.P. Sumpter (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 15: 194-202.

Jobling, S., C.R. Tyler, M. Nolan and J.P. Sumpter (1998). The identification of oestrogenic effects in wild fish. R&D Technical Report W119, Environment Agency, Bristol, UK.

Jürgens, M.D., A.C. Johnson and R.J. Williams (1998). The potential fate and behavior of steroid estrogens in UK. SETAC presentation, Bordeaux April 1998, France.

Kalbfus, W. (1995). Belastung bayerischer Gewässer durch synthetische Östrogene. Paper presented at 50. Fachtagung, Bayerisches Landesamt for Wasserwirtschaft, Insitut für Wasserforschung, München, 7/8 Nov. 1995.

Kubeck, E. and C.G. Naylor (1990). Trace analysis of alkylphenol ethoxylates. JAOCS 67: 400.

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

Murk, A.J., J. Legler, M.S. Denison, J.P. Giesy, C. Van de Guchte and A. Brouwer (1996). Chemical-activated luciferase gen expression (CALUX): A novel *in vitro* assay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. Fundam. Appl. Tox. 33: 149-160.

Musial, C.J., J.F. Uthe, G.R. Sirota, B. Garth Burs (1981). Di-n-hexyl Phthalate (DHP), a newly identified contaminant in atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) and atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). Can. J. Fish Aquat. Sci. Vol. 38: 856-859.

Naylor, C.G., J.P. Mieure, W.J. Adams, J.A. Weeks and F.J. Castaldi (1992). Alkylphenol ethoxylates in the environment. J. Am. Oil Chem. Soc. 69: 695-703.

Odum, J., S.Tittensor and J. Ashby (1998). Limitations of the MCF-7 cell proliferation assay for detecting xenobiotic oestrogens. Toxicology *in vitro* 12: 273-278.

Olmo, M. del, A. Gonzalez-Casado, N.A. Navas and J.L. Vilchez (1997). Determination of Bisphenol-A in water by gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chem. Acta 346: 87-92.

Parkman, H. and M. Remberger (1997). Phthalate esters in water and sediments in major cities and remote lakes in Sweden. Swedish Environmental Research Institute, Stockholm, report nr. 140965.

Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler and J.P. Sumpter (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem. Ecol. 8: 275–285.

Ritsema, R. (1987). Bepaling van ftalaatesters in oppervlaktewater, GWIO-87.006, RWS/Dienst Getijdewateren, 42 p.

Ritsema, R., W.P. Cofino, P.C.M. Frintrop, U.A.T. Brinkman (1989). Trace-level analysis of phthalate esters in surface water and suspended particulate matter by means of capillary gas chromatography with electron-capture and mass-selective detection. Chemosphere, Vol. 18: 2161-2175.

Routledge, E.J. and J.P. Sumpter (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ. Tox. Chem. 15: 241-248.

Routledge, E.J., D. Sheanan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock and J. Sumpter (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW Effluent 2. *In vivo* responses in trout and roach. Environ. Sci. Technol. 32, 1559-1565.

Sheanon, D.A., D. Bucke, P. Matthiessen, J.P. Sumpter, M.F. Kirby, P. Neall and M. Waldock (1994). The effects of low levels of 17α-ethynylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* held at two acclimation temperatures. *In* Muller,R and Lloyd, R (eds) *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*, pp. 99-112, Fishing News Books, Blackwell Science Ltd., Oxford, 371 pp.

Shore, L., M. Gurevitz and M. Shemesh (1993). Estrogen as an environmental pollutant. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 51: 361-366.

Staples, C.A., D.R. Peterson, T. F. Parkerton and W.J. Adams (1997). The environmental fate of phthalate esters: A Literature review. Chemosphere 35: 667-749.

Staples, C.A., P.B. Dorn, G.M. Klecka, S.T. O'Block and L.H. Harris (1998). A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. Chemosphere 36: 2149-2173.

Stumpf, M., T.A. Ternes, K. Haberer and W. Baumann (1996). Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fliessgewässern. Vom Wasser 87: 251-261.

Sumpter, J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for oestrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health Perspect. 103: (Suppl. 7):173-178.

Thiele, B., Günther, K. and M.J. Schwuger (1997). Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. Chem. Rev. 97: 3247-3272.

Vethaak, A.D., A. Opperhuizen (1996). Oestrogeen-actieve stoffen in het Nederlandse aquatische milieu: een verkennende studie. RIKZ, The Hague, The Netherlands. Report RIKZ 96.015, 73 pp.

Voogt, P. de, K. de Beer and F. van der Wielen (1997). Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples.Trends Anal. Chem. 16 (10): 584-595.

Zacharewski T. (1997). *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. Environ. Sci.Technol. 31, 3: 613-623.

Bijlage 1 Overzicht locaties en methode van bemonstering

Oppervlaktewatersystemen

Lobith

Lobith is het permanente grensmeetstation, dat gelegen is tussen de rivierkribben in de Rijn (kmr 862) om de kwaliteit van het binnenstromende Rijnwater te controleren. Het rivierwater vanuit de stroom op ca.1 meter onder het wateroppervlakte ingenomen. Via een transportleidingsysteem wordt het ingenomen rivierwater bemonsterd. Het debiet van de pompen en de doorsnede van de transportleidingen zijn zodanig gekozen dat de doorstoomsnelheid hoog is met als gevolg een zeer korte verblijftijd. Bij de monstername is zoveel mogelijk gebruik gemaakt van de RVS-transportleidingsysteem om contaminatie te voorkomen.
De watermonsters die zijn genomen voor dit onderzoek zijn op één moment in de tijd genomen (steekmonsters).
De zwevende stofmonsters zijn genomen met een doorstroomcentrifuge (volgens 913.00W005). De centrifuge bestaat uit een verticaal geplaatste koker, bekleed met teflon stroken, die met circa 15.000 rpm om zijn as draait. Van onder naar boven wordt in de centrifuge gedurende een aantal uren een continue waterstroom van circa 1000 l/u geleid. Door de centripetale kracht wordt het zwevend materiaal aan de kokerwand verzameld. Na afloop van de monsternameperiode wordt het verzamelde slib van de teflon stroken geschraapt en in een glazen pot overgebracht.

Eijsden

Het meetstation Eijsden controleert de kwaliteit van het binnenkomende rivierwater van de Maas (kmr 4). De monstername vindt op dezelfde manier plaats als bij het meetstation Lobith.

Maassluis

Monstername bij Maassluis heeft plaatsgevonden vanaf een meetvaartuig van de meetdienst van RWS directie Zuid-Holland tijdens ebstroomkentering (laagwater). Het monster wordt genomen met een dompelpomp, die circa 50-100 cm onder het wateroppervlak is gesitueerd met de inlaatopening zoveel mogelijk naar de stroomrichting. Het water wordt met een doorstroomsnelheid van 1,5 m/s naar een milieumeetcontainer gepompt, waar het vervolgens door middel van een mengbol homogeen wordt verdeeld.
De zwevende stofmonsters zijn genomen met een doorstroomcentrifuge die op het meetvaartuig staat.

Haringvlietsluizen

Indien de sluizen geopend zijn wordt de monstername bij ebstroomkentering (laagwater) uitgevoerd. Indien de sluizen gesloten zijn worden geen voorwaarden aan het tijdsstip van monstername gesteld.
De uitvoering vindt verder plaats zoals beschreven bij Maassluis.

Nieuwe Waterweg, Beneluxtunnel

Het betreft een lokatie die eerder in september 1996 en 1997 is gemonsterd in het kader van de RIKZ-Biomarker Veld Workshop.
De bemonstering van water is uitgevoerd met Niskinbottles op een diepte van ±1,5 meter.
Zwevend stof werd verzameld met behulp van een doorstroomcentrifuge: er werd direct na hoogwater gedurende 4 uur gecentrifugeerd. Sedimentbemonsteringen op ±8 meter gemeten vanaf wateroppervlak zijn uitgevoerd met een kleine van Veenhapper. In een gebied van 50 bij 50 meter werden willekeurig 5 monsters van elk 2 liter sediment genomen. Hiervan werd vervolgens een mengmonster gemaakt.

De bemonstering van bot is uitgevoerd met aalfuiken. Voor chemische bepalingen zijn per lokatie 25 vrouwelijke botlevers van de lengteklasse 20-30 cm verzameld en gepoold. De in glazen voorgespoelde potten verzamelde leverpools zijn bewaard bij <-20 °C in afwachting van het chemisch onderzoek.

Noordzeekanaal-IJmuiden
Water, sediment, zwevend stof en bot zijn bemonsterd in de nabijheid van de aanlegsteiger van de veerpont naar Velzen-Noord. Het betreft hier een brak tot zoute lokatie. De monsters zijn genomen zoals hierboven bij locatie Beneluxtunnel is beschreven. Sedimentmonsters zijn genomen op een diepte van ±5 meter. Vismonsters zijn betrokken uit aalfuiken van beroepsvissers die langs de kant op 2 m diepte waren opgesteld.

Noordzeekanaal-Amerikahaven
Deze lokatie is eerder in september 1996 en 1997 gemonsterd in het kader van de RIKZ-Biomarkers Veld Workshop. Alleen het sediment is bemonsterd. Deze monsters zijn aan de buitenkant van de haven op een diepte van ca. 10 meter genomen.

Kanaal Gent-Terneuzen
De bemonsteringslokatie ligt in het kanaal ongeveer 300 meter ten zuiden van de westsluis (zeesluis) van Terneuzen. Het kanaal is hier 18 meter diep. Op deze locatie zijn oppervlaktewater en sediment bemonsterd zoals hierboven bij locatie Beneluxtunnel is beschreven. Deze locatie is gekozen om te bekijken of er een relatie bestaat tussen het al dan niet voorkomen van een oestrogene potentie van dit aquatisch systeem en het geconstateerde slechte broedsucces van de visdief op het sluizencomplex bij Terneuzen in het jaar 1997/98.

Westerschelde-Terneuzen Boei 20
Dit betreft een locatie in de open Westerschelde van het RIKZ Joint Assessment Monitoring Programma. Op deze locatie werden oppervlaktewater, zwevend stof en mosselen bemonsterd. De mosselen (100 stuks) zijn verzameld aan de oostkant van de sluis. Van mosselen werd dezelfde dag na monstername het vlees verzameld en bij <-20 °C opgeslagen voor nadere chemische bepalingen. De overige monsters zijn genomen zoals hierboven bij locatie Beneluxtunnel is beschreven.

Westerschelde-Hansweert
Dit betreft een lokatie van het RIKZ Joint Assessment Monitoring Programma. Er is sediment bemonsterd op een diepte van ±18 meter. De botmonsters zijn genomen met een 3-meter boomkor en de mosselen zijn verzameld op de dijk ter hoogte van de radartoren.
De monsters zijn genomen en behandeld zoals hierboven bij locatie Beneluxtunnel is beschreven.

Waddenzee, Zeehavenkanaal Delfzijl
Er is bemonsterd bij de AKZO steiger. De monsters (oppervlaktewater en sediment) zijn genomen en behandeld zoals hierboven bij locatie Beneluxtunnel is beschreven. Sediment monsters zijn genomen op een diepte van ±12,5 meter. De waterbodem is hier plaatselijk verontreinigd, met name met HCB.

Oosterschelde-Oesterput
Sediment is bemonsterd op de slikplaat bij aflopend tij. De botmonsters zijn genomen met behulp van staande netten. De mosselen zijn op de

slikplaat verzameld. Alle monsters, incl. monsters van het oppervlaktewater, zijn behandeld zoals hierboven bij locatie Beneluxtunnel is beschreven.

Afvalwater en riool-/zuiveringsslib

Woonwijk Oostermeente (OOST)
Het huishoudelijk rioolwater is afkomstig van de woonwijk Oostermeente te Steenwijk. Dit huishoudelijk afvalwater wordt zonder bijmenging met regenwater via een gemaal naar de rwzi Steenwijk getransporteerd. Het aantal bewoners is volgens de gemeente 3360. De woonwijk Oostermeente is gebouwd aan het eind van de jaren zeventig en heeft een gemêleerde bevolking wat betreft gezinssamenstelling. In het verleden is deze woonwijk ook dikwijls meegenomen bij onderzoek naar huishoudelijk afvalwater van huishoudens.

Rwzi A'dam-Westpoort huishoudelijk (WEST)
De rwzi A'dam-Westpoort is een laagbelast actief-slibsysteem van het type 'aeratietank'. Het rioolstelsel in het afwateringsgebied bestaat voornamelijk uit een gescheiden stelsel. De rwzi heeft een ontwerpcapaciteit van 390.00 i.e., waarvan momenteel 80 % wordt benut. Slechts 5% van het aangevoerde rioolwater is van industriële oorsprong; het overige deel uit huishoudens.
De waterlijn bestaat uit vier voorbezinktanks, twee contacttanks, twee carrousels en zes nabezinktanks. De slibbelasting in de aeratietanks bedraagt doorgaans 0,05 kg BZV/kg d.s./dag. Het bij de zuivering van rioolwater vrijkomende primaire en secundaire zuiveringsslib wordt niet op dezelfde rwzi verder verwerkt, maar op een aparte slibbehandelingslocatie op het terrein van rwzi 'Oost' .

Rwzi Kralingseveer (KRAL)
De rwzi Kralingseveer is een laagbelast actief-slibsysteem van het type 'carroussel'. Het rioolwater wordt aangevoerd via een gemengd rioolstelsel. De rwzi is aangelegd in 1986 met een ontwerpcapaciteit van 301.500 i.e. Momenteel wordt deze ontwerpcapaciteit bijna volledig benut met een gemiddelde dagaanvoer van 83.000 m^3 per dag. Ongeveer 20 % van het aangevoerde rioolwater onder droogweeraanvoer (DWA)-omstandigheden is van industriële oorsprong; het overige deel uit huishoudens.
De waterlijn bestaat uit vier voorbezinktanks, twee contacttanks, twee carrousels en zes nabezinktanks. De slibbelasting in de aeratietanks bedraagt doorgaans 0,07 kg BZV/kg d.s./dag. De sliblijn bestaat uit een primaire- en secundaire slibindikker, twee parallelle slibgistingstanks, twee na-indikkers en drie zeefbandpersen.

Rwzi Eindhoven (EIND)
De rwzi Eindhoven is een actief-slibsysteem van het type 'aeratietank'. Het rioolwater wordt aangevoerd via een gemengd rioolstelsel. De rwzi is gebouwd in 1963, maar is door de jaren vele keren gerenoveerd en uitgebreid. Momenteel wordt circa driekwart van de bestaande ontwerpcapaciteit van 750.000 i.e. gebruikt. De dagaanvoer is gemiddeld 150.000 m^3 per dag. Ongeveer 30 % van het aangevoerde rioolwater onder DWA-omstandigheden is van industriële oorsprong; het overige deel is afkomstig uit huishoudens. De waterlijn van de rwzi bestaat uit drie grofvuilroosters, twee zandvangers, drie voorbezinktanks, vijf beluchtingstanks en vijftien nabezinktanks. De slibbelasting in de aeratietanks bedraagt doorgaans 0,15 kg BZV/kg d.s./dag.

Het bij de zuivering van rioolwater vrijkomende primaire en secundaire zuiveringsslib wordt niet op de rwzi Eindhoven verder verwerkt, maar op een aparte slibbehandelingslocatie.

AWZI A

AWZI A is een laagbelast actief-slibsysteem van het type 'aeratietank'. Het industrieel afvalwater wordt aangevoerd door middel van een gescheiden rioolstelsel afkomstig van een industriegebied. Dit industriegebied wordt gekenmerkt door op- en overslagactiviteiten, conservenindustrie, farmaceutische industrie en een polymerenfabriek. De awzi heeft een ontwerpcapaciteit van 72.000 i.e., waarvan momenteel 95 % wordt benut.
De waterlijn bestaat uit een zandvanger, een contacttank, een beluchtingstank en een nabezinktank. De slibbelasting in de beluchtingstank bedraagt doorgaans 0,02 kg BZV/kg d.s./dag. Het bij de zuivering vrijkomende spuislib wordt niet op deze locatie verwerkt.

AWZI B

AWZI B is een laagbelast actief-slibsysteem van het type 'aeratietank'. Het industrieel afvalwater wordt aangevoerd door middel van een gemengd rioolstelsel afkomstig van een industrieterrein. De droogweeraanvoer bedraagt circa 4500 m^3/uur. Het industrieterrein wordt gekenmerkt door een aantal chemische bedrijven. Deze bedrijven lozen een grote diversiteit aan stoffen, maar niet specifiek de in dit oriënterend onderzoek geselecteerde (xeno)-oestrogene stoffen. De awzi heeft een ontwerpcapaciteit van 1 miljoen i.e., waarvan momenteel 80 % wordt benut. Het aandeel huishoudelijk afvalwater ligt tussen de 2 en maximaal 5.
De waterlijn bestaat uit een voorbewerkingstap, waarin het drijvend en bezinkbaar materiaal wordt verwijderd, en vervolgens drie parallel bedreven zuiveringsstraten, bestaande uit een aeratietank met voor- of nadenitrificatie en twee nabezinktanks. De slibbelasting in de beluchtingstank bedraagt doorgaans 0,24 kg BZV/kg d.s./dag. Het bij de zuivering vrijkomende spuislib wordt ontwaterd met een zeefbandpers.

Afvalwater industrieterrein C (IND C)

Het afvalwater van het industrieterrein C wordt via geloosd op de bemonsterde pompput van het eindgemaal, dat vervolgens wordt afgevoerd naar een zuiveringsinstallatie. Het industrieterrein C wordt gekenmerkt door een aantal afvalstoffen verwerkende bedrijven, waarvan ook het al dan niet verontreinigde regenwater op het gemengd rioolstelsel wordt geloosd.

Afvalwater industrieterrein D (IND D)

Het industrieterrein D wordt gekenmerkt door een grote diversiteit van kleine industriële bedrijven op een bedrijfsterrein. Dit bedrijfsterrein wordt geacht representatief te zijn voor de talrijke soortgelijke terreinen die veelal aan de rand van steden liggen. Op basis van de verstrekte informatie over de op dit terrein aanwezige bedrijven, loost geen van de bedrijven één van de geselecteerde (xeno)-oestrogene stoffen. Het afvalwater wordt samen met al dan niet verontreinigd regenwater van de bedrijfsterreinen geloosd in een verzamelpompput, alvorens te worden afgevoerd naar een rwzi.

Bijlage 2 Meetgegevens oppervlaktewatersystemen
(oppervlaktewater, zwevend stof, sediment en biota)

Lobith

parameter	oppervlaktewater, steekmonster				zwevend stof, verzamelmonster	
datum bemonstering	**27-08-1997**		**11-11-1997**	**dec 1997**	**29-09-1997**	**11-11-1997**
debiet Rijn (m3/s)	1411		1253		1069	1253
watertemperatuur (°C)	24,3		11,4			
IVM						
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,6	(0,7)[1]	1,0 en 2,8[2]			
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1	(0,3)[1]	1,4 en 3,0[2]			
oestron (ng/l)	< 0,3	(0,7)[1]	1,7 en 2,9[2]			
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,3	(0,3)[1]	1,2 en 4,3[2]			
bisfenol A (ng/l)	28	(28)[1]	< 19[2]			
RIVM						
DMP (µg/l)				0,1		
DEP (µg/l)				< bg		
DBP µg/l)				0,4		
BBP (µg/l)				< bg		
DEHP (µg/l)				0,6		
DOP (µg/l)				< bg		
DPP (µg/l)				< bg		
DMPP (µg/l)				0,1		
DCHP (µg/l)				< bg		
UvA						
octylfenolethoxylaten (µg/l)						
nonylfenolethoxylaten (µg/l)						
octylfenol (µg/l)						
nonylfenol (µg/l)						
WU-Tox.						
ER-CALUX (pmol EEQ/l of /g ds)	0,79	(0,70)	1,72		0,37	0,48
YES (pmol EEQ/l of /g ds)	4	(4)	0,68		0,05	0,14
Vakgroep Mol. Tox.-VU						
ER-binding (pmol EEQ/l of /g ds)	0		9,4			
TAUW, RIZA, RIKZ						
pH	7,8		7,7			
O_2 (mg/l)	8,1		10,9			
TOC (mg/l)	4		3,5			
DOC (mg/l)	3		2,5			
Cl (mg/l)	135		165			
OC (%)					4,0	4,9
drogestof (%)					48	46
zwevend stof (mg/l)	65		18			
gloeirest (%)						
Cholinesteraseremmers (µg/l)	0,2		0,4			

[1] De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
[2] Deze meting is twee maal (replica) uitgevoerd.

Eijsden

parameter	oppervlaktewater, steekmonster					zwevend stof, verzamelmonster	
datum bemonstering	**26-08-1997**		**05-11-1997**	**9-12-1997**		**24-09-1997**	**05-11-1997**
debiet Maas (m3/s)	34		21			20	21
watertemperatuur (°C)	25,2		11,1				
IVM					opm[3]		
17β-oestradiol (ng/l)[2]	0,8	(0,9)[1]	5,5	0,6	0,7		
17α-oestradiol (ng/l)	0,3	(0,4)[1]	1,1	< 0,1	< 0,1		
oestron (ng/l)	2,7	(2,1)[1]	2,5	3,4	5,3		
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	0,4	(0,3)[1]	< 0,2	< 0,2	< 0,2		
bisfenol A (ng/l)[2]	37	(12)[1]	65	160	160		
RIVM							
DMP (µg/l)				0,2			
DEP (µg/l)				1,4			
DBP (µg/l)				0,5			
BBP (µg/l)				< bg			
DEHP (µg/l)				0,9			
DOP (µg/l)				< bg			
DPP (µg/l)				< bg			
DMPP (µg/l)				0,2			
DCHP (µg/l)				< bg			
UvA							
octylfenolethoxylaten (µg/l)							
nonylfenolethoxylaten (µg/l)							
octylfenol ((µg/l)							
nonylfenol (µg/l)							
WU-Tox.							
ER-CALUX (pmol EEQ/l of /g ds)	0,97	(0,91)	1,49			1,84	2,49
YES (pmol EEQ/l of /g ds)	3	(3)	3			0,84	0
Vakgroep Mol. Tox.-VU							
ER-binding (pmol EEQ/l of /g ds)	0		2,3			0	
TAUW, RIZA, RIKZ							
pH	7,5		7,4				
O_2 (mg/l)	4,8		8,0				
TOC (mg/l)	4		5				
DOC (mg/l)	3		4				
Cl (mg/l	52		44				
OC (%)						15,9	20,3
drogestof (%)						36	27
zwevend stof (mg/l)	6,2		8,5				
gloeirest (%)							
Cholinesteraseremmers (µg/l)	3,2		0,76				

[1] De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.

[2] De hormonen en bisfenol-A zijn tevens bepaald op 24/6. Dit monster is genomen in een plastic vat en enige maanden opgeslagen in de vriezer en wordt daarom als niet betrouwbaar gezien. Gehalten hierin waren < 0,4 nl/g 17β-oestradiol, < 0,1 ng/l 17α-oestradiol en 17α-ethinyloestradiol, < 0,2 ng/l oestron en 590 ng/l bisfenol-A.

[3] De getallen in deze kolom betreffen monsters die niet vooraf zijn gefiltreerd maar direct over disk zijn gebracht

Maassluis

parameter	oppervlaktewater, steekmonster			zwevend stof, verzamelmonster	
datum bemonstering	20-08-1997	03-11-1997	dec 1997	08-09-1997	03-11-1997
debiet Nieuwe Waterweg (m3/s)	1153	1239		686	1239
watertemperatuur (°C)	24,6	10,7			
IVM					
17β-oestradiol (ng/l)	0,6 (0,6)[1]	< 0,4[2]			
17α-oestradiol (ng/l)	0,2 (0,2)[1]	< 0,1[2]			
oestron (ng/l)	0,6 (0,8)[1]	< 0,1 en 1,0[2]			
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	0,3 (< 0,3)[1]	<0,2[2]			
bisfenol A (ng/l)	34 (39)[1]	38 en 49[2]			
RIVM					
DMP (µg/l)			0,3		
DEP (µg/l)			1,7		
DBP (µg/l)			0,5		
BBP (µg/l)			< bg		
DEHP (µg/l)			1,6		
DOP (µg/l)			< bg		
DPP (µg/l)			< bg		
DMPP (µg/l)			0,2		
DCHP (µg/l)			< bg		
UvA					
octylfenolethoxylaten (µg/l)					
nonylfenolethoxylaten (µg/l)					
octylfenol (µg/l)					
nonylfenol (µg/l)					
WU-Tox.					
ER-CALUX (pmol EEQ/l of /g ds)	0,61 (0,26)	0,72		0,26	0,41
YES (pmol EEQ/l of /g ds)	0,31 (0,27)	0,10		0,18	0
Vakgroep Mol. Tox.-VU					
ER-binding (pmol EEQ/l of /g ds)	< 16	5,8		302	
TAUW, RIZA, RIKZ					
pH	8,0	7,9			
O_2 (mg/l)	6,7	9,4			
TOC (mg/l)	3	3,5			
DOC (mg/l)	2	2,5			
Cl (mg/l)	1408	2300			
OC (%)				4,1	3,5
drogestof (%)				39	38
zwevend stof (mg/l)	39	17			
gloeirest (%)	56	75			
Cholinesteraseremmers (µg/l)	< 0,20				

[1] De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
[2] Deze meting is twee maal uitgevoerd (replica's).

Haringvlietsluizen

parameter	oppervlaktewater, steekmonster		zwevend stof, verzamelmonster	
datum bemonstering	**05-11-1997**	**dec 1997**	**12-09-1997**	**05-11-1997**
debiet Haringvliet (m3/s)				
watertemperatuur (°C)	10,1			
IVM				
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,4[1]			
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1[1]			
oestron (ng/l)	< 0,1[1]			
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	<0,2[1]			
bisfenol A (ng/l)	< 18 en 21[1]			
RIVM				
DMP (µg/l)		0,5		
DEP (µg/l)		2,6		
DBP (µg/l)		0,4		
BBP (µg/l)		< bg		
DEHP (µg/l)		1,9		
DOP (µg/l)		< bg		
DPP (µg/l)		< bg		
DMPP (µg/l)		0,2		
DCHP (µg/l)		< bg		
UvA				
octylfenolethoxylaten (µg/l)				
nonylfenolethoxylaten (µg/l)				
octylfenol (µg/l)				
nonylfenol (µg/l)				
WU-Tox.				
ER- CALUX (pmol EEQ/l of /g ds)	0,25		0,89	0,80
YES (pmol EEQ/l of /g ds)	0,43		1,06	0
Vakgroep Mol. Tox.-VU				
ER-binding (pmol EEQ/l of /g ds)	0,3		67	
TAUW, RIZA, RIKZ				
pH	8,7			
O_2 (mg/l)	10,2			
TOC (mg/l)	3,5			
DOC (mg/l)	2,5			
Cl (mg/l)	200			
OC (%)			8,7	7,5
drogestof (%)			27	31
zwevend stof (mg/l)	18			
gloeirest (%)	11			
Cholinesteraseremmers (µg/l)	0,15			

[1] Deze meting is twee maal uitgevoerd (replica's).

Nieuwe Waterweg - Beneluxtunnel

parameter datum bemonstering	oppervlaktewater steekmonster 02-10-1997	zwevend stof, verzamelmonster 23-09-1997	sediment mengmonster	botlever mengmonster
debiet (m^3/s)				
saliniteit (g/l)	2,3			
watertemperatuur (°C)	17,0			
IVM				
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,3			
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1			
oestron (ng/l)	0,3			
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,1			
bisfenol A (ng/l)	40	< 100 ng/g ds	< 68 ng/g ds	
DMP (µg/l)	< 0,02[1]	< 26	< 16	< 0,25 mg/kg ds
DEP (µg/l)	< 0,17[1]	40	33	0,66
DBP (µg/l)	< 0,28[1]	280	114	4,38
BBP (µg/l)	< 0,02[1]	705	56	1,73
DEHP (µg/l)	< 1,2[1]	10610	2866	8,04
DOP (µg/l)	< 0,02[1]	224	< 81	4,47
UvA				
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.[2]	0,3 ng/g ds		
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.	8100		
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.[2]		
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	395		
RIVO (op natgewicht)				
nonylfenolethoxylaten (µg/g)				< 0,15
nonylfenol (µg/g)				< 0,15
vetgehalte (g/kg)				203
TAUW, RIKZ, RIZA				
pH				
O_2 (mg/l)				
TOC (mg/l)				
DOC (mg/l)				
Cl (mg/l)		4,29	1,86	
OC (%)				
drogestof (%)				
zwevend stof (mg/l)				
gloeirest %				
Cholinesteraseremmers (µg/l)				

[1] Deze monsters zijn per abuis gefilterd over 0,45 en 1,2 µm glasfilters en geëxtraheerd met een SDB-XC disk. Bij de monsters zijn geen verdere voorzorgsmaatregelen ter voorkoming van achtergrondcontaminatie genomen. Op basis van een extra blancomonster is de detectielimiet in deze serie bepaald, die hoger ligt dan bij de andere monsters.

[2] Detectielimiet is ca. 0,10 µg/l NPE en 0,07 µg/l NP en varieert per monster. De detectielimiet voor OPE en OP in water is niet bepaald, aangezien monster geen signaal boven ruis bevatte. In sediment is de detectielimiet voor OPE 0,2 ng/g.

Noordzeekanaal - IJmuiden

parameter	oppervlaktewater, steekmonster		zwevende stof, verzamelmonster	sediment, mengmonster	botlever, mengmonster
datum bemonstering	**01-10-1997**	**14-10-1997**	**1-10-1997**		
debiet (m^3/s)					
saliniteit (g/l)	5,0				
watertemperatuur (°C)	16,0	15,1			
IVM					
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,3				
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1				
oestron (ng/l)	0,5				
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,1				
bisfenol A (ng/l)	9,9		< 250 ng/g ds	< 213 ng/g ds	
DMP (µg/l)	< 0,02[1]		58	< 22	<0,21 mg/kg ds
DEP (µg/l)	< 0,17[1]		< 50	< 22	0,31
DBP (µg/l)	< 0,28[1]		1488	< 22	1,64
BBP (µg/l)	< 0,02[1]		325	< 48	< 0,53
DEHP (µg/l)	< 1,2[1]		26640	106	2,15
DOP (µg/l)	< 0,02[1]		249	< 110	1,21
UvA					
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.[2]		< d.l.[2]	< d.l.[2]	
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.		1370 ng/g ds	2600 ng/g ds	
octylfenol (µg/l)	< d.l.		< d.l.[2]	< d.l.[2]	
nonylfenol (µg/l)	< d.l.		620	630	
RIVO (op natgewicht)					
nonylfenolethoxylaten (µg/g)					< 0,15
nonylfenol (µg/g)					< 0,15
vetgehalte (g/kg)					265
TAUW, RIZA, RIKZ					
pH		8,10			
O_2 (mg/l)		7,70			
TOC (mg/l)		7,0			
DOC (mg/l)		6,0			
Cl (mg/l)	2753	4009			
OC (%)			17,3	3,18	
drogestof (%)				76	
zwevend stof (mg/l)		7,7			
gloeirest %					
Cholinesteraseremmers (µg/l)		0,21			

[1] Deze monsters zijn per abuis gefilterd over 0,45 en 1,2 µm glasfilters en geëxtraheerd met een SDB-XC disk. Bij de monsters zijn geen verdere voorzorgsmaatregelen ter voorkoming van achtergrondcontaminatie genomen. Op basis van een extra blancomonster is de detectielimiet in deze serie bepaald, die hoger ligt dan bij de andere monsters.

[2] Detectielimiet is ca. 0,10 µg/l NPE en 0,07 µg/l NP en varieert per monster. De detectielimiet voor OPE en OP is niet bepaald, aangezien monster geen signaal boven ruis bevatte.

Zeehavenkanaal - Delfzijl

parameter	oppervlaktewater, steekmonster	oppervlaktewater, steekmonster
datum bemonstering	**14-10-1997**	
debiet (m^3/s)	9,5	
saliniteit (g/l)	16,7	
watertemperatuur (°C)	13	
IVM		
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,3	
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1	
oestron (ng/l)	0,5	
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,1	
bisfenol A (ng/l)	23	
DMP (µg/l)	0,11	
DEP (µg/l)	< 0,005	
DBP (µg/l)	< 0,05	
BBP (µg/l)	< 0,06	
DEHP (µg/l)	0,61	
DOP (µg/l)	< 0,01	
UvA		
octylfenolethoxylaten (µg/l)		
nonylfenolethoxylaten (µg/l)		
octylfenol (µg/l)		
nonylfenol (µg/l)		
RIVO (op natgewicht)		
nonylfenolethoxylaten (µg/g)		
nonylfenol (µg/g)		
vetgehalte (g/kg)		
TAUW, RIZA, RIKZ		
pH		
O_2 (mg/l)	8,0	
TOC (mg/l)	8,3	
DOC (mg/l)		
Cl (mg/l)	9500	
OC (%)		
drogestof (%)		
zwevend stof (mg/l)		
gloeirest %		
Cholinesteraseremmers (µg/l)		

Westerschelde - Hansweert

parameter	oppervlaktewater, steekmonster	oppervlaktewater, steekmonster
datum bemonstering	**23-09-1997**	**22-09-1997**
debiet Schelde (m^3/s)	146	
saliniteit (g/l)	22,1	23,2
watertemperatuur (°C)	17,0	17,0
IVM		
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,3	
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1	
oestron (ng/l)	< 0,2	
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,1	
bisfenol A (ng/l)	4,3	
DMP (µg/l)		
DEP (µg/l)		
DBP (µg/l)		
BBP (µg/l)		
DEHP (µg/l)		
DOP (µg/l)		
UvA		
octylfenolethoxylaten (µg/l)		
nonylfenolethoxylaten (µg/l)		
octylfenol (µg/l)		
nonylfenol (µg/l)		
RIVO (op natgewicht)		
nonylfenolethoxylaten (µg/g)		
nonylfenol (µg/g)		
vetgehalte (g/kg)		
TAUW, RIZA, RIKZ		
pH		7,81
O_2 (mg/l)		6,48
TOC (mg/l)		
DOC (mg/l)		2,96
Cl (mg/l)	12.600	
OC (%)		
drogestof (%)		
zwevend stof (mg/l)		71,0
gloeirest (%)		
Cholinesteraseremmers (µg/l)		

Westerschelde - Terneuzen Boei 20

parameter	oppervlaktewater steekmonster	zwevende stof verzamelmonster	mossel mengmonster
datum bemonstering	**24-09-1997**	**23-09-1997**	
debiet Schelde (m^3/s)	166		
saliniteit (g/l)	28,2		
watertemperatuur (°C)	17,0		
IVM			
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,3		
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1		
oestron (ng/l)	< 0,2		
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,1		
bisfenol A (ng/l)	3,5	< 70 ng/g ds	
DMP		22	<0,03 mg/kg ds
DEP		22	0,058
DBP		98	0,19
BBP		< 49	< 0,08
DEHP		586	< 0,2
DOP		< 112	< 0,03
UvA			
octylfenolethoxylaten		< d.l.[2]	
nonylfenolethoxylaten		705 ng/g ds	
octylfenol		< d.l.[2]	
nonylfenol		210	
RIVO (op natgewicht)			
nonylfenolethoxylaten (µg/g)			< 0,15
nonylfenol (µg/g)			< 0,15
vetgehalte (g/kg)			14
TAUW, RIZA, RIKZ			
pH			
O_2 (mg/l)			
TOC (mg/l)			
DOC (mg/l)			
Cl (mg/l)	16.000		
OC (%)		1,72	
drogestof (%)			
zwevend stof (mg/l)			
gloeirest (%)			
Cholinesteraseremmers (µg/l)			

Kanaal Gent - Terneuzen

parameter	oppervlaktewater steekmonster	sediment mengmonster
datum bemonstering	**24-09-1997**	
debiet (m^3/s)	20	
saliniteit (g/l)	8,6	
watertemperatuur (°C)	18	
IVM		
17β-oestradiol (ng/l)	0,3	
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1	
oestron (ng/l)	0,6	
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,1	
bisfenol A (ng/l)	3,8	< 50 ng/g ds
DMP (µg/l)	< 0,02[1]	< 11
DEP (µg/l)	< 0,17[1]	< 11
DBP(µg/l)	< 0,28[1]	18
BBP (µg/l)	< 0,03[1]	< 25
DEHP (µg/l)	< 1,2[1]	158
DOP (µg/l)	< 0,02[1]	< 56
UvA		
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.[2]	< d.l.[2]
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	0,14	2980 ng/g ds
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.[2]
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	1670
RIVO (op natgewicht)		
nonylfenolethoxylaten (µg/g)		
nonylfenol (µg/g)		
vetgehalte (g/kg)		
TAUW, RIKZ, RIZA		
pH		
O_2 (mg/l)		
TOC (mg/l)		
DOC (mg/l)		
Cl (mg/l)	4.200	
OC (%)		1,73
drogestof (%)		40
zwevend stof (mg/l)		
gloeirest (%)		
Cholinesteraseremmers (µg/l)		

[1] Deze monsters zijn per abuis gefilterd over 0,45 en 1,2 µm glasfilters en geëxtraheerd met een SDB-XC disk. Bij de monsters zijn geen verdere voorzorgsmaatregelen ter voorkoming van achtergrondcontaminatie genomen. Op basis van een extra blancomonster is de detectielimiet in deze serie bepaald, die hoger ligt dan bij de andere monsters.

[2] Detectielimiet is ca. 0,10 µg/l NPE en 0,07 µg/l NP en varieert per monster. De detectielimiet voor OPE en OP is niet bepaald, aangezien monster geen signaal boven ruis bevatte.

Oosterschelde - Oesterput

parameter	oppervlaktewater steekmonster	botlever mengmonster
datum bemonstering	**13-10-1997**	
debiet		
saliniteit (g/l)	31,0	
watertemperatuur (°C)	17,0	
IVM		
17β-oestradiol (ng/l)	< 0,3	
17α-oestradiol (ng/l)	< 0,1	
oestron (ng/l)	< 0,2	
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,1	
bisfenol A (ng/l)	3,7	
DMP (µg/l)	0,07	< 0,33 mg/kg ds
DEP (µg/l)	< 0,005	0,41
DBP (µg/l)	< 0,05	1,70
BBP (µg/l)	< 0,06	< 0,83
DEHP (µg/l)	0,04	< 2,15
DOP (µg/l)	< 0,01	3,86
UvA		
octylfenolethoxylaten (µg/l)		
nonylfenolethoxylaten (µg/l)		
octylfenol (µg/l)		
nonylfenol (µg/l)		
RIVO (op natgewicht)		
nonylfenolethoxylaten (µg/g)		< 0,15
nonylfenol (µg/g)		< 0,15
vetgehalte (g/kg)		149
TAUW, RIZA, RIKZ		
pH		
O_2 (mg/l)		
TOC (mg/l)		
DOC (mg/l)		
Cl (mg/l)	17.158	
OC (%)		
drogestof (%)		
zwevend stof (mg/l)		
gloeirest (%)		
Cholinesteraseremmers (µg/l)		

Noordzeekanaal - Amerikahaven

parameter	sediment mengmonster
datum bemonstering	**4 -9-1997**
debiet (m^3/s)	
saliniteit (g/l)	
watertemperatuur (°C)	
IVM	
17β-oestradiol (ng/l)	
17α-oestradiol (ng/l)	
oestron (ng/l)	
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	
bisfenol A (ng/l)	
DMP (µg/l)	
DEP (µg/l)	
DBP (µg/l)	
BBP (µg/l)	
DEHP (µg/l)	
DOP (µg/l)	
UvA	
octylfenolethoxylaten (ng/g d.s.)	< d.l.[1]
nonylfenolethoxylaten	5720
octylfenol	< d.l.[1]
nonylfenol	1520
RIVO (op natgewicht)	
nonylfenolethoxylaten (µg/g)	
nonylfenol (µg/g)	
vetgehalte (g/kg)	
TAUW, RIZA, RIKZ	
pH	
O_2 (mg/l)	
TOC (mg/l)	
DOC (mg/l)	
Cl (mg/l)	
OC (%)	
drogestof (%)	84
zwevend stof (mg/l)	
gloeirest (%)	
Cholinesteraseremmers (µg/l)	

[1] Detectielimiet is ca. 0,10 µg/l NPE en 0,07 µg/l NP en varieert per monster. De detectielimiet voor OPE en OP is niet bepaald, aangezien monster geen signaal boven ruis bevatte.

Bijlage 3 Meetgegevens afvalwater en riool-/ zuiveringsslib

Woonwijk Oostermeente

parameter	samengesteld steekmonster van rioolwater		samengesteld steekmonster van rioolslib	
datum bemonstering	**08-10-1997**	**18-12-1997**	**08-10-1997**	**18-12-1997**
debiet (8-15 uur) (m^3)	270	105		
dagdebiet (m^3)				
temperatuur water (°C)	17,8	17,5		
neerslag (8-15 uur) (mm)	0	0		
IVM				
17β-oestradiol (ng/l)	16 (16)[1]	18 + <0,25[4]	4,3 ng/g ds	
17α-oestradiol (ng/l)	2,0 (2,6)[1]	1,2 + <0,25[4]	<0,4	
oestron (ng/l)	56 (14)[1]	89 + <1,3[4]	<2,1	
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	3,1 (3,1)[1]	<0,2 + <2,1[4]	<3,4	
bisfenol A (ng/l)	260 (260)[1]	490 + 26[4]	46	
DMP (µg/l)	3,9 + <0,02[4]		<0,06 µg/g ds	
DEP (µg/l)	25 + 0,41[4]		0,47	
DBP (µg/l)	2,6 + 2,1[4]		2,9	
BBP (µg/l)	0,95 + 1,4[4]		0,26	
DEHP (µg/l)	8,2 + <0,02[4]		2,7	
DOP (µg/l)	<0,2 + <0,02[4]		<0,29	
RIVM				
DMP (µg/l)		4,6		
DEP (µg/l)		30,4		
DPP (µg/l)		< d.l.		
DMPP (µg/l)		2,9		
DBP (µg/l)		5,6		
BBP (µg/l)		1,3		
DCHP (µg/l)		< d.l.		
DEHP (µg/l)		27,2		
DNOP (µg/l)		0,4		
UvA				
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.	27	< d.l.	
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	30	100	16 µg/g ds	
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.	< d.l.	
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	23	< d.l.	
WU-Tox.				
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	66 (271)[1]	160		
YES (pmol EEQ/l)	0,5 (3)[1]	287		
Vakgroep Mol. Tox.-VU				
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	4370 (3170)[1]	< d.l.		
TAUW[6]				
BZV (mg/l)	335 (265)	365		
CZV (mg/l)	925 (1350)	554 (621)		
NH_4 (mg/l)	69 (66)	77		
NKj (mg/l)	96 (97)	88		
NO_2 (mg/l)	0,03 (0,03)	<0,02		
NO_3 (mg/l)	<0,05	<0,05		
zwevend stof (mg/l)	290 (110)	490 (540)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	1100 (1100)	900 (1000)	80	
drogestof (%)			2,29 (2,1)[7]	
gloeirest (%)			21	

1 De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
2 Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
3 Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
4 Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
5 Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
6 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
7 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.

Rwzi A'dam-Westpoort (huishoudelijk)

parameter	samengesteld steekmonster van influent		samengesteld steekmonster van effluent		zuiveringsslib (samengesteld van primair- en secundair slib)	
datum bemonstering	**15-10-1997**	**01-12-1997**	**15-10-1997**	**01-12-1997**	**15-10-1997**	**01-12-1997**
debiet (8-15 uur) (m^3)	10130	9620				
dagdebiet (m^3)	40660	37250	32230			
temperatuur water (°C)	17,9	155				
neerslag (8-15 uur) (mm)	0,5	0				
IVM						
17β-oestradiol (ng/l)	9,5 (10)[1]	48 + <0,3[4]	<0,6 (<0,6)[1]	12,0		<1,4 ng/g ds
17α-oestradiol (ng/l)	1,3 (0,9)[1]	9 + <0,3[4]	<0,1 (<0,1)[1]	5,0		<1,4
oestron (ng/l)	87 (200)[1]	140 + <1,4[4]	2,1 (2,2)[1]	47		<7,2
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	1,3 (1,5)[1]	9,7 + <2,3[4]	<0,3 (0,5)[1]	7,5		<12
bisfenol A (ng/l)	250 (270)[1]	690 + 32[4]	33	130		<124
DMP (µg/l)	2,2 + <0,02[4]	2,3 + <0,03[4]	5[5]	0,05 + <0,03[4]	0,43 µg/g ds	0,16 µg/g ds
DEP (µg/l)	8,7 + 0,07[4]	13 + 0,09[4]	<0,14[5]	0,01 + <0,03[4]	<0,43	0,73
DBP (µg/l)	6,0 + 4,4[4]	1,7 + 0,82[4]	4,6[5]	<0,09 + 0,13[4]	0,83	4,1
BBP (µg/l)	0,76 + 0,30[4]	1,6 + 0,79[4]	<0,06[5]	0,07 + <0,03[4]	<0,94	1,0
DEHP (µg/l)	1,8 + <0,02[4]	1,1 + 1,8[4]	<0,12[5]	<0,34 + 0,47[4]	54	98
DOP (µg/l)	<0,2 + <0,02[4]	<0,2 + <0,03[4]	<0,01[5]	<0,20+ <0,03[4]	2,2	<0,76
RIVM						
DMP (µg/l)		2,4		0,2		
DEP (µg/l)		17,1		1,8		
DPP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DMPP (µg/l)		3,2		0,3		
DBP (µg/l)		3,3		2,1		
BBP (µg/l)		2,0		< d.l.		
DCHP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DEHP (µg/l)		24,6		1,0		
DNOP (µg/l)		0,3		< d.l.		
UvA						
octylfenolethoxylaten (µg/l)	13	0,9	< d.l.	0,5	< d.l.	16
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	29	7	3	< d.l.	0,68 µg/g ds	2390 µg/g ds
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.	< d.l.	< d.l.	< d.l.	< d.l.
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	0,9	< d.l.	0,8	< d.l.	65
WU-Tox.						
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	245 (334)[1]	441	8,9 (9,8)[1]	20,5		5,7 pmol/g ds
YES (pmol EEQ/l)	317 (261)[1]	3	12 (13)[1]	5		3
Vakgroep Mol. Tox.-VU						
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	1130 (1840)[1]	2360	<110	17,4		610 pmol/g ds
TAUW[6]						
BZV (mg/l)	195 (195)	355	3 (2)	15		
CZV (mg/l)	518 (618)	477 (636)	26 (25)	26 (23)		
NH_4 (mg/l)	48 (46)	59	5,3 (2,5)	1,6 (0,8)		
NKj (mg/l)	54 (61)	73	5,9 (3,4)	2,5		
NO_2 (mg/l)	0,03 (0,03)	<0,02	0,22 (0,18)	0,22		
NO_3 (mg/l)	<0,05	<0,05	5,0 (7,0)	5,2		
zwevend stof (mg/l)	160 (220)	190 (290)	<10 (<10)	10 (10)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	310 (340)	600 (550)	650 (650)	700 (700)	500	180
drogestof (%)					0,19 (0,4)[7]	0,45 (0,6)[7]
gloeirest (%)					37	31

1 De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
2 Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
3 Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
4 Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
5 Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
6 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
7 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.

Rwzi Kralingseveer

parameter	samengesteld steekmonster van influent		samengesteld steekmonster van effluent		zuiveringsslib (samengesteld van primair- en secundair slib)	
datum bemonstering	01-10-1997	03-12-1997	01-10-1997	03-12-1997	01-10-1997	03-12-1997
debiet (8-15 uur) (m^3)	26110	16880				
dagdebiet (m^3)	72840	82470	72840	82470	prim. 232 sec. 336	
temperatuur water (°C)	20,3	14,1				
neerslag (8-15 uur) (mm)	1	0				
IVM						
17β-oestradiol (ng/l)	n.a.[3]	31	n.a.[3]	0,7		<2 ng/g ds
17α-oestradiol (ng/l)	<1,3 (<1,3)[1]	8	<1,7 (<1,3)[1]	1,2		<2
oestron (ng/l)	18 (30)[1]	100	<0,4 (1)[1]	6,3		<10
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	<1,4 (<1,4)[1]	8,8	<1,8 (<1,4)[1]	<0,2		<16
bisfenol A (ng/l)	240	1000	33	320		210
DMP (µg/l)	0,04 + <0,05[4]	1,2 + <0,02[4]	9[5]	<0,01 + 0,03[4]	<0,03 µg/gds	<0,15 µg/g ds
DEP (µg/l)	0,08 + <0,04[4]	6,6 + 0,17[4]	5[5]	<0,01 + 0,04[4]	<0,03	0,6
DBP (µg/l)	<0,09 + 0,19[4]	1,1 + 1,0[4]	0,2[5]	<0,09 + 0,07[4]	0,69	4,2
BBP (µg/l)	<0,04 + <0,16[4]	0,71 + 0,69[4]	0,4[5]	<0,04 + <0,09[4]	<0,06	2,3
DEHP (µg/l)	<0,34 + 0,76[4]	8,0 + <0,02[4]	<0,12[5]	0,42 + 0,04[4]	1,6	48
DOP (µg/l)	<0,20 + <0,05[4]	<0,20 + <0,02[4]	<0,01[5]	<0,20 + <0,03[4]	<0,13	2,1
RIVM						
DMP (µg/l)		1,1		0,2		
DEP (µg/l)		8,7		1,0		
DPP (µg/l)		0,1		< d.l.		
DMPP (µg/l)		1,7		0,3		
DBP (µg/l)		1,8		0,8		
BBP (µg/l)		0,7		< d.l.		
DCHP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DEHP (µg/l)		8,7		2,9		
DNOP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
UvA						
octylethoxylaten (µg/l)	< d.l.	0,4	< d.l.	1,3	< d.l.	< d.l.
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	6,8	2,1	3,4	2,4	60 µg/g ds	780 µg/g ds
octylfenol (µg/l)	< d.l.	0,07	< d.l.	0,18	< d.l.	< d.l.
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	0,6	< d.l.	1,0	< d.l.	65
WU-Tox.						
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	160 (193)[1]	101	7,6 (6,5)[1]	12,9		2,9 pmol/g ds
YES (pmol EEQ/l)	134 (123)[1]	76	3 (14)[1]	29		<0
Vakgroep Mol. Tox.-VU						
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	1370 (730)[1]	727	<99 (36)[1]	58		1500 pmol/g ds
TAUW[6]						
BZV (mg/l)	170 (160)	125	4 (4)	1		
CZV (mg/l)	429 (350)	382 (717)	34 (36)	39 (44)		
NH_4 (mg/l)	38 (36)	32	0,85 (0,85)	0,35 (0,35)		
NKj (mg/l)	47 (41)	44	2,0 (2,3)	1,7		
NO_2 (mg/l)	0,03 (0,02)	<0,02	1,7 (1,5)	0,3		
NO_3 (mg/l)	<0,05	<0,05	7,9 (8,2)	8,9		
zwevend stof (mg/l)	160 (120)	130 (300)	10 (15)	10 (20)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	550 (470)	450 (440)	650 (650)	480 (490)	46	60
drogestof (%)					2,18 (3)[7]	1,36 (1,4)[7]
gloeirest (%)					27	30

1 De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
2 Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
3 Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
4 Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
5 Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
6 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
7 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.

Rwzi Eindhoven

parameter	samengesteld steekmonster van influent		samengesteld steekmonster van effluent		zuiveringsslib (samengesteld van primair- en secundair slib)	
datum bemonstering	**30-09-1997**	**04-12-1997**	**30-09-1997**	**04-12-1997**	**30-09-1997**	**04-12-1997**
debiet (8-15 uur) (m^3)	42360	53130				
dagdebiet (8-8 uur) (m^3)	145930	148320	116110	133450	prim. 697 sec. 797	
temperatuur water (°C)	19,2	13,2				
neerslag (8-15 uur) (mm)	0,5	0				
IVM						
17β-oestradiol (ng/l)	(11,0)[1]	14	n.a.[3]	1,1		<2,1 ng/g ds
17α-oestradiol (ng/l)	(1,8)[1,2]	1,1	<1,3 (<1,3)[1]	<0,1		<2,1
oestron (ng/l)	(9,5, 11,0)[1,2]	42	2,7 (5,4)[1]	15		<11
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	(<1,4, 9,2)[1,2]	<0,2	<1,4 (<1,4)[1]	<0,2		<17
bisfenol A (ng/l)	(330, 360)[1,2]	570	70 (97)[1]	370		270
DMP (µg/l)	0,05 + <0,02[4]		7[5]		<0,15 µg/g ds	0,09 µg/g ds
DEP (µg/l)	0,63 + 0,04[4]		0,5[5]		1,5	0,2
DBP (µg/l)	0,37 + 14,3[4]		0,4[5]		11	5,6
BBP (µg/l)	0,06 + 0,34[4]		<0,06[5]		0,51	<0,16
DEHP (µg/l)	<0,34 + <0,02[4]		1,5[5]		42	29
DOP (µg/l)	<0,20 + <0,02[4]		<0,20[5]		<0,74	<0,36
RIVM						
DMP (µg/l)		2,0		0,2		
DEP (µg/l)		7,1		0,4		
DPP (µg/l)		0,1		< d.l.		
DMPP (µg/l)		1,6		0,3		
DBP (µg/l)		3,0		1,0		
BBP (µg/l)		0,3		< d.l.		
DCHP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DEHP (µg/l)		10,4		1,6		
DNOP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
UvA						
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.	17	< d.l.	0,5	2,0	28
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	28	170	5,6	6,1	430 µg/g ds	880 µg/g ds
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.	< d.l.	< d.l.	2,0	< d.l.
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	22	< d.l.	0,8	40	125
WU-Tox.						
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	168 (169)[1]	174	4,7 (11,4)[1]	9,6		6,4 pmol/g ds
YES (pmol EEQ/l)	87 (92)[1]	22	1,4 (7)[1]	5		5
Vakgroep Mol. Tox.-VU						
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	5270	1110	< 140	230		760 pmol/g ds
TAUW[6]						
BZV (mg/l)	180 (145)	215	8 (6)	3		
CZV (mg/l)	184 (162)	542 (344)	36 (43)	40 (43)		
NH_4 (mg/l)	23 (20)	35	1,1 (0,9)	5,9 (5,9)		
NKj (mg/l)	31 (30)	36	3,3 (3,4)	6,8		
NO_2 (mg/l)	<0,02	0,03	0,82 (0,31)	0,77		
NO_3 (mg/l)	<0,05	<0,05	23 (25)	18		
zwevend stof (mg/l)	130 (140)	170 (90)	15 (15)	<10 (20)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	550 (550)	500 (470)	650 (750)	550 (550)	24	44
drogestof (%)					2,60 (1,3)[7]	2,47 (3)[7]
gloeirest (%)					28	28

[1] De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
[2] Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
[3] Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
[4] Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
[5] Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
[6] De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
[7] De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.

Awzi A

parameter	samengesteld steekmonster van influent		samengesteld steekmonster van effluent		zuiveringsslib (samengesteld van primair- en secundair slib)	
datum bemonstering	14-10-1997	02-12-1997	14-10-1997	02-12-1997	14-10-1997	02-12-1997
debiet (8-15 uur) (m^3)			3380	2910		
dagdebiet (m^3)	13430	9450	12350	8430		
temperatuur water (°C)	21,8	179				
neerslag (8-15 uur) (mm)	1,5	0				
IVM						
17β-oestradiol (ng/l)	8 (4)[1]	25 + <0,3[4]	<0,6 (<0,5)[1]	1,8		<0,2 ng/g ds
17α-oestradiol (ng/l)	<0,5 (<0,5)[1]	8 + <0,3[4]	<0,5 (<0,3)[1]	2,1		<0,2
oestron (ng/l)	22 (23)[1]	34 + <1,3[4]	11 (7,4)[1]	0,7		<0,9
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	4 (1)[1]	7,7 + <2,0[4]	<1,8 (<1,4)[1]	2,6		<1,4
bisfenol A (ng/l)	480 (360)[1]	>2000 + 30[4]	46 (42)[1]	22		<15
DMP (µg/l)	0,09 + <0,02[4]	0,64 + 0,08[4]	3[5]	0,05 + <0,03[4]	0,58 µg/g ds	<0,11 µg/g ds
DEP (µg/l)	1,0 + <0,02[4]	1,8 + 0,12[4]	0,5[5]	0,01 + <0,03[4]	<0,58	<0,11
DBP (µg/l)	3,6 + 2,9[4]	1,5 + 1,9[4]	0,4[5]	0,21 + <0,03[4]	3,2	0,72
BBP (µg/l)	0,19 + 0,52[4]	0,30 + 0,45[4]	<0,06[5]	<0,04 + 0,10[4]	<1,27	0,99
DEHP (µg/l)	<0,34 + 0,03[4]	<0,34 + 4,5[4]	<0,12[5]	<0,34 + 0,08[4]	48	70
DOP (µg/l)	<0,20 + 0,02[4]	<0,20 + 0,02[4]	<0,01[5]	<0,20 + 0,03[4]	2,9	0,96
RIVM						
DMP (µg/l)		0,9		0,1		
DEP (µg/l)		3,1		1,2		
DPP (µg/l)		0,5		< d.l.		
DMPP (µg/l)		2,1		0,4		
DBP (µg/l)		2,1		0,8		
BBP (µg/l)		0,5		< d.l.		
DCHP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DEHP (µg/l)		7,7		4,1		
DNOP (µg/l)		0,4		< d.l.		
UvA						
octylfenolethoxylaten (µg/l)	39	5350	8,7	2,2	8,9 µg/g ds	50 µg/g ds
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.	2270	15	8,8	90	86
octylfenol (µg/l)	< d.l.	100	< d.l.	1,2	< d.l.	0,95
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	400	< d.l.	< d.l.	3,6	6,5
WU-Tox.						
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	31 (24)[1]	31	59 (14)[1]	9,5		1,6 pmol/g ds
YES (pmol EEQ/l)	33 (32)[1]	< d.l.	58 (19)[1]	9		<0
Vakgroep Mol. Tox.-VU						
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	138 (610)[1]	1000	101	116		360 pmol/g ds
TAUW[6]						
BZV (mg/l)	465 (530)	910	2 (4)	2		
CZV (mg/l)	940 (999)	1490 (2170)	50 (55)	55 (55)		
NH_4 (mg/l)	30 (30)	17	3,1 (2,1)	0,4 (< 0,1)		
NKj (mg/l)	60 (56)	54	4,1 (5,8)	4,3		
NO_2 (mg/l)	0,05 (0,06)	< 0,02	<0,02 (0,07)	0,03		
NO_3 (mg/l)	< 0,05	< 0,05	<0,05 (0,65)	0,13		
zwevend stof (mg/l)	150 (140)	180 (170)	35 (10)	< 10 (< 10)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	1600 (1700)	750 (750)	280 (270)	800 (800)	480	110
drogestof (%)					0,15 (0,4)[7]	0,77 (1,1)[7]
gloeirest (%)					41	49

[1] De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
[2] Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
[3] Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
[4] Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
[5] Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
[6] De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
[7] De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.

Awzi B

parameter	samengesteld steekmonster van influent		samengesteld steekmonster van effluent		zuiveringsslib (samengesteld van primair- en secundair slib)	
datum bemonstering	16-10-1997	16-12-1997	16-10-1997	16-12-1997	16-10-1997	16-12-1997
debiet (8-15 uur) (m^3)	29120	17640				
dagdebiet (m^3)	98210	73780				
temperatuur water (°C)	25,7	25,0				
neerslag (8-15 uur) (mm)	0	0				
IVM						
17β-oestradiol (ng/l)	1,6 (1)[1]	n.a.[3]	<0,7 (<0.6)[1]	<0,4		
17α-oestradiol (ng/l)	0,3 (<0,1)[1]	n.a.[3]	<0,1 (<0.1)[1]	<0,1		
oestron (ng/l)	3,4 (2,5)[1]	n.a.[3]	<0,4 (<0.3)[1]	<0,1		
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	<0,3 (0,9)[1]	n.a.[3]	<0,3 (<0.3)[1]	<0,2		
bisfenol A (ng/l)	700 (590)[1]	>2000	100	22		
DMP (µg/l)	0,14 + <0,02[4]		8[5]	<0,01+<0,03[4]		
DEP (µg/l)	1,0 + <0,02[4]		<0,1[5]	<0,01 + 0,03[4]		
DBP (µg/l)	5,9 + 3,6[4]		4[5]	<0,09 + 0,40[4]		
BBP (µg/l)	0,08 + <0,09[4]		<0,06[5]	<0,04 + 0,10[4]		
DEHP (µg/l)	<0,34 + 1,0[4]		<0,12[5]	<0,34 + 0,44[4]		
DOP (µg/l)	<0,2 + 0,02[4]		<0,01[5]	<0,20 + 0,03[4]		
RIVM						
DMP (µg/l)		0,3		0,3		
DEP (µg/l)		8,9		1,4		
DPP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DMPP (µg/l)		1,5		0,1		
DBP (µg/l)		2,8		0,6		
BBP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DCHP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
DEHP (µg/l)		<0,4		0,7		
DNOP (µg/l)		< d.l.		< d.l.		
UvA						
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.	29	< d.l.	0,46		
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	20	110	0,87	3,3		
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.	< d.l.	0,13		
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	30	< d.l.	1,0		
WU-Tox.						
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	4,3 (2,9)[1]	19	0,11 (0,13)[1]	1,3		
YES (pmol EEQ/l)	2 (6)[1]	< d.l.	1 (0,38)[1]	0,35		
Vakgroep Mol. Tox.-VU						
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	450	101	<100	0		
TAUW[6]						
BZV (mg/l)	195 (215)	375	2 (3)	2		
CZV (mg/l)	533 (546)	1090 (1490)	60 (74)	55 (54)		
NH_4 (mg/l)	47 (52)	37	14 (13)	0,2 (0,25)		
NKj (mg/l)	79 (71)	76	16 (15)	4,9		
NO_2 (mg/l)	0,71 (0,99)	1,4	0,03 (0,05)	< 0,02		
NO_3 (mg/l)	33 (34)	23	34 (35)	4,8		
zwevend stof (mg/l)	30 (80)	340 (710)	45 (45)	60 (40)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	190 (190)	< 20 (< 20)	180 (180)	< 20 (< 20)		
drogestof (%)						
gloeirest (%)						

1 De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
2 Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
3 Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
4 Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
5 Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
6 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
7 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.

Afvalwater industrieterrein C

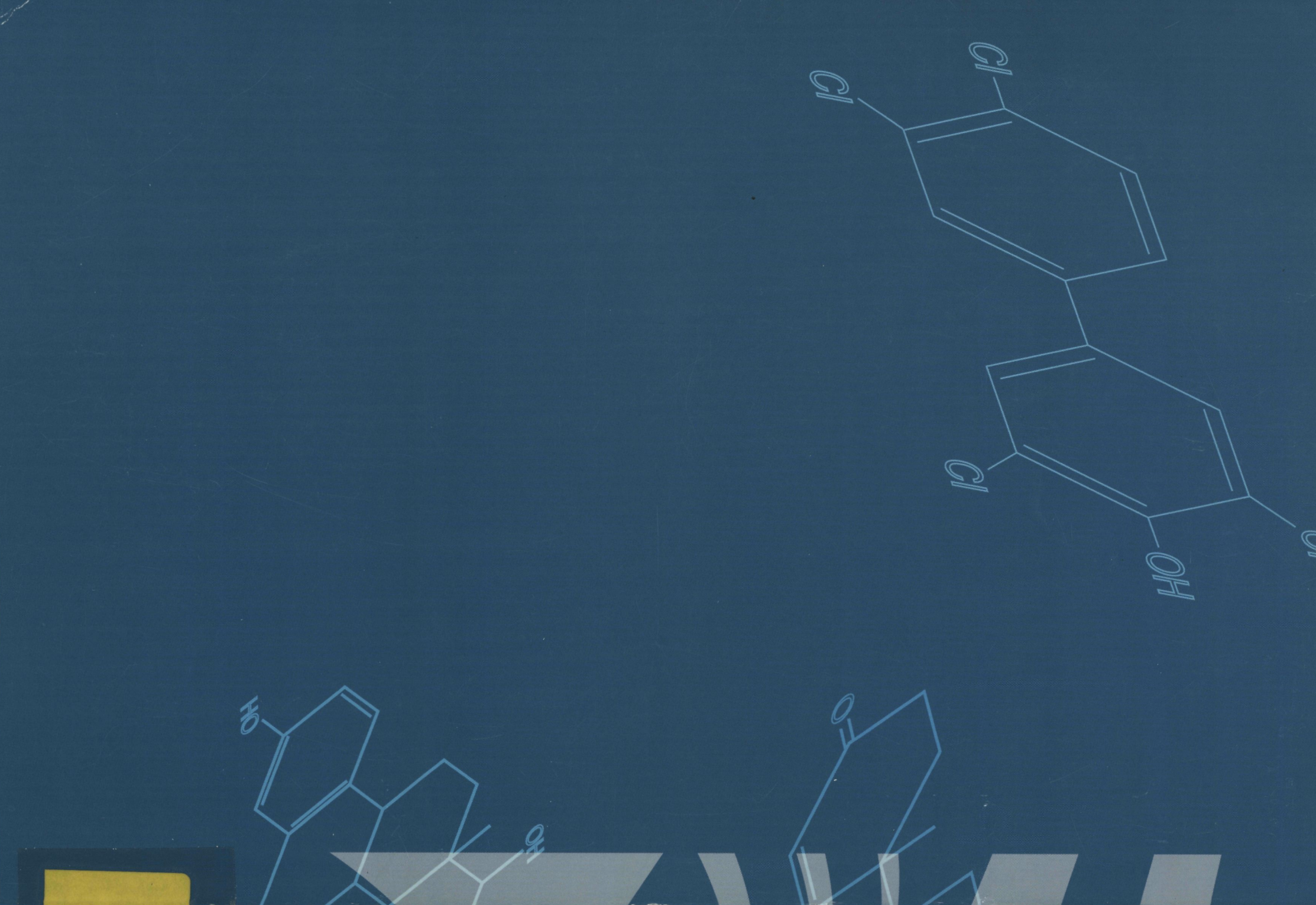
parameter	samengesteld steekmonster van rioolwater		samengesteld steekmonster van rioolslib	
datum bemonstering	**09-10-1997**	**10-12-1997**	**09-10-1997**	**10-12-1997**
debiet (8-15 uur) (m^3)				
dagdebiet (m^3)	6280	3700		
temperatuur water (°C)	19,7	19,9		
neerslag (8-15 uur) (mm)	1,5	0		
IVM				
17β-oestradiol (ng/l)	3,3 (6,2)[1]	1		<0,2 ng/g ds
17α-oestradiol (ng/l)	<0,5 (<0,3)[1]	1		<0,2
oestron (ng/l)	12 (11)[1]	92		3,1
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	2 (2,4)[1]	7,6		<1,6
bisfenol A (ng/l)	540	480		22
DMP (µg/l)	0,52 + <0,04[4]	0,18 + <0,02[4]		0,17 µg/g ds
DEP (µg/l)	1,4 + <0,04[4]	0,03 + <0,02[4]		0,11
DBP (µg/l)	1,4 + 1,1[4]	<0,09 + <0,03[4]		1,1
BBP (µg/l)	0,30 + 0,14[4]	0,05 + <0,08[4]		0,79
DEHP (µg/l)	2,0 + <0,04[4]	<0,34 + 6,8[4]		258
DOP (µg/l)	<0,20 + <0,04[4]	<0,20 + <0,02[4]		17
RIVM				
DMP (µg/l)		0,3		
DEP (µg/l)		1,0		
DPP (µg/l)		1,6		
DMPP (µg/l)		0,7		
DBP (µg/l)		1,0		
BBP (µg/l)		< d.l.		
DCHP (µg/l)		< d.l.		
DEHP (µg/l)		11		
DNOP (µg/l)		< d.l.		
UvA				
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.	97	< d.l.	22 µg/g ds
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	140	290	< d.l.	1410
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.	< d.l.	24
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	150	210 µg/g ds	2480
WU-Tox.				
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	38 (40)[1]	94		41 pmol/g ds
YES (pmol EEQ/l)	53 (34)[1]	77		2750
Vakgroep Mol. Tox.-VU				
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	1070 (730)[1]	802		2000 pmol/g ds
TAUW[6]				
BZV (mg/l)	95 (86)	67		
CZV (mg/l)	316 (308)	247 (327)		
NH_4 (mg/l)	22 (22)	26		
NKj (mg/l)	27 (26)	28		
NO_2 (mg/l)	<0,02	0,03		
NO_3 (mg/l)	<0,05	< 0,05		
zwevend stof (mg/l)	140 (100)	120 (100)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	500 (440)	1000 (1000)	20	55
drogestof (%)			29,2 (48)[7]	4,48 (5,9)[7]
gloeirest (%)			66	78

[1] De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
[2] Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
[3] Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
[4] Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
[5] Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
[6] De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
[7] De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.

Afvalwater industrieterrein D

parameter	samengesteld steekmonster van rioolwater		samengesteld steekmonster van rioolslib	
datum bemonstering	02-10-1997	09-12-1997	02-10-1997	09-12-1997
debiet (8-15 uur) (m^3)				
dagdebiet (m^3)				
temperatuur water (°C)	21,7	17,8		
neerslag (8-15 uur) (mm)				
IVM				
17β-oestradiol (ng/l)	n.a.[3]	7,7		<1,1 ng/g ds
17α-oestradiol (ng/l)	n.a.[3]	<0,1		<1,1
oestron (ng/l)	n.a.[3]	43		<5,4
17α-ethinyloestradiol (ng/l)	n.a.[3]	<0,2		<8,6
bisfenol A (ng/l)	420 (370)[1]	540		120
DMP (µg/l)	0,20 + <0,02[4]	0,99 + <0,05[4]		<0,29 µg/g ds
DEP (µg/l)	2,6 + <0,02[4]	40 + 1,0[4]		2,8
DBP (µg/l)	1,1 + 2,4[4]	2,2 + 2,0[4]		2,4
BBP (µg/l)	0,07 + 0,32[4]	0,13 + 0,22[4]		0,64
DEHP (µg/l)	<0,34 + <0,02[4]	1,5 + 8,8[4]		8
DOP (µg/l)	<0,20 + <0,02[4]	<0,20 + 0,38[4]		<1,5
RIVM				
DMP (µg/l)		1,9		
DEP (µg/l)		76,9		
DPP (µg/l)		1,0		
DMPP (µg/l)		2,8		
DBP (µg/l)		9,6		
BBP (µg/l)		0,4		
DCHP (µg/l)		< d.l.		
DEHP (µg/l)		26,3		
DNOP (µg/l)		0,2		
UvA				
octylfenolethoxylaten (µg/l)	< d.l.	142		19 µg/g ds
nonylfenolethoxylaten (µg/l)	240	1010		0,075
octylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.		< d.l.
nonylfenol (µg/l)	< d.l.	< d.l.		< d.l.
WU-Tox.				
ER-CALUX (pmol EEQ/l)	121 (138)[1]	109		12 pmol/g ds
YES (pmol EEQ/l)	47 (51)[1]	2		13
Vakgroep Mol. Tox.-VU				
ER-bindingsassay (pmol EEQ/l)	1520	< d.l.		1600 pmol/g ds
TAUW[6]				
BZV (mg/l)	920 (1150)	940		
CZV (mg/l)	1770 (1990)	1640 (1750)		
NH_4 (mg/l)	65 (62)	57		
NKj (mg/l)	130 (140)	84		
NO_2 (mg/l)	0,07 (0,06)	0,05		
NO_3 (mg/l)	<0,05	<0,05		
zwevend stof (mg/l)	370 (640)	240 (360)		
borium (µg/l, mg/kg ds)	300 (340)	550 (1900)	20	60
drogestof (%)			29.2	0,74 (7,6)
gloeirest (%)			66	94

1 De tussen haakjes vermelde waarden betreffen monsters behandeld met β-glucuronidase.
2 Deze meting is tweemaal met β-glucuronidase uitgevoerd.
3 Niet geanalyseerd als gevolg van foutieve instelling fractionering.
4 Gehalte in filtraat (opgelost in waterige fractie) + gehalte in residue (vaste matrix)
5 Metingen alleen in de waterfase van gefiltreerd water (75 µm) en bepaald met de minder betrouwbare analysemethode modificatie A
6 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de concentraties van de volumeproportionele monsters. Bij vergelijking van de concentraties tussen de samengestelde steekmonsters en de de volumeproportionele monsters kan enig inzicht worden verkregen in de representativiteit van deze monsters.
7 De tussen haakjes vermelde waarden zijn de drogestofgehalten, zoals bepaald bij analyse van alkylfenolen en alkylfenolethoxylaten in slib.


Cl
Cl
Cl
OH
Cl
O
O
O