

Bodemverontreiniging in de Biesbosch
en doorvergiftiging naar kleine zoogdieren

Bodemverontreiniging in de Biesbosch en doorvergiftiging naar kleine zoogdieren

A.T.C. Bosveld¹
P.A.F. de Bie¹
T. Hamers²

¹ Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Wageningen

² Wageningen Universiteit, Leerstoelgroep Toxicologie

Alterra-rapport 654

Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Wageningen, 2003

REFERAAT

A.T.C. Bosveld, P.A.F. de Bie & T. Hamers 2003. Bodemverontreiniging in de Biesbosch en doorvergiftiging naar kleine zoogdieren. Wageningen, Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte. Alterra-rapport 654. 64 blz.; 13 fig.; 16 tab.; 40 ref.

In de Biesbosch worden bij overstromingen sedimenten afgezet op landbodem. Hiermee komen verontreinigingen zoals PAK's, PCB's en zware metalen beschikbaar voor de terrestrische voedselketen. Onderzocht is in welke concentraties deze verontreinigingen voorkomen in de landbodems en in hoeverre doorvergiftiging optreedt naar kleine zoogdieren. De voornamelijk planten en zaden etende woelmuis en de op bodemfauna (o.a. regenwormen) foeragerende bosspitsmuis zijn onderzocht. Dieren uit regelmatig overstromende gebieden blijken hogere concentraties verontreinigingen in hun lichaam te hebben en vertonen duidelijke effecten op cytochroom P450 enzymfuncties (o.a. EROD). Daarnaast treden bij deze dieren in sommige gevallen ook effecten op in verschillende organen (lever, nier, gonaden) of op het lichaamsgewicht.

Trefwoorden: bosspitsmuis, woelmuis, PAK, PCB, zware metalen, EROD, PROD, testosteronhydroxylase, histopathologie.

ISSN 1566-7197

Dit rapport kunt u bestellen door €21 over te maken op banknummer 36 70 54 612 ten name van Alterra, Wageningen, onder vermelding van Alterra-rapport 654. Dit bedrag is inclusief BTW en verzendkosten.

© 2003 Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte,
Postbus 47, NL-6700 AA Wageningen.
Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: info@alterra.nl

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Alterra.

Alterra aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Inhoud

Woord vooraf	7
Samenvatting	9
1 Algemene inleiding.	11
1.1 Microverontreinigingen in het terrestrisch milieu.	11
1.2 De Biesbosch.	11
1.3 Kleine zoogdieren in de Biesbosch.	12
1.3.1 Bosspitsmuis	12
1.3.2 De rosse woelmuis.	13
1.4 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen.	14
1.5 PCB's	15
1.6 Zware metalen.	16
1.7 Vraagstelling en plan van aanpak.	16
2 Materiaal en Methodes	19
2.1 Monsternamelocaties	19
2.2 Bodemconcentraties.	19
2.3 Vangstmethoden en sectie.	21
2.4 Bereiding levermicrosomen	22
2.5 Alkoxyresorufin O-dealkylase assays.	22
2.6 Testosteron hydroxylering.	23
2.7 DNA adducten	24
2.8 Vitamine A	24
2.9 Steroïdhormonen	25
2.10 Eiwit bepaling.	25
2.11 Histopathologie.	25
2.12 Interne PCB concentraties.	26
2.13 Metaboliseerbare fractie: MF_{PCB} .	26
2.14 DR-CALUX [®] assay	26
2.15 Interne concentraties Zware metalen.	28
3 Resultaten	29
3.1 bodemtypen en toetsingswaarden	29
3.2 Concentraties bodemverontreinigingen	29
3.3 Vangstgegevens	31
3.4 interne PCB concentraties	32
3.5 Interne concentraties Zware metalen.	33
3.6 BSAF.	34
3.7 Bioassay analyses	35
3.8 Morfometrie	35
3.9 AROD	36
3.10 Metaboliseerbare fracties $-MF_{PCB}$.	37
3.11 Testosteronhydroxylase.	38
3.12 Steroïdhormonen	39

3.13	Vitamine A	40
3.14	DNA adducten	41
3.15	Histopathologie	42
3.16	Interne dosis-effect relaties	42
3.16.1	de Dood	42
3.16.2	Noorderplaat	43
3.16.3	Turfzakken	44
4	Discussie	49
4.1	Bodemconcentraties	49
4.2	Bioaccumulatie en verwachte effecten	50
4.2.1	Bioaccumulatie in regenwormen	50
4.2.2	zware metalen	50
4.2.3	PAK's en PCB's	52
4.3	Cytochroom P450 biomarkers	53
4.4	Morfologische en histologische effecten	55
4.5	Interne dosis-effect relaties	56
4.6	Overige biomarkers	57
5	Conclusies	59
	Literatuur	61

Woord vooraf

In het kader van de door LNV-DWK gefinancierde onderzoeksprogramma's "Systeemgerichte Ecotoxicologie" (programma 321) en "Randvoorwaarden voor Natuurlijk Beheer" (programma 384) is meerjarig onderzoek uitgevoerd naar de effecten van verontreinigingen bij in het wild levende kleine zoedieren. Het onderzoek dat in dit rapport beschreven is, heeft plaats gevonden vanuit het idee om met veldwaarnemingen de in het laboratorium vastgestelde kritische belasting niveaus te valideren voor toepassing bij wilde fauna. Daarnaast bestond de doelstelling om de ecologische risico's van de in de Biesbosch aanwezige verontreinigingen vast te stellen. Een van de aspecten van deze risico's betreft de doorvergiftiging naar hogere dieren. De bosspitsmuis en de woelmuis, de lijdend voorwerpen van het hier beschreven onderzoek, zijn rijk vertegenwoordigd in de Biesbosch. Als voorbeelden van de vlees(regenwormen-)eters en de planteneters, zijn deze soorten onderzocht om te weten te komen welke effecten de in het gebied aanwezige verontreinigingen mogelijk kunnen hebben. Een deel van het onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met Wageningen Universiteit, Leerstoelgroep Toxicologie. Dank gaat uit naar Tinka Murk, Hans van den Berg, Emiel Felzel en Dennis van Scharenburg. Ook Joost de Jong, Hester Jongepier, Hugh Jansman en Tim Boerrichter hebben in hun stageperioden bij IBN/Alterra bijgedragen aan de resultaten van dit onderzoek. Wij zijn Wim Traag en Jaap Immerzeel erkentelijk voor de chemische analyses die op het RIKILT uitgevoerd zijn. Marleen Lee (Alterra) en Harry Janssens (Atrium Medisch Centrum, Heerlen) worden bedankt voor de analyses van de steroïdhormonen. Onze bijzondere dank gaat ook uit naar Dirk Feij van Staatsbosbeheer, voor de facilitering van het veldwerk in de Biesbosch.

Samenvatting

Door de grote rivieren wordt een grote verscheidenheid van verontreinigingen meegevoerd. Sedimenten met deze verontreinigingen worden afgezet op landbodems wanneer de rivieren buiten hun oevers treden. Uit metingen in de Biesbosch blijkt dat in regelmatig overstromende gebieden de interventiewaarden voor sommige metalen soms overschreden worden. Andere verontreinigingen, zoals polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en polychloorbiphenylen (PCB's) zijn eveneens in sterk verhoogde concentraties aanwezig op deze locaties.

Langs verschillende wegen komen deze verontreinigingen terecht in kleine zoogdieren. Voor de uiteindelijke interne gehalten is het voedingspatroon in belangrijke mate bepalend. In de bosspitsmuis (*Sorex araneus*), die foerageert op bodemdieren, zoals o.a. regenwormen, worden over het algemeen hogere concentraties verontreinigingen aangetroffen dan in de herbivore woelmuis (*Clethrionomys glareolus*). Effecten die gerelateerd zijn aan een verhoogde blootstelling zijn waargenomen in beide soorten. Het meest duidelijke effect is een inductie van EROD en daaraan verwante enzymactiviteiten zoals MROD, PROD en BROD. Deze effecten zijn karakteristiek na blootstelling aan dioxinen, PCB's, maar ook PAK's. Daarnaast werd ook een verandering van het PCB congenere patroon waargenomen, waarbij het aandeel van de relatief eenvoudig metaboliseerbare congenere concentratieafhankelijk afnam. Deze veranderingen hangen samen met de verhoogde enzymactiviteiten in deze dieren.

Naast de effecten op enzymfuncties werd bij sommige dieren een afwijkend lichaamsgewicht of orgaangewicht (lever, nier) waargenomen. Ook gaven de dieren uit de hoog verontreinigde locaties in sommige gevallen afwijkingen in de weefselstructuur van de geslachtsorganen te zien. Deze laatste veranderingen zijn echter niet significant in verband te brengen met de blootstelling.

Uit de gezamenlijke resultaten van de veldonderzoeken die in de jaren 1997 en 1998 uitgevoerd zijn blijkt dat de verhoogde concentraties verontreinigingen in de bodem leiden tot verhoogde blootstelling en interne concentraties bij de bosspitsmuis en de woelmuis. Op sterk verontreinigde locaties in de Biesbosch veroorzaken deze verontreinigingen effecten die de fitness van de soort kunnen beïnvloeden.

1 Algemene inleiding

1.1 Microverontreinigingen in het terrestrisch milieu.

Door de grote rivieren wordt een bont mengsel van verschillende stoffen meegevoerd. In overstromingsgebieden zoals de uiterwaarden worden met het sediment ook deze stoffen afgezet. Zo zijn in de Biesbosch sedimenten afgezet die verontreinigd zijn met PAK's PCB's en zware metalen. Op verschillende locaties worden bestaande normen voor bodemconcentraties overschreden.

1.2 De Biesbosch.

De Biesbosch is een van de weinige nog bestaande zoetwatergetijdengebieden in Europa. Voor de afsluiting van het Haringvliet in 1970 stond de Biesbosch in directe verbinding met de zee. Het getijdenverschil bedroeg gemiddeld 2 meter. Tegenwoordig is het verschil in waterstand slechts enkele tientallen centimeters. De Biesbosch ligt in het sedimentatiegebied van de rivieren de Rijn en de Waal en bestaat uit een netwerk van stromen en kreken (zie Fig. 1.1). In de loop van de tijd is ongeveer 100.000 m³ slib, verontreinigd met onder andere zware metalen en organische micro-verontreinigingen gesedimenteerd in de watergangen en kreken. Vanaf het midden van de 19e eeuw zijn verschillende gebieden ingepolderd en in gebruik genomen voor landbouw. Door de opgeworpen dijken bleven deze polders afgeschermd voor het verontreinigde water. De bodem van de buitendijkse overstromingsgebieden is echter wel in hoge mate verontreinigd.



Figuur 1.1 Topografische ligging van de Biesbosch (links) en luchtfoto van het gebied (rechts; foto RWS)

De vraag is in hoeverre de in de Biesbosch aanwezige terrestrische natuur nadelige gevolgen ondervindt van deze op het land afgezette stoffen. Hierbij zijn met name effecten te verwachten bij dieren hoger in de voedselketen. Middels doorvergiftiging kunnen deze bloot staan aan relatief hoge concentraties. Het onderhavige onderzoek heeft zich daarom gericht op de in de Biesbosch algemeen voorkomende kleine zoogdieren; de bosspitsmuis en de rosse woelmuis.

1.3 Kleine zoogdieren in de Biesbosch.

In de Biesbosch komen 28 verschillende soorten zoogdieren voor, waarvan vier verschillende soorten spitsmuizen [Gewone bosspitsmuis (*Sorex araneus*), Dwergspitsmuis (*Sorex minutus*), Waterspitsmuis (*Neomys fodiens*), Huisspitsmuis (*Crocidura russula*)], zes verschillende soorten muizen [Rosse woelmuis (*Clethrionomys glareolus*), Veldmuis (*Microtus arvalis*), Aardmuis (*Microtus agrestis*), Noordse woelmuis (*Microtus oeconomus*), Dwergmuis (*Micromys minutus*), Bosmuis (*Apodemus sylvaticus*)], vijf verschillende soorten vleermuizen [Meervleermuis (*Myotis dasycneme*), Dwergvleermuis (*Pipistrellus pipistrellus*), Ruige dwergvleermuis (*Pipistrellus nathusii*), Laatvlieger (*Eptesicus serotinus*), Gewone grootoorvleermuis (*Plecotus auritus*)], en verder nog de Mol (*Talpa europaea*), Egel (*Erinaceus europaeus*), Haas (*Lepus europaeus*), Konijn (*Oryctolagus cuniculus*), Bever (*Castor fiber*), Woelrat (*Arvicola terrestris*), Muskusrat (*Ondatra zibethicus*), Bruine rat (*Rattus norvegicus*), Beverrat (*Myocastor coypus*), Hermelijn (*Mustela erminea*), Wezel (*Mustela nivalis*), Bunzing (*Mustela putorius*), en Ree (*Capreolus capreolus*).

Van deze soorten zijn de bosspitsmuis en de rosse woelmuis geselecteerd voor onderzoek naar effecten van verontreinigingen in de Biesbosch. Deze twee soorten zijn niet bedreigd, komen algemeen voor en zijn in voldoende aantallen te bemonsteren voor ecotoxicologisch onderzoek. De diëten van beide soorten verschillen in die zin dat de bosspitsmuis een voornamelijk carnivore levenswijze en de woelmuis een voornamelijk herbivore levenswijze heeft. Deze levenswijzen brengen verschillende blootstellingen met zich mee waarbij carnivoren, zoals de bosspitsmuis, in verhouding meer blootstaan aan persistente lipofiele contaminanten die de biotransformatieprocessen in de primaire consumenten doorstaan hebben. Herbivoren, zoals de woelmuis, daarentegen zullen meer blootstaan aan metaboliseerbare stoffen, die in planten niet en in dieren wel afgebroken worden.

1.3.1 Bosspitsmuis

De bosspitsmuis (*Sorex araneus*, zie Fig. 1.2) is een klein terrestrisch zoogdier dat wijd verspreid in de Biesbosch voorkomt. Buiten de Biesbosch komt de bosspitsmuis in vrijwel heel Europa voor. De bosspitsmuis heeft een gewicht tussen de 6 en 13 g en komt voor in gebieden met een dichte kruidlaag. De bosspitsmuis is een territoriaal dier (territoriumgrootte 400-650m²) dat leeft in verlaten gangen en holen van andere kleine zoogdieren. In de voortplantingstijd (april-augustus) zijn de meeste vrouwtjes herhaaldelijk zwanger. De draagtijd is ca. 3 weken en er zijn meestal 3 worpen van 5 à 6 jongen per worp. Het voedsel van de bosspitsmuis bestaat uit regenwormen, slakken, pissebedden, kevers, hooiwagens, spinnen en plantaardig materiaal. Vanwege een snelle stofwisseling moet een bosspitsmuis driekwart tot anderhalf maal zijn lichaamsgewicht per etmaal eten. Met dit voedsel worden ook milieuverontreinigende stoffen opgenomen. De maximale levensduur van de bosspitsmuis bedraagt 14 tot 16 maanden. Een tweede winter wordt nooit gehaald. Door zijn hoge stofwisseling en door zijn territoriale karakter is de bosspitsmuis mogelijk een geschikte bioindicator voor effecten van vervuiling op de terrestrische predatore zoogdieren (Broekhuizen et al, 1992, Churchfield, 1990, Lange et al., 1986).



Figuur. 1.2 De gewone bosspitsmuis, *Sorex araneus* (tekening Paul Schoenmakers).

1.3.2 De rosse woelmuis.

De rosse woelmuis (*Clethrionomys glareolus*; zie Fig. 1.3) is ook een algemene soort in de Biesbosch. Deze soort leeft in verschillende typen loof- en naaldbos, in heggen en houtwallen en in het daaraan grenzende grasland. Vochtige bossen en bossen met een humeuze bodem en weelderige ondergroei hebben de voorkeur. De rosse woelmuis komt echter ook voor in andere biotopen, zoals heide, rietkragen en kruidenvegetaties van meer dan 15 cm hoogte, mits deze niet ver van boomrijk terrein zijn gelegen. De grootte van het leefgebied varieert van 500 tot meer dan 2000 m², afhankelijk van leeftijd, biotoop en geslacht. De rosse woelmuis eet hoofdzakelijk groene plantendelen, maar ook zaden en, vooral in het voortplantingsseizoen, dierlijk voedsel. Van de rosse woelmuis is bekend dat ze geïnduceerde ovulators zijn. Dit betekent dat de vrouwelijke rosse woelmuizen ovuleren als ze gepaard hebben. De voortplantingstijd is gemiddeld van april tot oktober, afhankelijk van de temperatuur en het voedselaanbod. Er worden na een draagtijd van 18 tot 21 dagen, 3 tot 4 maal per jaar gemiddeld 4 (2 tot 7) jongen geboren. Deze verlaten na 15 dagen het nest, zijn na 25 tot 30 dagen zelfstandig en kunnen na 1 tot 2 maanden geslachtsrijp zijn. Rosse woelmuizen kunnen tot anderhalf jaar oud worden, maar leven gemiddeld maar 3 maanden (Broekhuizen *et al.*, 1992, Lange *et al.*, 1986).



Figuur 1.3 De rosse woelmuis; *Clethrionomys glareolus* (foto; Roel van Beek).

1.4 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen.

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) zijn algemeen voorkomende milieuverontreinigingen die bestaan uit twee of meer gefuseerde ringstructuren. Vorming van deze stoffen vindt met name plaats bij verbranding van organische verbindingen. Als zodanig zijn bosbranden en vulkaanuitbarstingen belangrijke natuurlijke bronnen. Daarnaast speelt biosynthese ook een rol. Deze bronnen zijn echter niet van belang voor de Nederlandse situatie (Sloof et al 1989) Kunstmatige en in Nederland van belang zijnde bronnen voor emissies naar de lucht zijn verkeer (246 ton/jaar), industrie (86 ton/jaar; o.a. aluminium industrie, cokes productie, kabel branden), houtverduurzaming (629 ton/jaar), en verbranding & verwarming (135 ton/jaar). Rechtstreekse emissies naar de bodem hebben een totale geschatte omvang van 64 ton/jaar. Bij de berekening van deze hoeveelheden is uitgegaan van tien te onderscheiden stoffen, te weten: naftaleen, anthraceen, fenantreen, fluorantheen, benzo[a]anthraceen, chryseen, benzo[k]fluorantheen, benzo[a]pyreen, benzo[ghi]peryleen, en indeno[1,2,3-cd]pyreen (uit: Basisdocument PAK, Slooff et al., 1989).

PAK's kunnen via depositie vanuit de lucht en/of door opname vanuit de bodem in planten terecht komen en hiermee beschikbaar komen voor de terrestrische voedselketen. Metingen van PAK's in biota zijn schaars. De meeste hogere (land)dieren lijken PAK's op een efficiënte wijze te kunnen metaboliseren. Bioaccumulatie van deze stoffen treedt daarom bij deze soorten mogelijk niet of in zeer geringe mate op. Concentraties in bodemfauna kunnen echter wel oplopen tot meetbare hoeveelheden (Ma et al 1998).

Onderzoek naar effecten van PAK's in zoogdieren heeft zich met name gericht op mutageniteit en carcinogeniteit. Uit ecotoxicologisch oogpunt zijn echter ook de niet carcinogene effecten van belang. Met name verstoring van de normale reproductie kan van invloed zijn op de ontwikkeling en omvang van de natuurlijke populaties. In

dit verband is bij *in utero* aan BaP of BaA blootgestelde ratten een verminderde gevoeligheid van moederdieren voor oestrogenen en een verminderde vruchtbaarheid van nakomelingen waargenomen (Slooff et al 1989). Deze beide effecten duiden op een mogelijke verstoring van hormoonbalansen in het lichaam door blootstelling aan PAK's.

1.5 PCB's

Polychloorbiphenyl (PCB) is de algemene naam voor verbindingen die bestaan uit twee middels een enkele binding aan elkaar gekoppelde benzeenringen met één tot tien chloor atomen. Zo zijn er 209 verschillende *congeneren* mogelijk, die volgens de IUPAC nomenclatuur aangeduid worden met een nummer.

Van PCB's zijn effecten op de reproductie aangetoond. Deze effecten omvatten o.a. aantasting van de kwaliteit van sperma, histopathologische veranderingen in de geslachtsorganen en inductie van cytochroom P450 enzymen waaronder enkele specifieke isoenzymen die betrokken zijn bij het metabolisme van geslachtshormonen (review van effecten van PCB's in Jansen et al 1998). Veel effecten die geïnduceerd worden door PCB's worden veroorzaakt door tussenkomst van een receptor; de zgn. Arylhydrocarbon receptor (AhR). Vooral de zgn. non-ortho- en mono-ortho gesubstitueerde PCB's met een structurele verwantschap aan tetrachloordibenzo-*p*-dioxine (TCDD) kunnen met hoge affiniteit binden aan deze receptor. Het aldus gevormde complex kan in de celkern afgebakende stukken DNA aanzetten tot een verhoogde transcriptie van mRNA dat op zijn beurt weer codeert voor de aanmaak van specifieke eiwitten. Een van deze eiwitten is het enzym cytochroom P450 (CYP) 1A1. Dit enzym is betrokken bij de afbraak van lichaamsvreemde verbindingen zoals PCB's en PAK's, maar speelt eveneens een rol bij het metabolisme van endogene verbindingen zoals steroidhormonen. De activiteit van CYP1A1 kan gemeten worden d.m.v. het ethoxyresorufine O-dealkylase (EROD) assay. EROD activiteit wordt daarom ook vaak gebruikt als biomarker voor effecten die via dit AhR mechanisme veroorzaakt worden (Bosveld & van den Berg 1994).

Naast enzymactiviteitsmetingen zijn ook de verhoudingen tussen goed en slecht metaboliseerbare PCB-congeneren bepaald als alternatieve maat voor de microsomale EROD activiteit. Bij de verschillende PCB's kan onderscheid gemaakt worden tussen goed en slecht metaboliseerbare congenere. Wanneer de meta-para posities in een PCB molecuul niet door chloor (Cl) atomen maar door waterstof (H) atomen bezet zijn, is dit een geschikt aangrijpingspunt voor cytochroom P450 enzymen die op deze plaats de vorming van een epoxide catalyseren. De epoxide is de noodzakelijke tussenvorm bij de hydroxylering van het molecuul. Een hydroxygroep aan het PCB molecuul vormt de basis voor verdere conjugaties en uitscheiding van het molecuul uit het lichaam. Wanneer één van de meta-para posities door Cl-atomen bezet zijn ontbreekt het aangrijpingspunt voor cytochroom P450 enzymen, waardoor het molecuul slecht afbreekbaar is, en zal accumuleren in het lichaam. Naarmate de verantwoordelijke cytochroom P450 enzymen

(hoofdzakelijk CYP1A en CYP2B) een verhoogde activiteit vertonen, bijvoorbeeld als gevolg van blootstelling aan enzym-inducerende stoffen (o.a. dioxines en PCB's), zal de mate waarin de metaboliseerbare PCB's afgebroken en uitgescheiden worden ook toenemen. Om deze redenen is de verhouding tussen metaboliseerbare en niet-metaboliseerbare PCB congenen in het lichaam een weerspiegeling van de mate waarin cytochroom P450 enzymen in de voorliggende periode actief geweest zijn (van den Brink & Bosveld 2001, van den Brink et al. 2000).

1.6 Zware metalen.

Zware metalen, waaronder koper (Cu), lood (Pb), cadmium (Cd), zink (Zn), nikkel (Ni), chroom (Cr), kwik (Hg), arseen (As), cobalt (Co) en Vanadium (Va), komen van nature voor in de bodem, maar concentraties kunnen plaatselijk door additionele verontreinigingen sterk verhoogd zijn. Zware metalen zijn eveneens aangetoond in uiteenlopende concentraties in tal van organismen, waaronder planten, bodem macrofauna en zoogdieren (Ma & Talmage 2001). De effecten van verhoogde concentraties zware metalen zijn zeer uiteenlopend. Van zink en cadmium zijn teratogene effecten aangetoond (goudhamster i.v. 2 mg/kg; Ferm & Carpenter 1967). Blootstelling aan cobalt (CoCl 400 ppm) resulteerde bij muizen in een afname van het testesgewicht, epididimus sperma concentratie en motiliteit en bij vrouwelijke dieren in een verhoogd preimplantatie verlies en een afname van het aantal nakomelingen (Pedigo et al 1988, Pedigo & Vernon 1993). Vanadium is gedocumenteerd als reproductie- en ontwikkelingstoxicant in zoogdieren Afgenomen vruchtbaarheid, embryoletaliteit, foetotoxiciteit en teratogeniteit zijn aangetoond in ratten, muizen en hamsters (Domingo 1996). Ook van lood zijn diverse teratogene en embryotoxische effecten beschreven (Winder, 1993). De embryotoxische effecten omvatten toegenomen resorbtie, embryo mortaliteit, laag placenta gewicht en spontane abortus. Ook is aangetoond dat lood bij concentraties van 0.35 – 0.5 µg/ml in het bloed de spermatogenese beïnvloedt.

1.7 Vraagstelling en plan van aanpak.

Het onderhavige onderzoek richt zich op de beantwoording van de vraag of kleine zoogdieren in de Biesbosch effecten ondervinden van verhoogde concentraties milieuverontreinigende stoffen. Hiertoe zijn binnen de Biesbosch op drie verschillende tijdstippen in de periode 1997-1998, drie vergelijkende studies uitgevoerd naar concentraties in de bodem en de effecten in kleine zoogdieren. Steeds is een regelmatig overstromend en daarmee verondersteld verontreinigd gebied vergeleken met een nabijgelegen relatief schoon referentiegebied dat door dijken tegen overstroming beschermd is. Allereerst zijn de bodemconcentraties van zware metalen bepaald om de mate van verontreiniging van de verschillende gebieden vast te stellen. Vervolgens zijn bosspitsmuizen en woelmuizen gevangen voor een vergelijkend onderzoek om de effecten van een verhoogde blootstelling vast te stellen. Hierbij zijn naast enkele morfometrische kenmerken zoals lichaamsgewicht en diverse orgaangewichten ook verschillende enzymfuncties

bepaald, waarvan bekend is dat deze geïnduceerd worden door blootstelling aan PCB's en PAK's. Ook zijn de dieren onderzocht op histopathologische afwijkingen in de geslachtsorganen. In een aantal gevallen is van de gevangen dieren de interne blootstelling gemeten voor de bepaling van interne dosis-effect relaties. Er zijn drie verschillende deelonderzoeken uitgevoerd waarbij voor ieder afzonderlijk onderzoek in dezelfde periode dieren gevangen zijn op een verontreinigde locatie en een referentielocatie.

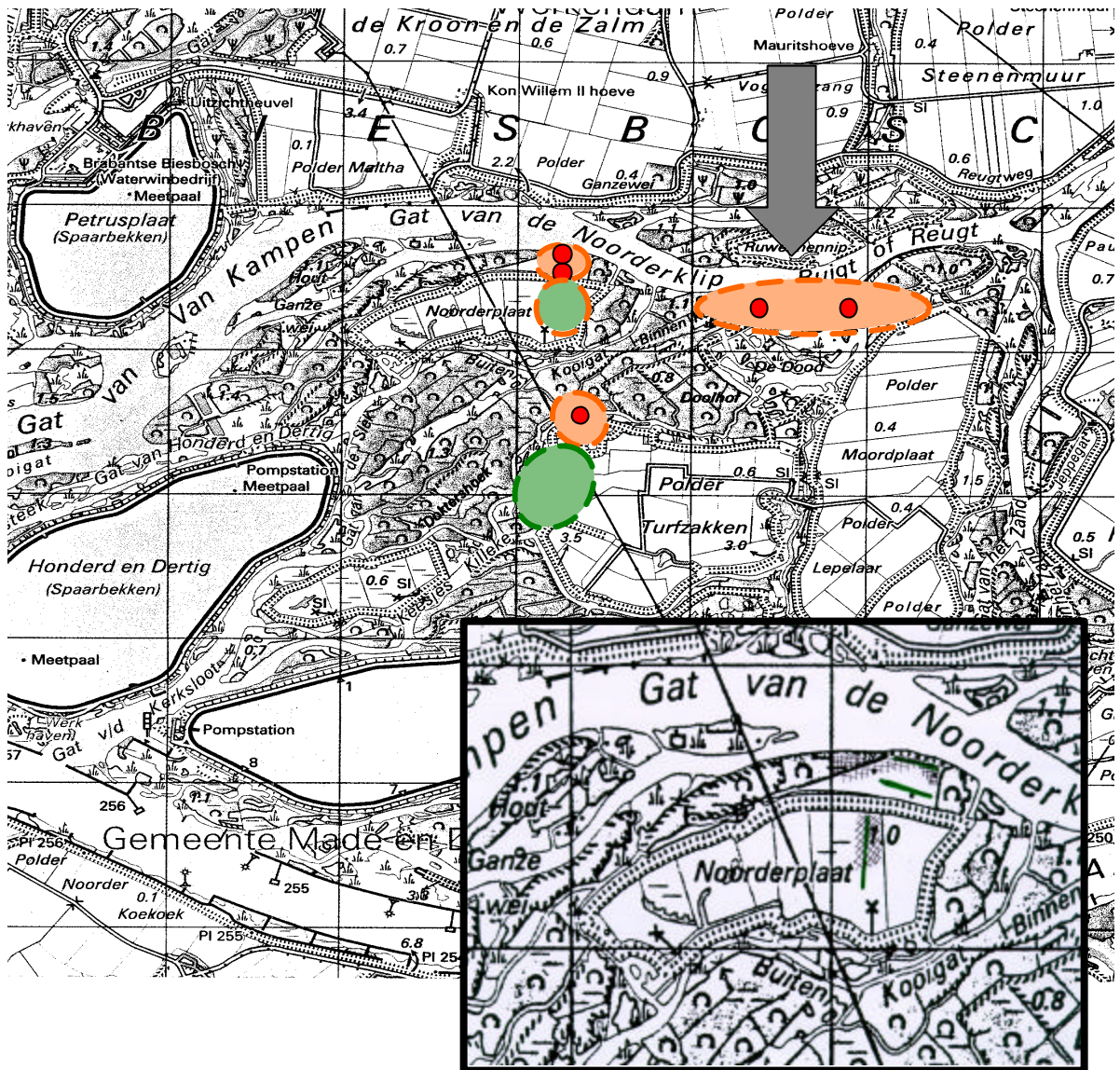
2 Materiaal en methoden

2.1 Monsternamelocaties

In de periode 1997-1998 zijn achtereenvolgend drie vergelijkende studies uitgevoerd op drie verschillende locaties. Voor deelonderzoek 1 zijn de effecten bij bosspitsmuizen uit de uiterwaard bij de polder *de Dood* onderzocht. Locatie 1 ligt ten noorden van de polder *De Dood* en is gelegen langs de *Reugt*. Het gebied is vanuit de *Reugt* in het verleden regelmatig overstromd. Met de overstromingen is verontreinigd sediment afgezet. Voor deelonderzoek 2, zijn de effecten bij de polder *Noorderplaat* onderzocht. Locatie 2 ligt ten noorden van de polder de *Noorderplaat* langs de oevers van het *Gat van de Noorderklip*. Voor deelonderzoek 3 zijn de effecten in de *Turfzakken* onderzocht. Locatie 3 is gelegen ten noorden van de polder *Turfzakken* en is in het verleden overstromd vanuit het *Kooigat*. In alledrie de deelonderzoeken zijn referentiegebieden geselecteerd met een overeenkomend begroeiingstype. Als referentie voor locatie 1 en 3 is het noordwestelijk deel van de polder de *Turfzakken* gebruikt. Als referentie voor locatie 2 is het noordelijk deel van de polder *Noorderplaat* gebruikt. De verschillende polders waarbinnen de referentielocaties gekozen zijn, zijn in de tweede helft van de 19e eeuw omsloten door dijken en zijn sinds die tijd dus beschermd tegen overstroming en sedimentatie van verontreinigd slib dat door de rivieren meegevoerd wordt. De gebieden buiten de dijken, de uiterwaarden, zijn gelegen aan de oevers van de verschillende kreken en worden wel regelmatig overstromd. In deze uiterwaarden komen daarom mogelijk relatief hoge concentraties verontreinigende stoffen voor zoals zware metalen, PAK's en PCB's. Om dit na te gaan zijn op verschillende locaties bodemonsters gestoken voor analyse van bodemverontreinigingen. De ligging van de verschillende onderzoeksgebieden zijn weergegeven in figuur. 2.1.

2.2 Bodemconcentraties.

Bodemonsters zijn verzameld door met een guts grond van 0 tot 10 cm diepte en van 10 tot 20 cm diepte te steken. Langs de *Reugt* in de uiterwaarden van de polder *De Dood* is in 1997 op twee locaties grond verzameld. In de uiterwaarden bij de polder *Noorderplaat* zijn evenwijdig aan de oever van het *Gat van de Noorderklip* in 1998 twee oost-west gepositioneerde lijnen geprojecteerd (verder benoemd als "oever" en "uiterwaard") waarlangs om de ca. 25 m. en in totaal 5 grondmonsters per raai gestoken zijn. In de uiterwaard van de polder *Turfzakken* is in 1997 op één locatie grond verzameld. Voor de referentiemetingen is in 1997 in de polder *Turfzakken* op twee locaties grond verzameld. In 1998 is in de polder *Noorderplaat* een noord-zuid gesitueerde lijn geprojecteerd (verder benoemd als "polder") waarlangs om de ca. 25 m en in totaal 5 grondmonsters gestoken zijn. Alle monsters zijn na verzamelen ingevroren bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figuur 2.1. Monsternamelocaties. Overzichtkaart waarin de gebieden waarbinnen kleine zoogdieren gevangen zijn gearceerd zijn. De verontreinigde onderzoekslocaties zijn rood gearceerd. De referentielocaties zijn groen gearceerd. De locaties binnen de cirkels waar de bodemmonsters genomen zijn, zijn aangegeven met een punt. Inzet: Detailkaart Noorderplaat waarin aangegeven de drie raaien waarlangs bodemmonsters verzameld zijn (groene lijnen) en de gebieden waarbinnen de vallen geplaatst zijn (gearceerd).

Voor analyse zijn de monsters ontdooid en vervolgens uitgestort op petrischalen om grove delen en groene plantendelen te verwijderen. Worteldelen en ander organisch materiaal is fijngesneden, waarna het gehele monster zorgvuldig is gehomogeniseerd. Een deel van het monster is gebruikt voor de bepaling van het drogestof- en organischestofgehalte. Drogestofgehalte (DS) is bepaald door de veldvochtige grond te wegen, vervolgens te drogen bij 105°C, en de zo verkregen droge grond weer terug te wegen. Het organischestofgehalte (OS) is bepaald door de droge grond te gloeien bij 550°C. Het residu is de minerale fractie (MF); het gewichtsverlies van de grond is gelijk aan de hoeveelheid organische stof. Het organischestofgehalte is uitgedrukt ten opzichte van de droge grond.

Voor de PAK analyses is per bodemonmonster een equivalent van 10 g droge stof uitgeschud met achtereenvolgens 40 ml aceton en 20 ml petroleumether (PE) en 30 ml aceton/PE (1:2, v/v). Het residu is nagespoeld met 2 x 5 ml PE en ingedampt tot ca. 5 ml. Als interne standaard is 6-methylchryseen 30 ng/ml toegevoegd aan de meetoplossing. De oplossing is geanalyseerd met behulp van HPLC met een 20 cm ChromsperPAH kolom (kolomdiameter 3 mm, partikel diameter 5µm) en een P2000 binair gradiënt pomp. De loopvloeistof was water/acetonitril volgens de volgende gradiënt: 0-35 min: 50/50, 35-42.5 min: 22/78, 42.5-48 min: 0/100, 48-55 min: 50/50. De oventemperatuur was 35 °C. De gebruikte detector was de PL2000 Fluorescence met de volgende excitatie en emissie golflengten: 0-6.5 min: 280/340 nm, 6.5-10.2 min: 270/320 nm, 10.2-13.9 min: 254/386 nm, 13.9-18.2 min: 270/420 nm, 18.2-27.7 min: 268/384 nm, 27.7-36.0 min: 280/430 nm, 36.0-39.5 min: 298/398 nm, 39.5-50.0 min: 300/476 nm.

Voor de analyses van de zware metalen cadmium (Cd), lood (Pb), zink (Zn), nikkel (Ni), chroom (Cr) en koper (Cu) zijn deze uit de grond geëxtraheerd met 10 ml HCl 37% en 30 ml H₂O en vervolgens gemeten middels atomaire absorptie spectrofotometrie (AAS) met vlam detectie. Zware metalen in de nier (Cd, Cu, Pb) zijn geëxtraheerd met 65% salpeterzuur en een destructiemagnetron. Cu, Cr, Ni, Pb en Cd gehalten in de meetoplossingen werden bepaald met behulp van grafietoven atomaire-absorptie spectrofotometrie (grafhite furnace atomic absorption spectrophotometry: GFAAS) bij de volgende golflengten: Cu: 324.8 nm, Cr: 357.9 nm, Ni: 232.0 nm, Cd: 222.8 nm, Pb: 283.8 nm. Verhogingen van het signaal door niet-atomaire absorptie werd gecorrigeerd met behulp van een Zeeman-achtergrondcorrectie systeem. Het zink gehalte is bepaald met behulp van vlam-atomaire-absorptie spectrofotometrie (flame-atomic absorption spectrophotometry: FAAS) bij een golflengte van 213.9 nm na atomisering in een lucht-acetyleen vlam. Verhogingen van het signaal door niet-atomaire absorptie werd in dit geval gecorrigeerd met behulp van een deuterium-achtergrondcorrectie systeem.

2.3 Vangstmethoden en sectie.

Voor ieder deelonderzoek is in dezelfde periode in het verontreinigde gebied en in het bijbehorende referentiegebied gevangen. Dieren voor het onderzoek naar effecten in de polder *De Dood* (inclusief referentie gebied in de *Turfzakken*) zijn gevangen in de periode mei-juni 1997. De dieren voor het onderzoek naar effecten bij de *Noorderplaat* zijn gevangen in de maand april 1998. In de periode juni-juli 1998 zijn dieren gevangen voor het onderzoek naar effecten bij de polder *Turfzakken*.

Per locatie zijn ca. 100 Longworth lifetraps gezet. De vallen zijn in de middag geplaatst en geopend achtergelaten (pre-baiting). Als lokaas werd kattenvoer of een mengsel van pinda's, wortel en gebakken runderhartgehakt in de vallen gelegd. Na een etmaal zijn de vallen rond zonsondergang op scherp gesteld. In de daaropvolgende nacht zijn de vallen twee keer gecontroleerd op vangst en rond zonsopgang weer in gefixeerde open positie gezet. Wanneer niet voldoende dieren gevangen werden is dit proces de volgende dag herhaald. Gevangen dieren zijn

overgeplaatst in plastic bakken (60x30x30) en vervoerd naar een ter plaatse ingericht veldlaboratorium (onderzoek locatie 1, 1997), het IBN laboratorium te Arnhem (onderzoek locatie 2, april 1998), of naar het WU laboratorium te Wageningen (onderzoek locatie 3, juni-juli 1998). In het laboratorium zijn de dieren gewogen en gedood middels een hartpunctie onder verdoving met ether. Het afgenomen bloed is gecentrifugeerd (Eppendorf centrifuge; 500 rpm) en het supernatant (plasma) is overgebracht in een nieuw Eppendorfcupje en ingevroren bij -20°C. Het ontwikkelingsstadium (juveniel / adult) is bepaald bij sectie op basis van een visuele inspectie van de mate van thymus atrofie en de ontwikkeling van de geslachtsorganen. De lever, long, hart en nieren zijn verwijderd, gewogen en direct ingevroren in vloeibaar stikstof en vervolgens bewaard (lever bij -80°C, overige organen bij -20°C) voor latere analyses. De gonaden (testis / ovaria) zijn verwijderd en in Bouin's vloeistof gefixeerd.

2.4 Bereiding levermicrosomen

Ten behoeve van enzymactiviteit metingen zijn de levers ontdooid en opgewerkt tot microsomen volgens eerder beschreven methoden (Bosveld et al. 2001). Levers zijn separaat gehomogeniseerd in een TRIS buffer in 10 ml potterbuizen met teflon plunjer. Het homogenaat is gecentrifugeerd gedurende 9 min. bij 15000 g (Beckman L-69 ultracentrifuge met 50.2 TI rotor; 11.000 rpm). Het supernatant is overgebracht in een schone centrifugebuis en gedurende 60 min. gecentrifugeerd bij 100.000 g. Het hierdoor verkregen supernatant is verwijderd en de overgebleven pellet is opgenomen in TRIS buffer met glycerol en gehomogeniseerd m.b.v. een ultraturrax. De verkregen microsomale suspensie is ingevroren bij -80°C voor later uit te voeren enzym assays.

2.5 Alkoxyresorufin O-dealkylase assays.

CYP1A1 geassocieerde ethoxyresorufine O-deethylase (EROD) en in sommige gevallen eveneens de CYP1A2 geassocieerde methoxyresorufine O-demethylase (MROD) en CYP2B geassocieerde pentoxyresorufine O-depenthylase (PROD) en benzyloxyresorufine O-debenzylase (BROD) activiteiten, zijn gemeten in de microsomale fracties van de lever. Reactiemengsels bestonden uit 25 µl microsomale suspensie met 375 µl 0.1M TRIS buffer met NADPH (4.8 mM), BSA (10 mg/ml) en substraat (ER, MR en PR 1 µM, BR 0.1 µM). Exact tien minuten na toevoeging van NADPH (start van de reactie) werd de enzymactiviteit stilgelegd door 1 ml methanol aan het mengsel toe te voegen. Vervolgens is de fluorescentie gemeten in een Cytofluor fluorescence plate reader bij een excitatie golflengte van 530 nm en een emissie van 590 nm. Resorufine (van Kodak) is gebruikt als standaard. De microsomale enzymactiviteiten zijn gestandaardiseerd naar eiwitgehalte. Het eiwitgehalte van de microsomale fracties is bepaald volgens de methode van Lorenzen & Kennedy (1993). Deze methode berust op de toevoeging van fluorescamine aan de in NaOH en fosfaatbuffer opgenomen microsomale suspensie

en een daarop volgende fluorescentie meting bij een excitatie/emissie golflengte van 390/425 nm. Bovine Serum Albumine (van Sigma) is gebruikt als standaard.

2.6 Testosteron hydroxylering.

Microsomale isomeerspecifieke testosteronhydroxylering (TH) activiteiten zijn – alleen in deelonderzoek 1 (*de Dood*)- gemeten aan de hand van de vorming van de verschillende hydroxytestosteron verbindingen uit testosteron. De verschillende hydroxytestosteron (HT) verbindingen (2α -, 2β -, 6β -, 7α -, 11α -, 12β -, 15α -, 15β -, 16α -, 16β -HT) zijn geanalyseerd m.b.v. HPLC. Naast deze hydroxyleringsreacties treedt ook een dehydroxylering op (testosteron \rightarrow androstenedion) waarbij onder invloed van het enzym 17-OH SDH de hydroxygroep op de 17 positie geoxideerd wordt tot een dubbel gebonden zuurstof (keto) op deze positie. In de verdere bespreking van de testosteron(de)hydroxylases zal deze uitzondering niet steeds apart benoemt worden en ook onder de hydroxylases vermeld worden.

Een reactiemengsel bestaande uit 75 μ l microsomen, 75 μ l NADPH (4.8 mM in milliQ), 10 μ l testosteronoplossing (3.61 g/ml in methanol) en 340 μ l fosfaatbuffer (50 mM KH_2PO_4 , 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.9 mM EDTA; pH 7.4) is al schuddend geïncubeerd bij 37°C. De reactie is na exact 15 min. gestopt door toevoeging van 1 ml dichloormethaan. Na beëindiging van de reactie is 10 μ l interne standaard oplossing toegevoegd (11 β -hydroxytestosteron 400 μ g/ml in methanol). Het mengsel is 5 min. geschud en vervolgens gedurende 10 min. gecentrifugeerd bij 5000 g. De dichloormethaan-fase met de testosteron metabolieten is afgescheiden, ingedampd en opgenomen in 130 μ l 50% methanol. De hydroxytestosteron (HT) isomeren zijn geanalyseerd m.b.v. een Spectra Physics (Spectra System) HPLC met een Chrompak C18, 200x3 mm kolom (5 μ m deeltjes) gekoppeld aan een LKB 2151 UV detector (254 nm) en een PE Nelson chromatograaf. Van het extract in 50% methanol is 20 μ l geïnjecteerd. Als mobiele fase is een gradiënt van 25% methanol in milliQ (vloeistof A) naar 64% methanol en 6% acetonitril in milliQ (vloeistof B) gebruikt. Mengverhoudingen van beide loopvloeistoffen waren: 0-7 min: 100% A, 7-42 min: lineaire gradiënt van 100% A naar 42 % A en 58% B, 42-47 min: 42% A en 58% B, 47-48 min: lineaire gradiënt naar 100% B, 48-52 min: 100% B, 52-53 min: lineaire gradiënt naar 100% A, 53-60 min: 100% A. De doorloopsnelheid van de mobiele fase bedroeg 0.8 ml/min. De kolomtemperatuur bedroeg 60 °C.

De piekhoogten voor de afzonderlijke metabolieten zoals weergegeven op het chromatogram zijn gestandaardiseerd naar een 1000 mV respons voor de interne standaard (11 β -HT). De locatiespecifieke hydroxyleringactiviteit is berekend als de aldus gemeten respons (in mV per 1000 mV IS) per hoeveelheid microsomaal eiwit in het reactiemengsel per min. incubatietijd (mV/min.mg).

Als standaard is een mengsel van de verschillende HT verbindingen gebruikt, waarin de componenten niet afzonderlijk gekwantificeerd aanwezig zijn. De standaard is gebruikt voor de bepaling van de retentietijden. Kwantificering van de activiteit naar

hoeveelheid gevormd product is op basis van deze standaard echter niet mogelijk. Sommatie van de verschillende activiteiten en beschouwing van de relatieve activiteiten (respons van specifieke TH ten opzichte van gesommeerde respons van alle TH's) dient slechts ter algemene duiding van eventuele veranderingen zonder dat daar kwantitatieve uitspraken over gedaan kunnen worden.

2.7 DNA adducten

Voor de bepaling van DNA adducten in deelonderzoek 3 (*Turfzakken* 1998), is DNA geïsoleerd uit een klein stukje van het hart en is de ³²P postlabeling assay toegepast zoals beschreven in Hamers et al (2002). De ³²P postlabeling assay is gebaseerd op de selectieve verwijdering van onveranderde nucleotiden met enzymatische methoden. De overblijvende DNA adducten worden vervolgens gefosforileerd via een enzym-gecatalyseerde transfer van ³²P-fosfatase van [γ -³²P]ATP naar de deoxyribose van het adduct. De specificiteit van de ³²P postlabeling methode maakt het mogelijk dat een groot scala van grote hydrofobische stoffen gebonden aan het DNA gedetecteerd wordt.

2.8 Vitamine A

De hoeveelheden retinol en retinylpalmitaat in de lever zijn in deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) gemeten volgens de methode van Brouwer et al (1989) met enkele aanpassingen zoals beschreven in Hamers et al (2002). Lever homogenaten zijn opgenomen in Tris-buffer en vervolgens geëxtraheerd met di-isopropylether (DIPE) en methanol (1:2:1) met daarin opgenomen de interne standaard retinylacetaat (1 µg/ml) en 0.1% butyl-hydroxytoluene (BHT) als anti-oxidant. De monsters zijn gevortexed, overnacht bewaard, wederom gevortexed en gecentrifugeerd in een eppendorf centrifuge (5000 rpm, 5 minuten). De DIPE-fase is verwijderd en gefilterd (Millipore 0.45 µm filter), drooggedampt onder stikstof en opgenomen in 100 µl ethylacetaat/methanol (1:3) met 0.1% BHT. Extractie efficiënties waren groter dan 80%. Hoeveelheden van 20 µl van de opgeloste extracten zijn geanalyseerd met HPLC met een C18 analytische kolom (Pecosphere 3 µm partikels, 3.3 cm lengte en 4.6 mm interne diameter, Perkin Elmer) en een golflengte van 326 nm voor de detectie van retinoiden. Retinoiden zijn geanalyseerd met een doorstroom van 86% methanol en 14% water voor 1.5 min, gevolgd door een gradiënt tot 100% methanol voor 2.5 min, en daaropvolgende elutie van de retinyl esters voor 12 min. De kolom werd vervolgens teruggebracht naar de aanvangscondities door gedurende 6 minuten een doorstroom van 86% methanol en 14% water te verwezenlijken.

2.9 Steroïdhormonen

17 β -oestradiol, progesteron en testosteron in plasma is gemeten met behulp van competitieve enzyme immuno assay (EIA)-kits (R&D systems, DE2000, DE2200 en DE2300). De EIA's zijn uitgevoerd volgens de handleidingen van de leverancier. Aan ieder plasmamonster (50 – 100 μ l) is 1 μ l steroid displacement reagens (SDR) toegevoegd. Vervolgens zijn alle plasmamonsters 10x verdund met assay buffer ED3. De volgende oplossingen zijn gepipetteerd in antilichaam gecoate microtiterplaten: 1) assay buffer (nul-standaard; 100 μ l/well), 2) standaardverdundingen en 3) 10x verdunde plasmamonsters. Na toevoeging van 50 μ l/well van elk anti-steroïd en enzym-gelabeld steroïd is 2 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur (20-25 °C) op een schudder. Voor bepaling van niet-specifieke binding (NSB) is assay buffer geïncubeerd zonder anti-steroïd en met gelabeld steroïd. Na een wasstap is pNPP substraat toegevoegd dat door het enzym alkalische fosfatase is omgezet in een geel gekleurd product. Na 1 uur incuberen bij kamertemperatuur is de reactie gestopt en is gemeten bij 405 en 580 nm in een plate reader (Versmax). De steroïdconcentratie en optische dichtheid zijn omgekeerd evenredig. Als uitleesparameter van standaarden en monsters zijn A_{405} - A_{580} na correctie voor NSB gebruikt. Een standaardcurve is gemaakt door een 4-parameter logistic fit toe te passen op de standaardverdundingen, waarna de concentraties steroïd van de monsters in de wells en de onverdunde monsters zijn berekend.

2.10 Eiwit bepaling.

Het eiwitgehalte van de microsomale fractie is bepaald volgens de methode van Lorenzen & Kennedy [1993]. Deze methode berust op de toevoeging van fluorescamine aan de in NaOH en fosfaatbuffer opgenomen microsomale suspensie en een daarop volgende fluorescentie meting. Hiertoe is 25 μ l microsomale suspensie is opgenomen in 300 μ l fosfaatbuffer (tetranatriumdifisfaat 10-Hydroxy (Merck 6591) 22.3 g/l; pH 8) en 100 μ l NaOH 0.1 N. Na sonificeren is al schuddend 100 μ l fluorescamine oplossing (sigma F-9015; 1.08 mM in aceton) toegevoegd. Na 5 min incubatie is de fluorescentie gemeten op een Cytofluor I fluorescentie "platerader" bij een excitatie/emissie van 390/425 nm. Bovine Serum Albumine (Sigma A-7888) is gebruikt als standaard.

2.11 Histopathologie.

Bij de gevangen dieren is indicatief onderzoek verricht naar histopathologische afwijkingen in de geslachtsorganen. Hiertoe zijn de testes en de ovaria geïsoleerd en gefixeerd in een Bouin oplossing. Na dehydratie met ethanol en depar zijn de organen ingebed in paraffine. Na uitharding zijn coupes gesneden, gekleurd met hematoxyline en eosine, en ingebed in pertex. De coupes zijn microscopisch onderzocht op afwijkingen in de weefselstructuur. Van de testis is de gemiddelde diameter van de tubuli seminiferi bepaald op basis van de beoordeling van drie

verschillende coupes waarvan elk 10 aselect gekozen tubuli gemeten zijn. Daarnaast is het aantal ronde spermatiden en platte spermatozoa per dwarsdoorsnede van het lumen bepaald. Van het ovarium is het oppervlakte bepaald en is het aantal van de daarin voorkomende primordiale-, groeiende- en artretische follikels bepaald. Daarnaast is het oppervlakte (absoluut en procentueel t.o.v. gehele ovarium) van de follikels bepaald. Follikels bestaande uit een oöcyt met enkele afgeplatte follikelcellen zijn als primordiale follikel aangemerkt. Follikels met een stratum granulosum van ten minste één laag kubische cellen zijn als groeiend geclassificeerd. De begrenzing van deze follikels wordt aangegeven door de grens tussen de theca en het stratum granulosum. Follikels met optredende necrose in het stratum granulosum (lichte wazige rand rond de follikel) zijn als artretisch geclassificeerd. De histologische ovarium index (HOI) is bepaald en gedefinieerd als de verhouding tussen het aantal artretische follikels en het totaal aantal follikels (artretisch en groeiend).

2.12 Interne PCB concentraties.

Voor de bepaling van de interne PCB gehalten is van de gevangen dieren het onderhuids vet tussen de schouderbladen bij de sectie verwijderd. Het vet is opgewerkt voor chemisch analytisch onderzoek (uitgevoerd door RIKILT). Hiertoe is PCB 198 toegevoegd als interne standaard. Vervolgens is het vet uitgesmolten en geëxtraheerd met hexaan. Na concentratie door indamping zijn de monsters gezuiverd over een Al_2O_3 kolom. Het gezuiverde extract is drooggedampt en het residu is opgenomen in 10 μ l iso-octaan met fenantreen daarin opgelost als een recovery standaard. De monsters zijn gemeten met een HR-GCMS.

2.13 Metaboliseerbare fractie: MF_{PCB} .

Van de geanalyseerde PCB's hebben de volgende congenen een vrije meta-para positie en zijn daarmee geclassificeerd als goed metaboliseerbaar: #28/31, #52, #61, #95, #101, #105, #107/108, #118, #141, #149, #151, #174, #179. De *metaboliseerbare fractie* (MF_{PCB}) is berekend als het quotiënt tussen de gesommeerde concentraties van de metaboliseerbare congenen en de gesommeerde concentraties van alle congenen ($MF_{PCB} = \text{metaboliseerbare PCB's} / \text{totaal PCB}$). In voorgaande validerende studies is aangetoond dat bij een toenemende blootstelling aan PCB's en de daaraan gekoppelde toegenomen CYP activiteit de MF_{PCB} afneemt (van den Brink & Bosveld 2001, van den Brink et al. 2000).

2.14 DR-CALUX[®] assay

De concentraties dioxine-achtige verbindingen zijn in deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) bepaald in de DR-CALUX[®] assay. Metingen zijn verricht aan deposities vanuit de lucht, aan bodem, bodemfauna en aan zoogdieren. De DR-CALUX[®] assay is gebaseerd op de binding van dioxine-achtige stoffen aan de Ah receptor en de

daarop volgende transcriptie van bepaalde delen van het genoom. De DR-CALUX[®] assay maakt gebruik van genetisch gemodificeerde H4IIE cellen waar een luciferase (Luc) reporter gen plasmide ingebracht is. Binding van een component aan de Ah-receptor in de cel resulteert in een interactie van het receptor-ligand-complex met een dioxin responsive element (DRE) op het DNA en de transcriptie van een daarachter gelegen deel van het DNA met inbegrip van het Luc reporter gen. Dit resulteert in de productie van luciferase. De hoeveelheid geproduceerd luciferase, dat een maat is voor de hoeveelheid ligand die aan de AhR gebonden is, wordt gemeten door luciferine aan te bieden en de hoeveelheid licht die vrijkomt door de omzetting van dit substraat te meten met een luminometer.

De DR-CALUX[®] assay is uitgevoerd in 96-wells microtiter platen zoals beschreven door Murk et al. (1996). Om onderscheid te maken tussen eenvoudig afbreekbare en stabiele Ah-receptor agonisten is de luciferase productie gemeten na 6 en na 48 uur, met respectievelijk benzo[a]pyreen (BaP) en tetrachloordibenzo-*p*-dioxine (TCDD) als modelstof voor de stofgroepen van respectievelijk PAK's en PHAK's. Cellen werden in de microtiterplaten blootgesteld aan verdunde monsters van bodem of regenwormen in een medium met 0.4% DMSO. In geval van 6-uurs blootstelling werd voorgeconditioneerd en filtergesteriliseerd medium gebruikt waarin 16 uur lang H4IIE cellen zijn gekweekt. Na correctie voor de ruis, werd de luciferase-activiteit uitgedrukt als een fractie van de controle. De zo verkregen inductiefactor werd vervolgens geïnterpoleerd in de ijklijn van de referentie stoffen, waardoor de DR-CALUX[®] respons kan worden uitgedrukt in BaP- of TCDD-equivalent concentraties.

De dioxine-achtige verbindingen in de te analyseren grond zijn geëxtraheerd uit 5 g gedroogde grond (35°C) vermengd met 1 g gedroogd Na₂SO₄. Extractie vond plaats door het monster 1 uur te koken bij 160°C en 1 uur te spoelen in een soxtec apparaat (Höganäs, Zweden) met een 1:1 (v/v) mengsel van aceton en dichloormethaan. De extracten werden vervolgens ingedampt onder een milde stikstofstroom bij 37 °C en opgenomen in petroleumether. Na ontzwaveling met een tetrabutyl ammonium waterstofsulfaat (TBA) mengsel werden de extracten verder ingedampt, opgenomen in 1 ml iso-octaan en over een ICN Alumina B - Super I kolom geleid (3 g; 15% water). Na elutie met petroleumether werden de monsters ingedampt en opgenomen in 50 µl DMSO.

Ter bepaling van de concentraties dioxine-achtige verbindingen in bodemfauna is een monster van ongeveer 2.5 g (natgewicht) regenwormen (*Apporectodea caliginosa* en *Lumbricus rubellus*) in een mortier gemengd met 15 g gedroogd Na₂SO₄. Het mengsel werd vervolgens geëxtraheerd met de soxtec methode als hierboven beschreven, en vervolgens drooggedampt om het vetgehalte te kunnen bepalen. Het monster werd opgenomen in 1 ml iso-octaan en over een alumina-kolom geleid (3 g; 15% water). Na elutie met petroleumether werden de monsters ingedampt en opgenomen in 30 µl DMSO.

Van de kwartfilters waarop gedurende 14 dagen de passieve depositie vanuit de lucht is neergeslagen (Ø=10cm), is 1/5 deel in kleine stukjes gesneden en

geëxtraheerd met de soxtec methode als beschreven hierboven. Het extract werd direct ingedampt en opgenomen in 30 µl DMSO.

2.15 Interne concentraties Zware metalen.

Zware metalen zijn geanalyseerd in de nier. De nieren zijn in kleine stukjes gesneden en opgenomen in 10 ml salpeterzuur (65%). Verdere ontsluiting van de metalen uit het weefsel vond plaats met een destructiemagnetron. Cu, Cr, Ni, Pb en Cd gehalten in de meetoplossingen werden bepaald met behulp van grafietoven atomaire-absorptie spectrofotometrie (graphite furnace atomic absorption spectrophotometry: GFAAS) bij de volgende golflengten: Cu: 324.8 nm, Cr: 357.9 nm, Ni: 232.0 nm, Cd: 222.8 nm, Pb: 283.8 nm. Verhogingen van het signaal door niet-atomaire absorptie werd gecorrigeerd met behulp van een Zeeman-achtergrondcorrectie systeem. Het zink gehalte is bepaald met behulp van vlam-atomaire-absorptie spectrofotometrie (flame-atomic absorption spectrophotometry: FAAS) bij een golflengte van 213.9 nm na atomisering in een lucht-acetyleen vlam. Verhogingen van het signaal door niet-atomaire absorptie werd in dit geval gecorrigeerd met behulp van een deuterium-achtergrondcorrectie systeem

3 Resultaten

3.1 bodemtypen en toetsingswaarden

Voor het vergelijkend onderzoek zijn drie verschillende regelmatig overstromende gebieden (uiterwaarden bij *De Dood*, de *Noorderplaat* en de *Turfzakken*) onderzocht en twee verschillende referentiegebieden (polders *Noorderplaat* en *Turfzakken*). De uiterwaardgrond bij *De Dood* bevat een organischestofgehalte (humus) van gemiddeld 6% (6 ± 3 , $n=10$) en een drogestofgehalte van 73 ± 12 %. De grond verzameld in de polder de *Noorderplaat* bevat een gemiddeld organischestofgehalte (humus) van 5 % ($3/6$, $n=2$) en een drogestofgehalte van 73% ($68/77$, $n=2$). In de polder *Turfzakken* is het organischestofgehalte (humus) gemiddeld 3% (3 ± 1 , $n=10$) en het drogestofgehalte 86 ± 3 %. Volgens de bodemkaart van Nederland (Damoiseaux & Vos, 1987) behoren deze bodems tot het type kalkrijke poldervaaggrond; zware zavel, profielverloop 2 (eMn22A), met 3 tot 8 % humus en 18 tot 25% lutum. Op basis van deze gegevens is voor deze bodems een bodemtypecorrectie voor de streef-interventiewaarden uitgevoerd met 5% humus en 20% lutum.

Tabel 3.1. Streefwaarden en interventiewaarden voor de bodem met bodemtypecorrectie voor de Biesbos bodems.

	Streefwaarde		Interventiewaarde	
	eMn22A	eMo80A	eMn22A	eMo80A
Cd	0,7	0,8	9,9	12,7
Pb	75	94	468	586
Zn	118	196	604	867
Ni	30	45	180	270
Cr	90	120	342	456
Cu	30	41	158	219
PAK10	0,5	0,9	20	36

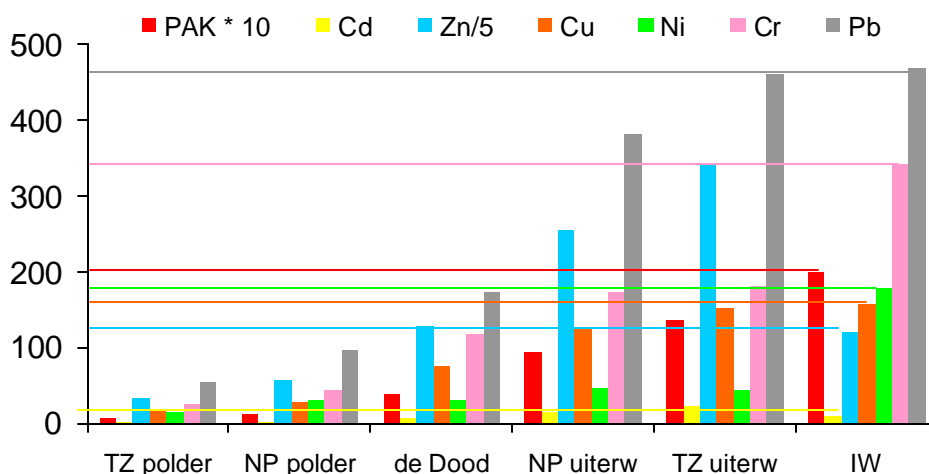
NB. Bodemtypecorrecties voor eMn22A (uiterwaard de Dood, polder Noorderplaat en Turfzakken) op basis van 5% humus en 20% lutum. Voor eMo80A (uiterwaarden Noorderplaat en Turfzakken) op basis van 9% humus en 35% lutum.

De grond buitendijks de *Noorderplaat* (uiterwaard en oever) bevat gemiddeld 12% organische stof en 60% drogestof. Bij de *Turfzakken* is dit respectievelijk 9% en 63%. Deze bodems behoren tot het type kalkrijke nesvaaggrond; klei (eMo80A), met 5 tot 12% humus en 25 tot 45% lutum. Bodemtypecorrectie voor de streef-interventiewaarden voor deze grond is gebaseerd op 9% humus en 35% lutum. In tabel 3.1 zijn de streef- en interventiewaarden weergegeven die voor de betreffende bodems gelden.

3.2 Concentraties bodemverontreinigingen

In de uiterwaarden bij *de Dood* (deelonderzoek 1) worden voor de metalen Cd en Zn de interventiewaarden voor de betreffende bodem (20% lutum, 5% humus) overschreden. De overige metalen overschrijden in alle gevallen de streefwaarden,

maar niet de interventiewaarden. De concentraties zware metalen in de polder *de Dood* zijn twee tot zeven keer hoger dan de concentraties aangetroffen in het voor deelonderzoek I gebruikte referentiegebied, de polder *de Turfzakken*. De PAK concentraties zijn ca. 10 x hoger in *de Dood* (zie Fig. 3.1).



Figuur 3.1. Bodemconcentraties (mg/kg ds) PAK's ($\Sigma 10$ PAK's VROM) en zware metalen in de Biesbosch. TZ = Turfzakken; NP = Noorderplaat; uiterw = uiterwaard; IW = interventiewaarde met bodemtypecorrectie voor lutum 20% en humus 5%. Rangschikking van locaties globaal naar oplopende concentratie.

Bij de *Noorderplaat* (deelonderzoek 2) laten de concentraties PAK's en zware metalen in grond in de volgorde polder < uiterwaard < oever een duidelijke toename zien. In de bovenlaag (0-10 cm) langs de oever zijn de Σ -PAK concentraties 9x hoger dan in de polder. Van de zware metalen zijn de Cd concentraties eveneens 9x hoger langs de oever. Pb, Zn, Cr en Cu zijn 5-6x hoger. Ni is langs de oever 2 x hoger dan in de polder. De concentraties PAK's overschrijden in alle gevallen de aan het bodemtype aangepaste streefwaarden. Langs de oever wordt de streefwaarde ruim 10x overschreden. Ook bij de zware metalen worden in veel gevallen overschrijdingen van de streefwaarden waargenomen. Langs de oever is dit het geval voor alle geanalyseerde metalen. In de polder alleen voor Cd, Pb, Zn en Ni. In het buitendijkse gebied overschrijden Cd en Zn ook de betreffende interventiewaarden. Voor Cd wordt deze in het ergste geval 1.6x overschreden. Zn geeft een overschrijding van 1.9 x te zien (zie tabel 3.2).

De bodemconcentraties van PAK's en zware metalen in de uiterwaard van de *Turfzakken* (deelonderzoek 3) zijn eveneens significant hoger dan in het bijbehorende referentiegebied. De Σ PAK concentraties in de uiterwaard zijn ca. 19x hoger dan in de polder (0.7 ± 0.2 en 13 ± 3 mg/kg ds. respectievelijk). De individuele PAK congenenieten lieten verhogingen van 16 tot 35 x zien (zie tabel 3.3). Voor de zware metalen waren over het algemeen minder grote verschillen tussen de twee zijden van de dijk te zien. Uiterwaard concentraties lagen 3 (Ni) tot 16 x (Cd) hoger dan de in de polder.

Tabel 3.2. Bodemconcentraties van zware metalen en PAK in de Biesbosch in relatie tot de betreffende toetsingswaarden

-MV(cm)	TZ polder		NP polder		TZ uiterwaard		de Dood uiterwaard		NP uiterw		NP oever	
	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20
Cd	<i>1-2</i>	<i>1.6-1.6</i>	2.4	2.4	24.3	23.6	8-11.5	4.5-5.1	12.7	5.3	20.7	16.2
Pb	38-60	54-68	96	96	455	469	190-243	127-129	342	202	476	512
Zn	<i>122-193</i>	<i>165-201</i>	280	282	1802	1617	699-900	454-501	1163	653	1682	1627
Ni	15-15	15-18	30	31	46	41	31-38	28-28	48	32	58	52
Cr	22-25	26-30	46	42	212	153	121-171	84-95	179	70	274	170
Cu	12-18	17-19	28	29	153	150	83-101	57-59	116	64	171	154
PAK10	<i>0.41-0.86</i>	<i>0.58-0.79</i>	1.2	1.1	11.81	15.58	4.24 - 5.69	2.39 - 3.32	7.5	6.4	10.4	13.7

N.B. concentraties boven de streefwaarde zijn cursief gedrukt, concentraties boven de interventiewaarde (zie tabel 3.1) zijn **cursief vet** gedrukt.

Tabel 3.3. Bodemconcentraties (mg/kg ds) van afzonderlijke PAKs

	TZ polder	TZ uiterw	NP polder	NP oever	NP uiterw	dD uiterwaard
NAF	0.07	1.5	0.09	0.43	1.15	0.3125
ACE	0.015	0.335	0.02	0.085	0.25	0.0725
FL	0.0125	0.435	0.025	0.11	0.4	0.0925
FEN	0.085	2	0.145	0.77	1.7	0.4825
ANT	0.025	0.53	0.035	0.21	0.435	0.1425
FLU	0.13	2.85	0.23	1.45	2.5	0.7775
PYR	0.0875	1.8	0.15	1.055	1.6	0.52
BAA	0.07	1.5	0.125	0.895	1.3	0.435
CHR	0.0725	1.5	0.135	0.89	1.35	0.4325
BBF	0.0925	1.75	0.165	0.95	1.6	0.535
BKF	0.035	0.75	0.065	0.445	0.72	0.2425
BAP	0.065	1.3	0.12	0.81	1.2	0.405
DBA	0.01	0.165	0.015	0.095	0.165	0.0525
BGP	0.0475	0.8	0.085	0.48	0.785	0.305
IP	0.06	0.965	0.115	0.575	0.955	0.375
PAK10	0.66	13.695	1.145	6.955	12.095	3.91

3.3 Vangstgegevens

Voor deelonderzoek 1 (polder *de Dood* en het referentiegebied *de Turfzakken*) zijn elf bosspitsmuizen in de uiterwaarden gevangen en drie in het bijbehorende referentiegebied in de polder *de Turfzakken*. Op beide locaties was de geslachtsverhouding van de gevangen dieren ongeveer 2:1 (m/v). Voor deelonderzoek 2 (*Noorderplaat*) zijn in de polder 10 bosspitsmuizen en 5 woelmuizen gevangen. In de uiterwaard zijn 7 bosspitsmuizen en 10 woelmuizen gevangen. In de uiterwaard is, in tegenstelling tot bij de monsternames voor bodemanalyses, geen onderscheid gemaakt tussen onder de dijk en langs de oever. Voor beide soorten waren op beide locaties de vangsten min of meer gelijk verdeeld over de geslachten. Bij bosspitsmuizen uit de *Noorderplaat* waren de m/v verhoudingen 50:50 en 57:43 in het binnendijkse en buitendijkse gebied respectievelijk. Bij de woelmuizen waren deze

verhoudingen 40:60 en 60:40. Bijna alle gevangen vrouwtjes van beide soorten bleken drachtig te zijn. Alleen bij twee van de vier vrouwtjes woelmuizen gevangen in het buitendijkse gebied was dit niet het geval.

Voor het deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) zijn in het totaal totaal 16 driekleurige bosspitsmuizen en 15 rosse woelmuizen gevangen. Ook hier ware beide geslachten min of meer evenredig vertegenwoordigd, behalve bij bosspitsmuizen uit de polder, waar geen enkel mannelijk exemplaar is gevangen. Daarnaast was in de *Turfzakken* ook de maturatie (juveniel/subadult of adult) verschillend tussen de vanggebieden (zie tabel 3.4).

Tabel 3.4. Aantal onderzochte dieren onderverdeeld naar soort, geslacht en levensstadium.

	Bosspitsmuis				? /? (%)	Woelmuis				
	man (?)		vrouw (?)			man (?)		vrouw (?)		? /? (%)
	juv.	adult	juv.	adult		juv.	adult	juv.	adult	
dD97 uiterw		8		3	73/27					
TZ97 polder	2			1	67/33					-
NP98 polder		5		5 ⁵	50/50		2		3 ³	40/60
NP98 uiterw		4		3 ³	57/43		6		4 ²	60/40
TZ98 polder			2	2	0/100		1		1	50/50
TZ98 uiterw	3	1	3	1	50/50	2	6	3	2	55/45

N.b. het aantal zwangere vrouwtjes is aangegeven in superscript.

3.4 interne PCB concentraties

Interne PCB concentraties (gemeten in onderhuids vet) zijn alleen onderzocht in deelonderzoek 2 (*Noorderplaat*). Uit de resultaten blijkt, dat de concentraties in bosspitsmuizen significant hoger zijn (ca. 2.5x) dan in woelmuizen (gemiddelden Σ -PCB in polder respectievelijk 468 ± 181 en 26 ± 14 mg/kg vet; gemiddelden in uiterwaarden respectievelijk 2626 ± 1019 en 140 ± 152 mg/kg vet). De verschillen tussen Σ -PCB in dieren uit het binnendijkse en buitendijkse vanggebied zijn voor de bosspitsmuis significant ($p < 0.001$). Voor de woelmuis bleken deze verschillen niet significant ($p = 0.2$). Ook voor de afzonderlijke congenen werden voor de woelmuis in geen van de gevallen significante verschillen tussen de vanggebieden waargenomen. Voor de bosspitsmuis waren voor de afzonderlijke congenen de verschillen significant voor PCBs #118, #138, #146, #149, #153, #170, #174, #177, #180, #182/187, #183, #194, #196, en #206 (zie Tabel 3.5).

Tabel 3.5. PCB congeener concentraties ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vet; gemiddelden en standaarddeviaties) in onderhuids vet van bosspitsmuizen en woelmuizen uit de uiterwaarden en polder van de Noorderplaat. Significante ($p < 0.05$) verschillen tussen polder en uiterwaard zijn aangegeven met een *.

	bosspitsmuis		woelmuis	
	polder	uiterw	polder	uiterw
PCB-28/31	2.9±1.9	1.5±1.0	nd	3.1
PCB-52	1.0±0.4	0.7±0.3	0.8±0.2	nd
PCB-61	0.8±0.3	0.5±0.3	0.8±0.4	1.3±0.8
PCB-95	0.6±0.3	0.5±0.1	nd	nd
PCB-101	0.8±0.4	1.6±0.6*	1.1±0.03	nd
PCB-105	3.1±1.3	4.1±2.3	0.9±0.6	0.7±0.4
PCB-107/108	0.0±0.0	0.1	0.5±0.6	0.2±0.2
PCB-118	7.8±3.8	15±6*	1.3±0.6	3.5±2.4
PCB-126	nd	nd	nd	nd
PCB-132	nd	nd	nd	nd
PCB-138	41±15	263±67*	2.6±0.6	9±12
PCB-141	0.2±0.0	0.1±0.1	0.4±0.5	nd
PCB-146	3.5±1.0	32±15*	0.9±0.6	1.2±1.5
PCB-149	0.7±0.2	1.9±1.2	0.8±0.7	nd
PCB-151	0.2±0.1	0.2±0.1	0.5±0.6	nd
PCB-153	147±67	820±268*	5.0±1.5	36±43
PCB-170	66±28	375±123*	2.2±0.8	18±21
PCB-174	0.3±0.1	1.3±1.2*	0.3±0.3	0.4±0.3
PCB-177	0.7±0.4	3.6±2.1*	0.6±0.2	2.0±1.4
PCB-179	0.1±0.0	0.1±0.1	0.5±0.5	0.45
PCB-180	111±48	662±207*	3.5±1.3	33±37
PCB-182/187	5.4±2.2	54±35*	0.8±0.7	3.0±3.9
PCB-183	6.7±2.7	51±19*	0.9±0.5	2.2±2.5
PCB-194	38±13	179±69*	1.4±1.0	19±18
PCB-196	16±6	101±40*	1.1±0.6	8±8
PCB-206	15±6	59±31*	0.8±0.9	6.1±4.9
PCB tot	468±181	2626±802	26±14	140±152

3.5 Interne concentraties Zware metalen.

In deelonderzoek 2 (*Noorderplaat*) gaven de zware metalen overeenkomstig de PCB's een beeld te zien waarbij de concentraties in bosspitsmuizen over het algemeen hoger zijn dan in woelmuizen. Vooral de cadmiumconcentraties in bosspitsmuizen waren belangrijk hoger (15-23 x) dan in woelmuizen. Binnen de twee soorten bleken de cadmium concentraties ook significant verhoogd te zijn in de dieren gevangen in het buitendijkse gebied. Naast cadmium, waren ook lood en nikkel duidelijk hoger (1 tot 7x) in bosspitsmuizen. Deze twee metalen lieten in de bosspitsmuis echter geen verschillen zien in concentraties tussen de binnendijkse en buitendijkse vanggebieden. Voor de woelmuizen waren de concentraties in het buitendijkse gebied wel significant hoger. De concentraties van overige geanalyseerde metalen (Cu, Cr en Zn) waren maximaal ca. 2x hoger in de bosspitsmuis dan in de woelmuis en lieten geen significante verschillen tussen de vanggebieden zien. Ook in deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) zijn van zowel de bosspitsmuis als de woelmuis uit de

uiterwaarden en polder van de *Turfzakken* de concentraties van Cd, Cu en Pb in de nieren bepaald. De concentraties zware metalen in de bosspitsmuis waren gemiddeld 2 tot 3x hoger dan in de woelmuis. Een uitzondering hierop was de Cd concentratie in bosspitsmuizen uit de polder, die gemiddeld 6x hoger was dan in de woelmuis. Op basis van de zware metalen zijn echter geen significante verschillen tussen de gebieden waar te nemen (zie tabel 3.6).

Tabel 3.6. Zware metalen in nieren (mg/kg).

			Cu	Cr	Ni	Cd	Pb	Zn
BSM	NP	polder	10±2.6 (8)	0.3±0.1 (4)	1.1±0.5 (7)	11±7 (8)	1.0±0.6 (8)	28±6 (8)
		uiterw	10±2 (7)	0.5±0.6 (6)	1.2±1.0 (6)	35±14 (7)***	1.3±0.4 (7)	32±11 (7)
	TZ	polder	31±15 (4)	na	na	53±55 (4)	3.5±1.6 (4)	na
		uiterw	29±5 (7)	na	na	16±7 (7)	8±5 (7)	na
WM	NP	polder	4.3±1.2 (5)	0.2±0.0 (3)	0.2±0.0 (5)	0.5±0.1 (5)	0.1±0.1 (5)	19±2 (5)
		uiterw	6±2 (10)	0.5±0.6 (6)	1.0±0.4 (9)***	2.4±1.4 (10)**	0.3±0.1 (10)**	29±15 (10)
	TZ	polder	14-16 (2)	na	na	8.8-9.1 (2)	0.9-101 (2)	na
		uiterw	15±4 (13)	na	na	8±6 (13)	3.1±3.0 (13)	na

BSM = Bosspitsmuis; WM = woelmuis; NP = Noorderplaat; TZ = Turfzakken. Significante verschillen tussen de polder en uiterwaard zijn aangegeven met * als $p \leq 0.05$, ** als $p \leq 0.01$ en *** als $p \leq 0.005$.

3.6 BSAF.

In deelonderzoek 2 (*Noorderplaat*) en 3 (*Turfzakken*) is voor de de bosspitsmuis en de woelmuis de biota (ds)/grond (ds) bioaccumulatiefactor (BSAF) berekend voor de verschillende metalen. Bij de dieren uit de *Noorderplaat* gaf Cadmium in de bosspitsmuis als enige van de geanalyseerde metalen een $BSAF > 1$ te zien. In alle andere gevallen was de $BSAF < 1$. In de woelmuis nam de BSAF voor de verschillende metalen af in de volgorde $Cd \geq Cu > Zn \geq Ni > Cr > Pb$. Voor de bosspitsmuis was deze volgorde nagenoeg gelijk, uitgezonderd voor de laatste twee elementen die onderling gewisseld zijn: $Cd \geq Cu > Zn \geq Ni > Pb > Cr$.

Bij de dieren uit de *Turfzakken* (deelonderzoek 3) blijkt van de drie metalen waarvan de concentraties in de nieren gemeten zijn, vooral Cd duidelijk te accumuleren ($BSAF \gg 1$) in dieren uit de polder. Een groot verschil is echter te zien tussen de BSAF's zoals berekend voor de polder en zoals berekend voor de uiterwaard, waar voor zowel de bosspitsmuis als de woelmuis geldt dat $BSAF < 1$. Voor Cu en Pb werd voor beide soorten in bijna alle gevallen ook geen accumulatie (ds/ds) waargenomen ($BSAF < 1$). De enige uitzondering hierop is Cu in bosspitsmuizen in de polder ($BSAF=2$) (zie tabel 3.7).

Tabel 3.7. Biota/grond (ds/ds) accumulatiefactoren (BSAF) voor zware metalen in de woelmuis en de bosspitsmuis uit de Noorderplaat en Turfzakken.

	woelmuis				bosspitsmuis			
	NP polder	TZ	NP uiterwaard	TZ	NP polder	TZ	NP uiterwaard	TZ
Cd	0,2	6	0,2	0,3	4,5	36	2,8	0,7
Cu	0,2	0,9	0,05	0,1	0,4	2	0,1	0,2
Pb	0,001	0,02	0,001	0,01	0,01	0,06	0,004	0,02
Zn	0,07		0,02		0,10		0,03	
Ni	0,005		0,02		0,04		0,03	
Cr	0,004		0,003		0,006		0,003	

N.B. Zn, Ni en Cr zijn in deelonderzoek 3 (de Turfzakken) niet geanalyseerd.

3.7 Bioassay analyses

In de DR-CALUX[®] assay resulteerden extracten van grond en regenwormen uit de uiterwaard in een duidelijke verhoging van de respons in vergelijking met de extracten uit de polder. Extracten van woelmuis levers (één mengmonsters per locatie) gaven geen respons in de CALUX[®] assay (zie tabel 3.8).

Tabel 3.8. DR-CALUX[®] responsen van luchtdeposities, grondmonsters en regenwormen in de Biesbosch.

monster	DR-CALUX [®] respons		eenheid	inductie-factor
	polder	uiterwaard		
luchtdepositie 27-5-98	-	32 ± 8.3	µg BaP-eq/m ² per 14 dagen	nvt
luchtdepositie 10-6-98		39 ± 6.3	µg BaP-eq/m ² per 14 dagen	nvt
grond 0-2 cm	62.2 ± 7.2	316 ± 22	BaP-eq mg/kg natgewicht	14.6 x
grond 3-10 cm	27.0 ± 2.5	201 ± 5.5	BaP-eq mg/kg natgewicht	29.5 x
grond 0-2 cm	829 ± 96	1761 ± 121	BaP-eq mg/kg organischestof	8.4 x
grond 3-10 cm	644 ± 59	1356 ± 38	BaP-eq mg/kg organischestof	8.4 x
regenwormen (6-98)	16.4 ± 0.8	37.3 ± 3.6	BaP-eq mg/kg vet	2.2 x
woelmuis (lever)	nd (dl = 252)	nd (dl = 252)	BaP-eq mg/g vet	

dl = detectielimiet

3.8 Morfometrie

Bij sectie van de bosspitsmuizen uit *de Dood* en het bijbehorende referentiegebied *Turfzakken*, bleek dat het ontwikkelingsstadium van de mannelijke dieren verschilde tussen de twee vanggebieden. De mannelijke dieren uit het referentiegebied de *Turfzakken* verkeerden in het subadulte levensstadium, terwijl de gevangen dieren uit de verontreinigde uiterwaarden in het adulte stadium verkeerden. Het levergewicht en het hersengewicht van de uiterwaarddieren was significant hoger dan dat van referentiedieren. Er zijn geen verschillen tussen de beide gebieden waargenomen op grond van het lichaamsgewicht of het niergewicht, ook niet wanneer de resultaten per geslacht of per ontwikkelingsstadium apart geanalyseerd werden.

Wanneer de lichaams- en orgaangewichten van de bosspitsmuizen uit de *Noorderplaat* beschouwd worden, blijkt alleen voor het testesgewicht een significant verschil tussen de twee vanggebieden waar te nemen. Dit verschil is echter niet terug te vinden voor het relatieve testesgewicht (testes somatische index; TSI). Bij de woelmuizen bleek het aantal embryo's, het lichaamsgewicht, het levergewicht en het niergewicht significant hoger in dieren uit het binnendijkse gebied. De verschillen in lichaamsgewicht werden voor een belangrijk deel bepaald door de meege dragen embryo's. Het verschil in levergewicht is niet terug te vinden in het relatieve levergewicht (LSI), wat niet verschillend was tussen de twee vanggebieden.

Het lichaamsgewicht van de bosspitsmuizen uit de *Turfzakken* varieerde van 6 tot 8g voor juveniele dieren en volwassen mannetjes en van 9 tot 16 g voor drachtige vrouwtjes. Voor de woelmuizen varieerde de gewichten voor zowel juvenielen als voor adulten van 18 tot 27 g. Er zijn geen significante verschillen tussen de twee locaties waargenomen. Ook de orgaangewichten varieerden sterk binnen de verschillende locaties. Geen van de orgaangewichten liet een significant verschil tussen de twee locaties zien. Niet voor het totaal, nog uitgesplitst naar geslacht of levensstadium (zie tabel 3.9).

Tabel 3.9. Sectiegegevens bosspitsmuis en woelmuis.

BSM	n(m/v)	lich gew	embryo's	lever	nier	testis	hersenen	LSI	TSI
dDrefTZ	3	8.8±2.4	-	426±133	133±4	-	206±14	4.8±0.3	-
dD	9	8.6±0.9	-	520±76	133±14	-	245±26*	6.1±0.8*	-
NPpld	10(5/5)	112.4±1.9	7.4±1.8	712±92	87±13	366±43	-	59±10	30±3
NPuit	7(4/3)	11.7±0.9	8.0±1.7	675±88	95±14	632±211*	-	58±5	36
TZpol	4	10.3±4.6	-	641±299	159±47	-	192±33	6.1±1.2	-
TZuit	8	7.7±0.9	-	550±197	116±50	-	222±17	7.1±1.8	-

WM	n	lich gew	embryo's	lever	nier	testis	hersenen	LSI	TSI
NPpld	5(2/3)	40±11	7.0±1.0	2136±105	312±105	-	-	52±11	-
NPuit	10(6/4)	20±3***	2.3±2.9*	1166±241*	155±34**	-	-	59±13	-
				**	*				
TZpld	2	23.5	-	1341	336	-	523	5.7	-
TZuit	13	24.3±5.7	-	1623±411	371±74	-	543±24	6.8±1.3	-

N.B. dD = de Dood, NP = Noorderplaat, TZ = Turfzakken. BSM = bosspitsmuis. WM = woelmuis. Indien geen gegevens aanwezig, is dit aangegeven met "-".

Significantieniveaus van de verschillen tussen uiterwaard en bijbehorend referentiegebied zijn aangegeven met * ($p < 0.05$) of *** ($p < 0.001$).

3.9 AROD

EROD activiteiten in bosspitsmuizen uit deelonderzoek 1 (*de Dood*) varieerden van 20 tot 325 pmol/min.mg, waarbij de gemiddelde activiteit in de uiterwaard significant 4.4x verhoogd is in vergelijking met de EROD in dieren uit het bijbehorende referentie gebied de *Turfzakken*. In deelonderzoek 2 (*Noorderplaat*) varieerden de EROD activiteiten in dezelfde soort van 2 tot 8 pmol/min.mg. en werden geen verschillen tussen de polder en de uiterwaard waargenomen. In deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) varieerde EROD in de bosspitsmuis van 21 tot 234 pmol/min.mg, waarbij de gemiddelde activiteit in uiterwaard ca.2x verhoogd is in vergelijking met de dieren uit de polder.

In deelonderzoek 2 en 3 is ook de EROD activiteit in woelmuizen gemeten. Bij de *Noorderplaat* was deze, net als bij de bosspitsmuis, uitzonderlijk laag en varieerde van 3 tot 12 pmol/min.mg. waarbij geen verschillen tussen de polder en de uiterwaard waargenomen zijn. In woelmuizen uit de *Turfzakken* varieerde EROD van 73 tot 267 pmol/min.mg. en was, net als bij de bosspitsmuizen, in de uiterwaarden ca. 2 x hoger dan in de polder (zie fig. 3.2).

Bij vergelijking van de verschillende geslachten of leeftijdscategorieën (juveniel/sub-adult/adult) zijn, mogelijk mede door de geringe aantallen per groep, geen significante verschillen waargenomen.

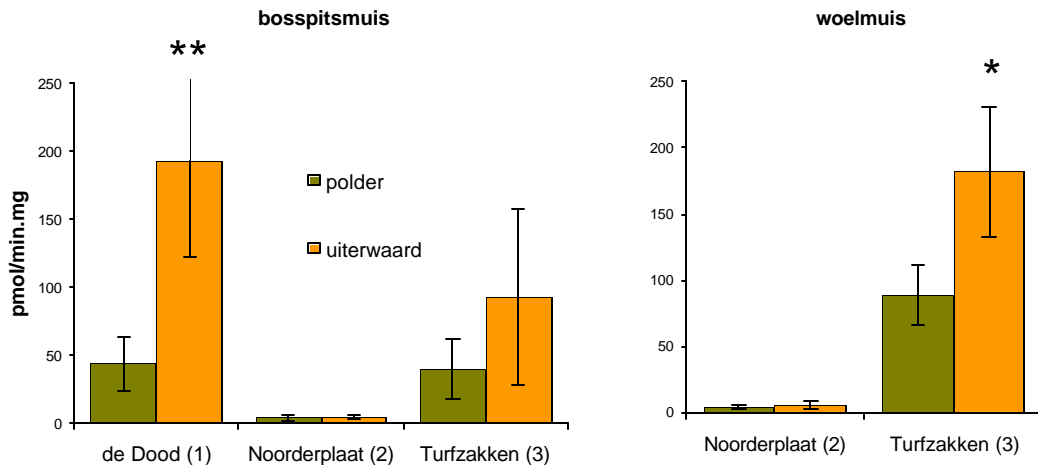
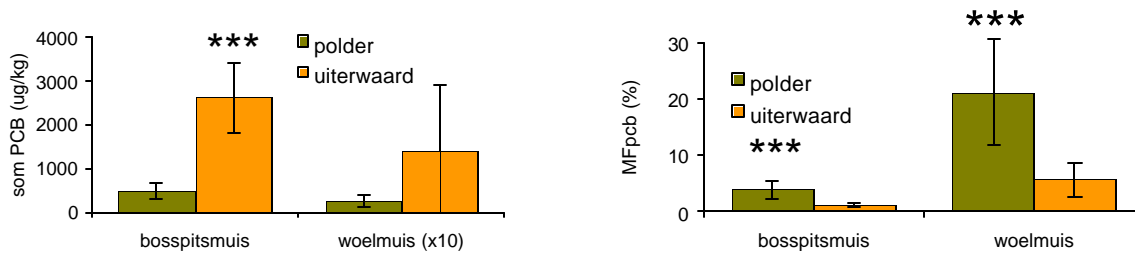


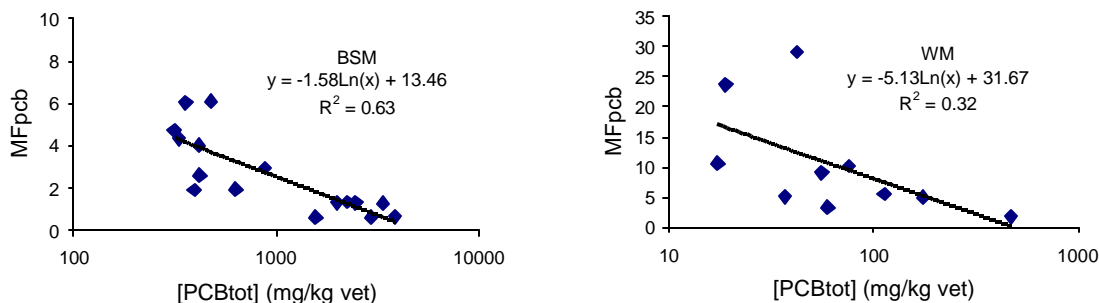
Fig. 3.2. EROD activiteit in bosspitsmuizen en woelmuizen uit de verschillende deelonderzoeken (de Dood, Noorderplaat en Turfzakken). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

3.10 Metaboliseerbare fracties - MF_{PCB} .

De MF_{pcb} is alleen onderzocht in deelonderzoek 2 (*Noorderplaat*). Wanneer van de geanalyseerde PCB's de metaboliseerbare fractie MF_{PCB} berekend wordt, blijkt voor zowel de bosspitsmuis als de woelmuis een significant verschil tussen de polder en de uiterwaard, waarbij de MF_{PCB} in de uiterwaard lager is. Bij vergelijking van de twee diersoorten, blijkt de MF_{PCB} in de bosspitsmuis significant lager dan in de woelmuis. Deze verschillen gaan gepaard met een omgekeerd verschil in de totaal PCB concentraties (zie Fig. 3.3). De relatie tussen $[PCB]_{tot}$ en MF_{PCB} op individueel niveau is weergegeven in Fig. 3.4. Hieruit blijkt dat bij een toenemende PCB concentratie de MF_{PCB} afneemt.



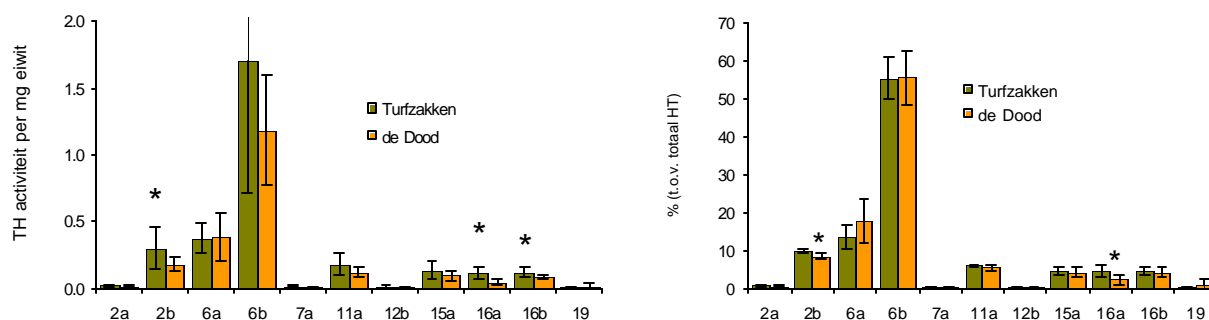
Figuur 3.3. Som PCB concentraties (links) en metaboliseerbare fractie (rechts) in onderhuids vet van bosspitsmuis en woelmuis. *** $p < 0.005$.



Figuur 3.4. Relatie tussen som PCB en MF_{PCB} in de bosspitsmuis (links) en de woelmuis (rechts).

3.11 Testosteronhydroxylase.

Testosteronhydroxylase is alleen in deelonderzoek 1 (*de Dood*) onderzocht. Bij vergelijking van de testosteronhydroxylase activiteiten blijkt de 16α - en 16β -TH activiteit in dieren uit de verontreinigde locatie bij de polder *de Dood* significant lager dan in dieren uit de referentie polder de *Turfzakken* (zie Fig. 3.5 en tabel 3.10). Wanneer de relatieve activiteiten beschouwd worden, blijkt een significant verschil op de 2β - en 16α -posities.



Figuur 3.5. Microsomale Testosteronhydroxylase activiteit in de lever van bosspitsmuizen uit de polder de Turfzakken (referentie) en de polder de Dood: Boven: Absolute activiteiten; Onder: Relatieve activiteiten (t.o.v. totale TH activiteit). N.B. * significant ($p < 0.05$) verschil tussen de Turfzakken en de Dood.

Tabel 3.10. Microsomale Testosteronhydroxylase activiteit in de lever van bosspitsmuizen uit de polder de Turfzakken (referentie) en de polder de Dood.

	Turfzakken	de Dood
2-a-OHT	0.019 ± 0.07	0.012 ± 0.006
2-b-OHT	0.30 ± 0.16	0.18 ± 0.05 ^A
6-a-OHT	0.38 ± 0.11	0.38 ± 0.18
6-b-OHT	1.7 ± 1.0	1.2 ± 0.4
7-a-OHT	0.013 ± 0.008	0.007 ± 0.007
11-a-OHT	0.18 ± 0.08	0.12 ± 0.04
12-b-OHT	0.011 ± 0.011	0.003 ± 0.008
15-a-OHT	0.14 ± 0.06	0.09 ± 0.04
16-a-OHT	0.12 ± 0.04	0.05 ± 0.02 ^A
16-b-OHT	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.01 ^A
19-OHT	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.03
Androsteendion	7.4 ± 1.3	10.0
11-b-OHT	3.6 ± 0.6	4.3

TH activiteit per mg eiwit

^A significant ($p \leq 0.05$) verschillend van de referentie polder de Turfzakken.

3.12 Steroïdhormonen

Bij dieren uit *de Noorderplaat* (deelonderzoek 2), bleken de plasmatestosteronspiegels in de bosspitsmuis ongeveer 100x hoger te zijn dan in de woelmuis. In de bosspitsmuis werden echter geen verschillen tussen de polder en de uiterwaard waargenomen. Een dergelijk verschil is wel te zien voor de woelmuis en bleek marginaal significant ($p= 0.06$) voor de mannelijke dieren. De testosteronspiegels bleken voor de woelmuis weinig verschillend voor mannelijke en vrouwelijke dieren. Bij de bosspitsmuis zijn de hormoonspiegels niet gemeten in de vrouwelijke dieren.

In dieren uit *de Turfzakken* (deelonderzoek 3), zijn de steroïdhormonen testosteron, progesteron en 17β -oestradiol in het bloedplasma van beide diersoorten bepaald. De testosteron concentraties in bosspitsmuis varieerden van 0.1 tot 2.1 ng/ml. In de woelmuis varieerden deze van 0.4 tot 10 ng/ml. In de bosspitsmuis en woelmuis varieerden de progesteronconcentraties van respectievelijk 0.7 tot 19 ng/ml en 0.7 tot 38 ng/ml. De concentraties 17β -oestradiol varieerden respectievelijk van 0.02 tot 2.8 ng/ml en 0.1 tot 1.0 ng/ml. Door de geringe aantallen per analyse-klasse (man/vrouw juveniel/adult), of zelfs het ontbreken van enkele analyse-klassen en de variaties in de concentraties per analyse-klasse, zijn eventuele verschillen moeilijk significant aan te tonen. De gegevens laten alleen een vergelijking tussen de twee vanggebieden (polder en uiterwaard) toe voor juveniele vrouwtjes (? juv) bosspitsmuizen en mannelijke en vrouwelijke adulte (? adult, ? adult) woelmuizen. Van de andere categorieën zijn geen meetresultaten uit beide gebieden aanwezig. De gemiddelde testosteronconcentratie in ? juv bosspitsmuizen is in de uiterwaard ca. 2x hoger dan in de polder ($p=0.3$). De gemiddelde progesteronconcentraties zijn gelijk en de oestradiolconcentraties zijn ca 40% lager in de uiterwaard ($p=0.7$). Hetzelfde

patroon is herkenbaar in de ? adult woelmuizen. De ? adult woelmuizen geven een ander beeld met gelijkblijvende testosteron concentraties en verhoogde progesteron concentraties (zie tabel 3.11).

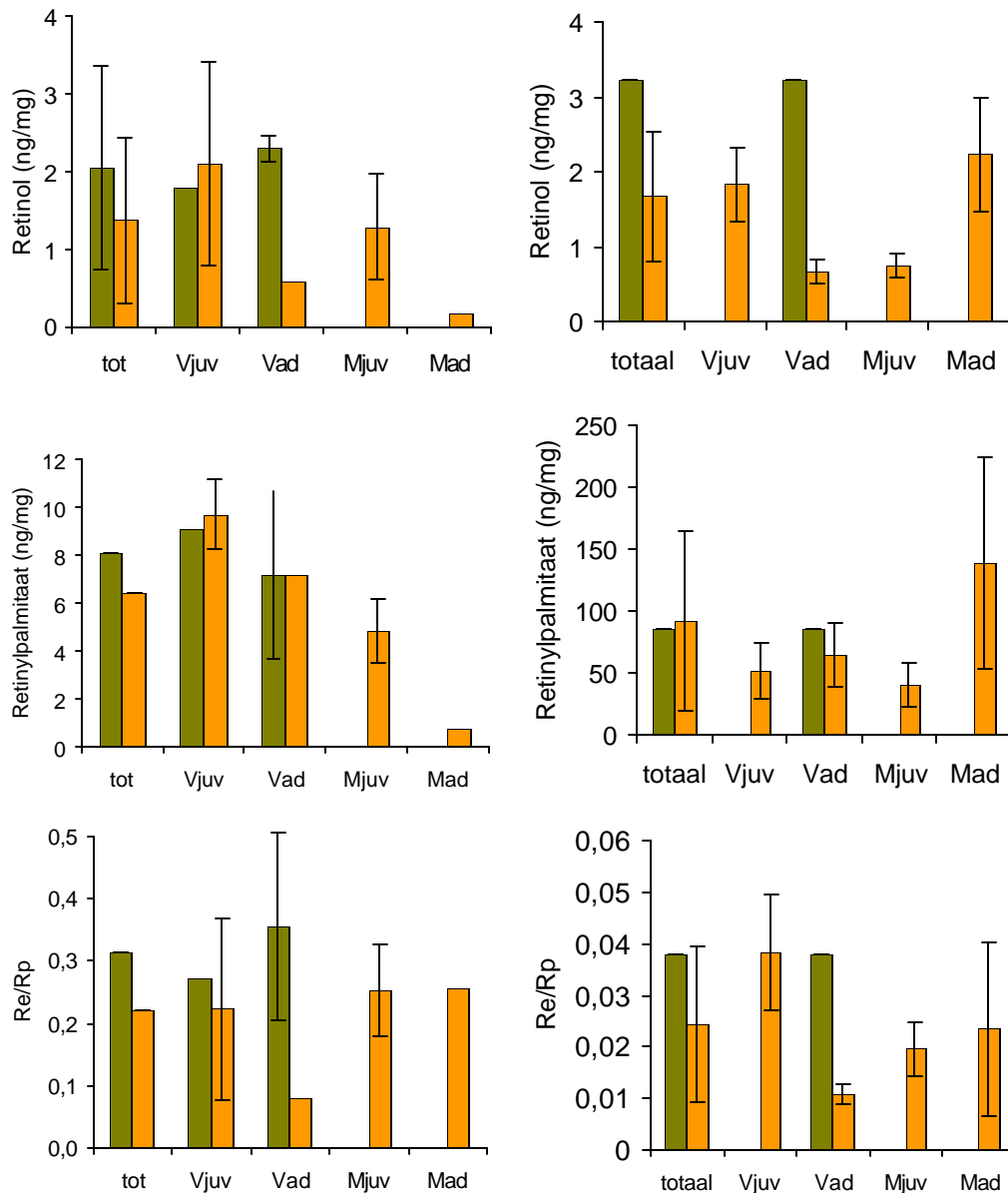
Tabel 3.11. Steroïdhormonen in plasma van Bosspitsmuis en Woelmuis.

	Leeftijd	n	testosteron		progesteron		oestradiol	
			man	vrouw	man	vrouw	man	vrouw
Bosspitsmuis								
NP polder	jvnl	0/0	-	-	-	-	-	-
	adlt	4/0	579±118	-	-	-	-	-
NP uiterw	jvnl	0/0	-	-	-	-	-	-
	adlt	4/0	570±114	-	-	-	-	-
TZ polder	jvnl	0/2	-	1.6±0.3	-	17±3 (2)	-	5.2±7.3 (2)
	adlt	0/2	-	0.8±0.6	-	56±5 (2)	-	6.8±2.5 (2)
TZ uiterw	jvnl	3/3	2.5±0.1	4.2±3.0	25±13	20±16	7.6±3.2	3.1±2.9
	adlt	1/0	0.4	-	2.1	-	1.0	-
Woelmuis								
NP polder	jvnl	0/0	-	-	-	-	-	-
	adlt	2/2	1.3±0.3	2.1±0.8	-	-	-	-
NP uiterw	jvnl	0/0	-	-	-	-	-	-
	adlt	3/3	6.2±2.3*	10.5±12.6	-	-	-	-
TZ polder	jvnl	0/0	-	-	-	-	-	-
	adlt	1/1	6.0	1.7	6.5	34	3.3	3.9
TZ uiterw	jvnl	2/3	19.8±22	2.0±0.9	3.7±0.6	76±21	0.8±0.3	2.3±0.3
	adlt	5/2	8.8±4.5	1.8±0.1	6.6±3.9	119±2	1.3±0.9	2.2±0.4

NB. concentraties in nmol/l. Leeftijd is aangegeven met jvnl (juveniel) of adlt (adult). Significante verschillen tussen uiterwaard en bijbehorend referentiegebied zijn aangegeven met * indien $p \leq 0.05$.

3.13 Vitamine A

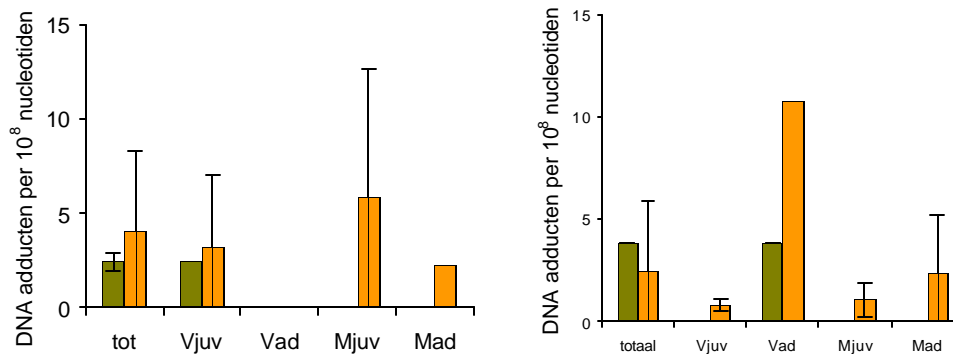
Vitamine A is alleen in deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) gemeten. Uit analyse van vitamine A (retinol & retinylpalmitaat) blijkt geen significant verschil tussen de twee verschillende locaties, noch voor de bosspitsmuis, noch voor de woelmuis. Ook bij uitsplitsing naar de verschillende leeftijdscategorieën of geslachten, werden geen significante verschillen waargenomen (zie Fig. 3.6).



Figuur 3.6. Retinol en retinylpalmitaat concentraties in lever van bosspitsmuis (links) en rosse woelmuis (rechts) uit de polder de Turfzakken (groen) en de naastgelegen uiterwaard (oranje).

3.14 DNA adducten

DNA adducten zijn alleen in deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) gemeten. Bij beschouwing van de aantallen DNA adducten in het hart blijkt een grote variatie in de aantallen. Er zijn geen significante verschillen tussen de twee onderzochte locaties aangetoond (zie Fig. 3.7). Ook blijken geen significante verschillen tussen de beide diersoorten.



Figuur 3.7. DNA adducten in het hart van bosspitsmuizen (links) en woelmuizen (rechts) uit de polder de Turfzakken (groen) en de naastgelegen uiterwaard (oranje).

3.15 Histopathologie

Bij een globale microscopische beoordeling van de geslachtsorganen zijn in geen van de gevallen bijzonderheden opgemerkt. Voor een kwantitatieve en statistisch betrouwbare beoordeling van eventuele locatiegebonden verschillen waren in de meeste gevallen te weinig dieren beschikbaar. Desondanks zijn voor een nadere beoordeling van de vrouwelijke dieren uit de verschillende deelonderzoeken de ovaria onderzocht op afwijkingen in het aantal en oppervlak van corpora lutea, primordiale-, groeiende- en artretische follikels. Bij bosspitsmuizen uit de *Noorderplaat* is hierbij een verschil in het oppervlak van het corpus luteum geconstateerd, waarbij de dieren uit de verontreinigde uiterwaard een significant ($p=0.025$) grotere waarde vertoonden dan de dieren uit de polder. In geen van de overige gevallen (ander diersoort, locatie of effectparameter) zijn significante locatiegebonden afwijkingen gevonden.

Bij de mannelijke dieren zijn de diameter van de tubuli seminiferi en het aantal spermatiden en spermatozoën onderzocht. Deze parameters gaven geen verschillen tussen gebieden te zien.

3.16 Interne dosis-effect relaties

3.16.1 de Dood

Bij de dieren uit *de Dood* zijn geen interne concentraties van stoffen gemeten. Wel kan bij deze dieren de EROD activiteit gebruikt worden als maat voor de interne blootstelling aan PCB's en aanverwante stoffen die via de Ah-receptor werken. Bij een analyse van de relaties tussen EROD en de verschillende effectparameters die gemeten zijn, bleek alleen een matig significante ($p \leq 0.1$) relatie met het relatief levergewicht (Lever Somatische Index/LSI). Overige effectparameters waren niet gerelateerd aan EROD (zie tabel 3.12).

Tabel 3.12. Regressie analyses EROD versus effectparameters bij bosspitsmuizen uit de Dood en referentiegebied (Turfszakken).

Effect	n	r ²	p
lichaamsgewicht	11	-0.24	
lever totaal	11	0.31	
LSI	11	0.53	p ≤ 0.1
histo	7	0.09	
milt	4	-0.31	
nier l+r	11	-0.06	
ovarium	4	-	
testes	11	0.05	
hersenen	11	0.37	

3.16.2 Noorderplaat

Bij berekening van de interne dosis-effect relaties zijn deze gebaseerd op het totale PCB gehalte (Σ -PCB) of op PCB #153 als gidsmolecuul. Daarnaast zijn van de verschillende effectparameters ook de relaties met MF_{PCB} en EROD bepaald. Deze twee parameters zijn gebruikt als maat voor de totale inwendige blootstelling aan dioxine-achtige stoffen (dioxinen, furanen, PCB's en PAK's). Tenslotte zijn ook de relaties bepaald met Cd, als zijnde de enige van de geanalyseerde metalen die voor beide diersoorten een significant verschil tussen de twee gebieden laat zien en bovendien de enige van de metalen met een BSAF>1 (in de bosspitsmuis).

Bosspitsmuis

Uit de regressie analyses blijken in de bosspitsmuis alleen significante positieve relaties voor de interne PCB concentratie met het testes gewicht (p≤0.01) bij de mannelijke bosspitsmuis en met het oppervlakte ingenomen door corpora lutea in vrouwelijke dieren (p<0.05). Er is geen significante relatie aangetoond tussen de interne PCB concentratie en de EROD activiteit. Ook bleek geen significante relatie tussen MF_{PCB} en EROD. MF_{PCB} gaf wel een significante relatie met het niergewicht (p<0.05) en een marginaal significante relatie met het testesgewicht in mannelijke dieren en het aantal embryo's in zwangere vrouwelijke dieren (p=0.1). Wanneer EROD als verklarende variable wordt ingevoerd, blijkt een significante relatie met het levergewicht (p<0.05), en een marginaal significante relatie (p≤0.1) met het testesgewicht en het aantal spermatozoën in de tubuli seminiferi van mannelijke dieren. Cd liet een significante relatie zien met het testesgewicht (p<0.05) en in mindere mate met het levergewicht en het oppervlakte van het interstitium in het ovarium (p≤0.1; zie tabel 3.13).

Woelmuis

In de woelmuis bleek een significant effect tussen Σ PCB en het aantal embryo's bij zwangere vrouwelijke dieren (p<0.02). Marginaal significante effecten werden gevonden tussen Σ PCB of PCB#153 en het oppervlakte van het ovarium, de corpora lutea en het aantal niet primordiale follikels in het ovarium. Ook in de woelmuis is geen significante relatie tussen PCB of MF_{PCB} en EROD aangetoond. MF_{PCB} bleek

wel significant gerelateerd aan het niergewicht en het ovariumoppervlakte. EROD daarentegen bleek gecorreleerd met het aantal embryo's in drachtige vrouwtjes en het oppervlakte van het corpus luteum in het ovarium. Cadmium liet de meeste significante relaties met de geanalyseerde effectparameters zien en bleek gerelateerd aan het lichaamsgewicht, het levergewicht, niergewicht, en het aantal follikels (totaal aantal en aantal niet-primordiale follikels) (zie tabel 3.14).

Tabel 3.13. Regressie analyses interne dosis-effect relaties in de bosspitsmuis.

	n	PCB tot		PCB 153		MF pcb		ER OD		Cd	
		r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p
lichaamsgew (g)	16	0,00		0,00		0,06		0,02		0,07	
lever (mg)	15	0,02		0,01		0,01		0,18	<0.1	0,20	<0.1
LSI (%)	13	0,02		0,01		0,10		0,10		0,00	
nier (rechts) (mg)	15	0,11		0,15		0,28	<0.05	0,05		0,01	
testes (mg)	8	0,87	<0.001	0,91	<0.001	0,34	=0.1	0,65	=0.01	0,59	<0.05
TSI (%)	6	0,53	<0.1	0,56	<0.1	0,00		0,19		0,43	
testosteron (nmol/l)	8	0,12		0,16		0,06		0,08		0,12	
tubuli seminiferi (diam)	9	0,13		0,14		0,00		0,07		0,16	
ronde spermatiden (#)	9	0,16		0,19		0,02		0,01		0,11	
spermatozoën (#)	9	0,21		0,26		0,23		0,48	<0.05	0,02	
embryo's (#)	6	0,14		0,14		0,49	<0.1	0,11		0,01	
ovarium (opp)	6	0,00		0,00		0,18		0,00		0,12	
intererstitium (opp%)	6	0,21		0,14		0,02		0,33		0,41	=0.1
corpus luteum (#)	6	0,07		0,04		0,11		0,11		0,38	
corpus luteum (opp)	6	0,52	=0.05	0,57	<0.1	0,15		0,28		0,14	
follikels (#)	6	0,10		0,08		0,01		0,08		0,19	
primordiale follikels (#)	6	0,02		0,00		0,00		0,19		0,21	
niet prim follikels (#)	6	0,16		0,18		0,02		0,00		0,04	
EROD (pmol/min.mg)	14	0,00		0,02		0,00		1,00		0,02	

Berekening p waarden op basis van tweezijdige toetsing. Bij $p > 0.1$ zijn geen resultaten vermeld.

3.16.3 Turfzakken

Bosspitsmuis

Wanneer dosis-effect relaties op basis van de interne concentraties en de effecten op individueel niveau beschouwd worden, blijken in de bosspitsmuis het lichaamsgewicht en diverse orgaangewichten (lever, nieren, maag, hersenen) significant positief gecorreleerd met de interne cadmium en/of koperconcentraties (zie tabel 3.15 en Figuur 3.8). Cd en Cu zijn onderling matig gecorreleerd ($p < 0.1$). Pb is niet gecorreleerd aan Cd of Cu. Wanneer de correlaties beschouwd worden tussen de verschillende effectparameters en EROD als maat voor de blootstelling aan dioxineachtige verbindingen, blijkt een negatieve significante correlatie met de progesteronconcentratie (zie Fig. 3.9).

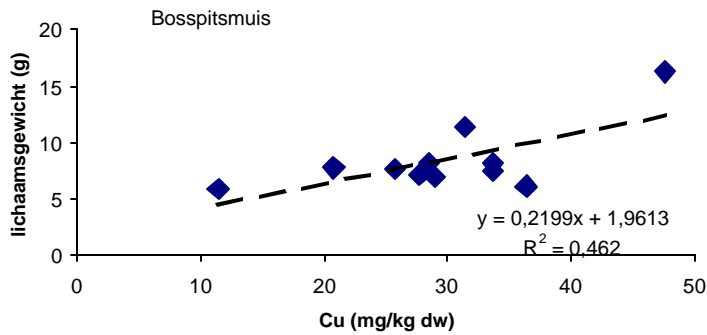
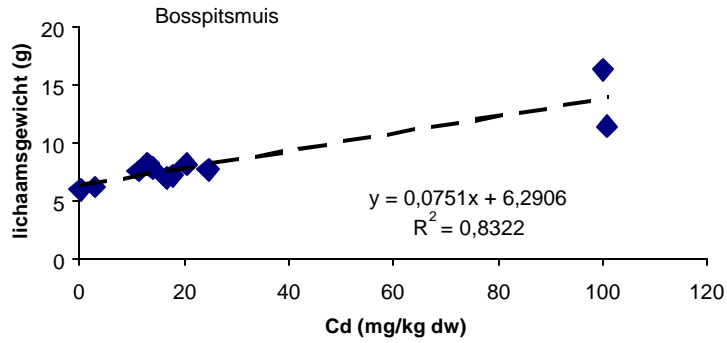
Tabel 3.14. Regressie analyses interne dosis-effect relaties in de woelmuis

	n	PCB tot		PCB 153		MF pcb		ER OD		Cd	
		r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p
lichaamsgew (g)	14	0,10		0,08		0,18		0,11		0,28	<0.05
lever (mg)	15	0,16		0,15		0,22	<0.1	0,04		0,31	<0.05
LSI (%)	14	0,00		0,00		0,01		0,08		0,02	
nier (rechts) (mg)	14	0,11		0,13		0,28	<0.05	0,05		0,30	<0.05
testosteron (nmol/l)	11	0,00		0,01		0,06		0,01		0,06	
embryo's (#)	7	0,68	<0.02	0,52	<0.1	0,37		0,86	<0.01	0,15	
ovarium (opp)	4	0,78	<0.1	0,64		0,95	<0.01	0,62		0,64	
intererstitium (opp%)	4	0,17		0,27		0,02		0,29		0,35	
corpus luteum (#)	4	0,75	<0.1	0,77	<0.1	0,23		0,30		0,12	
corpus luteum (opp)	4	0,04		0,09		0,15		0,89	<0.05	0,16	
follikels (#)	4	0,34		0,25		0,79	<0.1	0,41		0,87	<0.05
primordiale follikels (#)	4	0,14		0,24		0,07		0,49		0,02	
niet prim follikels (#)	4	0,74	<0.1	0,71		0,70		0,10		0,97	<0.01
EROD (pmol/min.mg)	14	0,04		0,03		0,02		1,00		0,00	

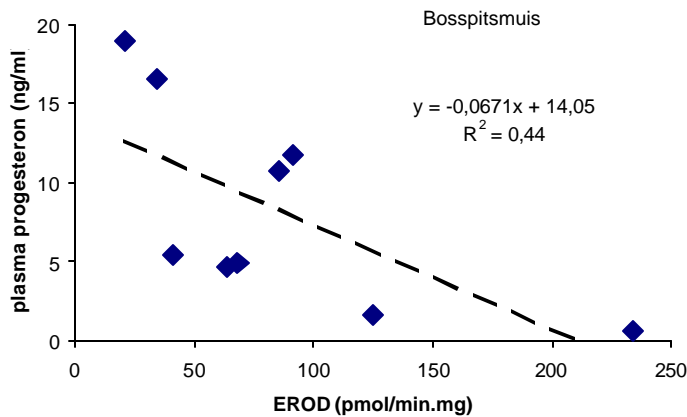
Tabel 3.15. Regressie resultaten Bosspitsmuis

Code	n ^A	Cd		Cu		Pb		EROD	
		r ²	p<	r ²	p<	r ²	p<	r ²	p<
Lichaamsgewicht (g)	11	0,83	0,001	0,46	0,02	0,01		0,31	0,1
Lever totaal (mg)	11	0,93	0,001	0,39	0,05	0,10		0,27	
LSI	11	0,00		0,01		0,34	0,1	0,00	
Galblaas (mg)	11	0,07		0,19		0,06		0,00	
Nieren (mg)	11	0,78	0,001	0,10		0,00		0,03	
Maag (mg)	11	0,40	0,05	0,59	0,01	0,00		0,09	
Longen (mg)	11	0,04		0,33	0,1	0,02		0,16	
Hersenen (mg)	11	0,24		0,00		0,01		0,07	
Kleine hersenen (mg)	11	0,21		0,65	0,01	0,07		0,00	
Grote hersenen (mg)	11	0,41	0,05	0,06		0,00		0,08	
EROD(pmol RR/mg/min)	10(11)	0,30	0,1	0,02		0,08		1,00	
PROD (pmol RR/mg/min)	10(11)	0,31	0,1	0,00		0,03		0,93	0,001
Retinol (ng/mg)	11	0,09		0,01		0,25		0,05	
Retinylpalmitaat (ng/mg)	11	0,00		0,00		0,02		0,19	
Re/Rp	11	0,28	0,1	0,01		0,28	0,1	0,03	
hartadduct per 10 ⁸	7(6)	0,01		0,21		0,27		0,01	
testosteron (pg/ml)	10(9)	0,10		0,17		0,32	0,1	0,05	
progesteron (pg/ml)	10(9)	0,68	0,01	0,13		0,003		0,47	0,05
oestradiol (pg/ml)	10(9)	0,04		0,16		0,003		0,38	0,1
Cu dw (mg/kg)	11(10)	0,28	0,1	1,00		0,20		0,02	
Pb dw (mg/kg)	11(10)	0,03		0,20		1,00		0,08	
Cd dw (mg/kg)	11(10)	1,00		0,28	0,1	0,03		0,30	0,1

^A wanneer tweede getal (tussen haakjes) is weergegeven, dan is dit een afwijkend aantal voor de EROD regressie analyse. Cursieve druk van p waarden geeft aan dat er een negatieve correlatie tussen de twee parameters bestond.



Figuur 3.8. Lichaamsgewicht van bosspitsmuizen uit de Turfzakken in relatie tot interne concentraties van cadmium (Cd; boven) en koper (Cu; onder).



Figuur 3.9. Plasma progesteron gehalten in bosspitsmuizen uit de Turfzakken in relatie tot de EROD activiteit.

Woelmuis

Wanneer dosis-effect relaties in de woelmuis beschouwd worden, blijken juist Cu en Pb onderling gecorreleerd ($p < 0,02$) en niet gecorreleerd met Cd. Het lichaamsgewicht en diverse orgaangewichten (lever, hersenen) bleken significant negatief gecorreleerd met Cu en/of Pb. Cd liet een significante negatieve correlatie met het relatieve levergewicht (LSI) zien. Vitamine A parameters bleken significant positief gecorreleerd met Cd

(retinylpalmitaat) en met Cu (retinol en ratio Re/Rp). Het aantal hart adducten bleek significant gerelateerd aan de interne Cd concentratie (zie tabel 3.16).

Tabel 3.16. Regressie resultaten Rosse Woelmuis.

	n	Cd		Cu		Pb		EROD	
		r ²	p<	r ²	p<	r ²	p<	r ²	p<
Lichaamsgewicht (g)	15	0,15		0,21	<i>0,10</i>	0,08		0,07	
Lever (mg)	15	0,04		0,22	<i>0,10</i>	0,03		0,00	
LSI	15	0,43	<i>0,01</i>	0,01		0,00		0,07	
Nieren (mg)	15	0,09		0,13		0,08		0,06	
Maag (mg)	15	0,00		0,17		0,04		0,08	
Longen (mg)	15	0,23	0,10	0,10		0,00		0,03	
Hersenen (mg)	15	0,03		0,21	<i>0,10</i>	0,43	<i>0,01</i>	0,00	
Kleine hersenen (mg)	15	0,00		0,26	<i>0,05</i>	0,35	<i>0,02</i>	0,03	
Grote hersenen (mg)	15	0,07		0,05		0,16		0,00	
EROD (pmol/mg/min)	15	0,14		0,17		0,18		1,00	
PROD (pmol/mg/min)	15	0,10		0,19		0,23	0,10	0,84	0,001
Retinol (ng/mg)	15	0,03		0,19	0,10	0,08		0,02	
Retinylpalmitaat (ng/mg)	15	0,47	0,001	0,04		0,04		0,15	
Re/Rp	15	0,22		0,35	0,02	0,21	0,10	0,01	
hartadduct per 10 ⁸	12	0,49	0,001	0,07		0,03		0,04	
testosteron	15	0,08		0,03		0,01		0,00	
progesteron	15	0,00		0,00		0,21	0,10	0,02	
estradiol	15	0,03		0,05		0,02		0,06	
Cu dw (mg/kg)	15	0,00		1,00		0,39	0,02	0,17	
Pb dw (mg/kg)	15	0,02		0,39	0,02	1,00		0,18	
Cd dw (mg/kg)	15	1,00		0,00		0,02		0,14	

N.B. cursieve druk van p waarden geeft aan dat er een negatieve correlatie tussen de twee parameters bestond.

4 Discussie

4.1 Bodemconcentraties

Uit de resultaten van de bodemconcentratiemetingen blijkt dat in elk van de drie deelonderzoeken de concentraties van alle geanalyseerde verontreinigingen (zware metalen en PAK's) in de uiterwaarden significant hoger zijn dan in de bijbehorende referentiegebieden (polders). Uit de resultaten bleek echter wel dat ook in de geselecteerde referentiegebieden sprake is van een geringe verontreiniging, waarbij de streefwaarden voor de bodem overschreden worden. Zowel de PAK's als de metalen Pb, Zn en Cd gaven een overschrijding van maximaal drie keer te zien.

In de uiterwaarden bij *de Dood*, de *Noorderplaat* en *Turfzakken* geven de PAK's en alle metalen een overschrijding van de streefwaarde voor de betreffende bodem te zien. Voor PAK's worden de streefwaarden 4 tot 17x overschreden. De interventiewaarden voor PAK's worden niet overschreden. Van de metalen lijken Ni en Cr geen ernstige risico's op te leveren. De concentraties zijn maximaal 2x hoger dan de streefwaarde. Cu en Pb nemen een tussenpositie in met overschrijdingen van de streefwaarde tot maximaal 4x voor Cu en 9x voor Cu. De bodemconcentraties van Cd en Zn zijn dermate hoog dat de interventiewaarden in de uiterwaarden bij de *Turfzakken* en de *Noorderplaat* ca. 2x overschreden worden. In de uiterwaarden bij *de Dood* zijn de bodemconcentraties voor deze metalen ongeveer gelijk aan de interventiewaarde. Op basis van de aangetroffen concentraties kan gesteld worden dat er in de Biesbosch sprake is van een ernstige bodemverontreiniging. Wanneer de verschillende uiterwaarden onderling vergeleken worden, blijkt de uiterwaard bij de *Turfzakken* het meest verontreinigd, gevolgd door de *Noorderplaat* en daarna *de Dood*.

De bodemconcentraties van PAK's en verwante stoffen zijn ook bio-analytisch bepaald met de CALUX[®] bioassay. In grondmonsters uit de polder en de uiterwaard werd respectievelijk 13 en 410 mg BaP-eq/kg ds gemeten (gemiddeld over 0-20 cm diepte respectievelijk 11 en 259 mg/kg natgewicht; drogestofgehalte 86% en 63%). De toegepaste 6 uren meting in de DR-CALUX[®] assay meet de stabiele én instabiele Ah-receptor actieve stoffen. De instabiele PAK's zijn hier dus bij inbegrepen. Wanneer de concentraties van de afzonderlijke PAK's (zoals met HPLC gemeten) vermenigvuldigd worden met de BaP-equivalentie factoren (BaP-EF) zoals eerder bepaald voor de individuele PAK's (Bosveld et al 2002), kan het mengsel ook op basis van de resultaten van de chemische analyses uitgedrukt worden in BaP-equivalenten. Deze berekeningen resulteren voor de polder en de uiterwaard in bodemconcentraties van ca. 0.4 en 8.3 mg BaP-eq/kg ds. Uit deze resultaten blijkt dat naast de gemeten PAK's in de bodem nog andere Ah-receptor actieve stoffen aanwezig zijn, die een respons veroorzaken. Uitgaande van het feit dat de aanwezige verontreiniging met het rivierslib afgezet is, wordt ook verwacht dat de bodem een complex mengsel van stoffen herbergt, inclusief PCB's en dioxinen, zoals die ook waargenomen zijn in andere studies die zich richten op het stroomgebied van de Rijn en Maas en de aanwezige verontreinigingen in het rivierwater, de waterbodems, en de

daarvan afhankelijke organismen (Wegman & Hofstee 1982; Beurskens et al 1993; Bosveld et al 1995; Hendriks et al 1998; Laane et al. 1999).

4.2 Bioaccumulatie en verwachte effecten

4.2.1 Bioaccumulatie in regenwormen

In de *Turfzakken* zijn DR-CALUX[®] bioassay metingen gedaan om de concentraties Ah-receptor actieve stoffen te bepalen in bodemmonsters en in regenwormen. Regenwormen vormen een belangrijk aandeel in het dieet van de bosspitsmuis. Bij een vergelijk tussen grond uit de polder en de uiterwaard, zijn de concentraties Ah-receptor actieve stoffen 8 tot 30 hoger in de uiterwaard. Bij regenwormen zijn de concentraties in de uiterwaard ca. twee keer hoger dan in de polder. Hieruit blijkt dat de grote verschillen in concentraties tussen de gebieden zoals waargenomen in de bodem, afnemen in de bodemfauna. De gemeten concentraties in regenwormen is 37 mg BaP-eq/kg vet. Bij een gemiddeld vetgehalte van ca 5.5% (Bosveld et al 2000) bedraagt het gehalte op versgewichtbasis ca. 2 mg/kg. Uit dosis-effect studies met de huisspitsmuis (Bosveld & de Bie 2001) is een LOEC voor EROD inductie gebleken van 6.6 mg/kg BaP in het voer. Deze gecombineerde resultaten suggereren dat er in de Biesbosch geen effecten van PAK's te verwachten zijn bij spitsmuizen.

4.2.2 zware metalen

Interne concentraties zware metalen zijn gemeten in deelonderzoek 2 (*Noorderplaat*) en 3 (*Turfzakken*). Wanneer de bosspitsmuis en de woelmuis beschouwd worden blijken de concentraties in de bosspitsmuis over het algemeen hoger. Dit verschil tussen de twee soorten is mogelijk te wijten aan het verschillende voedselpatroon, waarbij het dieet van de woelmuis hoofdzakelijk plantaardig van aard is en de bosspitsmuis voor een belangrijk deel foerageert op regenwormen en andere bodemmacrofauna. Zware metalen kunnen aanzienlijk accumuleren in deze macrofaunasoorten (Sample et al 1999, Rouabah & Descamps 2001, Kenette et al 2002). Vooral regenwormen zijn een belangrijke intermediair bij de overdracht van contaminanten vanuit de bodem naar kleine zoogdieren (Ma 2001). De verschillen in concentraties zware metalen in de bodem vinden echter niet overal hun weerspiegeling in de concentraties zoals aangetroffen in bosspitsmuizen en woelmuizen. In de *Noorderplaat* was in de bosspitsmuis alleen Cd significant ($p \leq 0.001$) hoger dan in de uiterwaard (3-5x verhoogd). In de woelmuis waren Cd, Ni en Pb significant ($p \leq 0.05$) verhoogd (respectievelijk 5x, 5x en 3x). Uit de analyseresultaten van zware metalen in dieren uit de uiterwaarden en polder van de *Turfzakken* bleek dat de aanzienlijke verschillen die in bodemconcentraties gevonden zijn (3 tot 16 x hogere concentraties in de uiterwaard dan in de polder), in de kleine zoogdieren zo goed als verdwenen zijn. Deze resultaten zijn mogelijk te verklaren uit het feit dat de gemeten bodemconcentraties gebaseerd zijn op een zeer beperkt aantal metingen, terwijl het vanggebied een veel groter oppervlakte bestrijkt. Verondersteld kan worden dat de dieren niet strikt gebonden zijn aan de locatie waar ze gevangen zijn

maar mogelijk ook gefoerageerd hebben in aangrenzende meer of minder verontreinigde gebieden.

De gemiddelde interne Cd concentratie in bosspitsmuizen varieert van 16 tot 35 mg/kg in de uiterwaarden van de *Turfzakken* en de *Noorderplaat*. In de polder de *Turfzakken* varieerden de interne Cd concentraties aanzienlijk. Waarden van 0,1, 11 en 100 mg/kg zijn aangetroffen. Uit een literatuuroverzicht van interne concentraties zware metalen in zoogdieren (Wegener et al 1999), blijkt de Cd concentratie in nieren van bosspitsmuizen uit referentielocaties gemiddeld 13 mg/kg te bedragen. De gemiddelde interne Cd concentratie in de uiterwaard van de *Turfzakken* lijkt deze referentiewaarde niet te overschrijden. In de *Noorderplaat* blijkt deze algemene referentieconcentratie ca. 3x overschreden te worden. De dieren uit de polder (referentie !) van de *Turfzakken* met extreem hoge Cd concentraties blijken deze waarde ca. 9x te overschrijden. De overige metalen in de bosspitsmuis laten geen overschrijdingen van de algemene referentiewaarden (zie tabel 4.1) zien.

Een overeenkomend beeld wordt waargenomen bij de woelmuis. Wanneer ter vergelijking de referentieconcentraties in een verwant knaagdier de bosmuis (*Apodemus sylvesticus*) beschouwd worden, blijkt ook alleen de Cd concentratie (variërend van 1 tot 9 mg/kg; zie tabel 3.6) de algemene referentiewaarde (2 mg/kg; zie tabel 4.1) te overtreffen. Vooral in de polder de *Turfzakken* werd een aanzienlijke overschrijding van 4x de referentiewaarde aangetroffen. Bij beschouwing van de bioaccumulatiefactoren blijkt dat, in lijn met de hiervoor vermelde resultaten, alleen Cd noemenswaardig accumuleert in de bosspitsmuis (BSAF variërend van ca. 3 tot 36). In de woelmuis lijkt Cd echter niet duidelijk te accumuleren (BSAF variërend van 0,2 tot 6). Alle andere metalen (Cu, Pb, Cr, Ni, Zn) accumuleren in geen van beide soorten.

Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat vooral Cd accumuleert in de onderzochte diersoorten en dat de interne concentraties zoals die in de Biesbosch aangetroffen worden hoger zijn dan de algemene referentiewaarden voor Nederland. Bij de hoogst aangetroffen Cd concentraties van 100 mg/kg in de nier kunnen schadelijke effecten verwacht worden. Concentraties boven de 200 mg/kg in de nier worden beschouwd als levensbedreigend voor zoogdieren (Friberg et al, 1986). Door Nolet et al (1994) is voorgesteld een concentratie van 100 mg/kg in de nier als kritisch te beschouwen. Bij concentraties van 100-150 mg/kg werd nierschade waargenomen bij ratten en vogels. Op grond van deze resultaten kan gesteld worden dat de aanwezige concentraties Cd in de Biesbosch vooral bij bosspitsmuizen een verhoogd risico opleveren.

Tabel 4.1. Gemiddelde concentraties (mg/kg) zware metalen in nieren van de bosspitsmuis *Sorex araneus* (S) en de bosmuis *Apodemus sylvesticus* (A) uit referentielocaties.

metaal	min		max		gemiddeld			n
	<i>Sorex</i>	<i>Apodemus</i>	<i>Sorex</i>	<i>Apodemus</i>	<i>Sorex</i>	<i>Apodemus</i>	<i>Sorex</i>	
Cd	4	1	26	2	13	2	5	6
Cu	23	14	31	22	28	18	3	3
Pb	3	0	21	14	13	7	6	7
Zn	75	69	204	338	122	188	3	3

NB. Gegevens over de woelmuis zijn niet beschikbaar. Ter vergelijking zijn de concentraties in een algemeen voorkomend knaagdier, de bosmuis weergegeven. n = aantal studies waarop gemiddelde gebaseerd is. Voor volledig overzicht literatuurgegevens zie Wegener et al 1999.

4.2.3 PAK's en PCB's

PAK's worden relatief snel afgebroken in het lichaam en zijn daardoor vaak niet in de weefsels terug te vinden. Eerder onderzoek naar PAK's in de bosspitsmuis, heeft reeds aangetoond dat deze stoffen niet aantoonbaar zijn (IBN, ongepubliceerde data). Andere organische microverontreinigingen zoals PCB's worden wel in dierlijk weefsel terug gevonden. Deze verbindingen zijn echter niet geanalyseerd in de verzamelde bodemonsters, zodat een vergelijk daarmee niet mogelijk is. Wel is op basis van de interne PCB gehalten een duidelijk verschil tussen de twee vanggebieden aangetoond. De Σ PCB concentraties in zowel de bosspitsmuis als de woelmuis uit de uiterwaard van de *Noorderplaat* zijn gemiddeld 5x hoger dan in de polder. Deze verschillen zijn significant voor de bosspitsmuis, maar niet voor de woelmuis. De PCB concentraties in de bosspitsmuis zijn ca. 19x hoger dan in de woelmuis. Net als bij de zware metalen kunnen deze verschillen verklaard worden uit de verschillende diëten van de soorten.

De aangetoonde Σ PCB (som 29 congenere) concentraties in dieren uit de uiterwaarden bedragen voor de bosspitsmuis en de woelmuis respectievelijk 2.6 ± 0.8 en 0.14 ± 0.152 mg/kg vet. Wanneer deze concentraties vergeleken worden met in de literatuur gerapporteerde effect-concentraties voor de witvoet muis (*Peromyscus leucopus*) blijken deze ca. 50x lager te zijn dan de laagst waargenomen effectconcentratie. Merson & Kirkpatrick (1976) vonden een verhoogde sterfte onder zuigelingen bij een dieet met 10 ppm PCB Aroclor 1254. Een dergelijke concentratie in het dieet resulteert in een interne concentratie van ca. 150 mg/kg (berekening gebaseerd op Simmons & McKee, 1992). Sanders & Kirkpatrick (1977) vonden een vergrote lever en verhoogde P450 activiteit (gemeten als phenobarbital induced sleeping time) bij een blootstelling aan 25 ppm PCB in het dieet, hetgeen zou resulteren in een interne concentratie van ca. 300 mg/kg vet. Bij deze concentratie is ook een verhoogde EROD activiteit gevonden. Bij een dieet met 200 ppm PCB (en een geschatte interne concentratie van ca. 2100 mg/kg vet) werd een verminderde voortplanting waargenomen (afgenomen worp grootte) (Merson & Kirkpatrick, 1976). Uit blootstellingstudies met de huisspitsmuis (*Crocidura russula*) is eerder geconcludeerd dat deze soort een vergelijkbare gevoeligheid heeft voor PCB-achtige verbindingen als de witte muis (Bosveld & de Bie, 2001). Gezien de nauwe verwantschap tussen de bosspitsmuis en de huisspitsmuis enerzijds en de woelmuis,

witvoetmuis en witte muis anderzijds, suggereren deze gegevens dat de aangetroffen concentraties PCB's in kleine zoogdieren in de Biesbosch geen nadelige effecten zullen veroorzaken.

4.3 Cytochroom P450 biomarkers

Naast de gemeten zware metalen en PAK's die in de bodemmonsters gemeten zijn (zie §4.1) en de PCB's die in de gevangen zoogdieren gemeten zijn, worden door het sediment van de grote rivieren nog talrijke andere milieuverontreinigende stoffen meegevoerd en in de Biesbosch afgezet. Tot deze niet gemeten stoffen behoren ook de polychloordibenzo-*p*-dioxinen en polychloordibenzofuranen (PCDD's en PCDF's), die in verschillende chemisch analytische studies van sedimentatiegebieden van de grote rivieren aangetroffen zijn (Bosveld et al 1995, Beurskens et al. 1993). Van deze stoffen is bekend dat zij net als sommige PCB's middels binding aan de cellulaire Ah receptor een breed scala van effecten in het organisme kunnen veroorzaken waarbij de inductie van de EROD activiteit (o.a. in de lever) een van de eerst waarneembare effecten is. De microsomale EROD activiteit in de lever van kleine zoogdieren uit de uiterwaarden van *de Dood* (deelonderzoek 1) en de *Turfzakken* (deelonderzoek 3) zijn significant verhoogd ten opzichte van de activiteit in de dieren uit de referentie locatie *Turfzakken* (4.4 x verhoogd in *de Dood*, spitsmuis $p=0.0065$; ca. 2x verhoogd in de *Turfzakken*, spitsmuis $p=0.2$, woelmuis $p=0.02$).

Bij een vergelijking van de twee diersoorten die onderzocht zijn in de *Turfzakken*, de bosspitsmuis (*Sorex araneus*) en de rosse woelmuis (*Clethrionomys glareolus*) blijken de interne PCB concentraties in de bosspitsmuis gemiddeld 2x hoger dan in de woelmuis (metalen 1-10x, uitgezonderd Cd 2-20x). Deze verschillen zijn, net als bij de zware metalen, te herleiden naar de samenstelling van het dieet dat bij een woelmuis meer plantaardig is dan bij een spitsmuis. De hogere interne blootstelling leidt echter niet tot een hogere EROD activiteit bij de bosspitsmuis in vergelijking met de woelmuis. Het plantaardig dieet van de woelmuis met de daarin aanwezige aromaten veroorzaken bij deze soort waarschijnlijk ook een verhoging van de EROD activiteit, waardoor de soorten, ondanks de verschillen in interne blootstelling aan PCB's en PAK's weinig verschillen in EROD activiteit laten zien.

In de *Noorderplaat* (deelonderzoek 2) konden op basis van de EROD activiteit geen verschillen tussen de uiterwaard en de polder aangetoond worden. Ook kon hier op individueel niveau geen PCB-concentratie afhankelijke verhoging van de EROD activiteit waargenomen worden. De resultaten van de EROD metingen waren echter ook voor de referentiedieren, sterk afwijkend van de doorgaans gemeten responsen en lijken daarmee niet betrouwbaar. Naast de EROD activiteit is in deelonderzoek 2 de MF_{pcb} bepaald als alternatieve maat voor de vaststelling van enzyminductie (van den Brink et al 2000, van den Brink & Bosveld 2001). Op basis van de MF_{pcb} blijken wel significante verschillen tussen de twee vanggebieden, waarbij de dieren uit de verontreinigde uiterwaard een lagere MF_{pcb} laten zien. Bovendien is er een significante relatie aangetoond tussen somPCB en MF_{pcb}. Deze resultaten suggereren dat er wel een concentratieafhankelijke verhoging van de enzymactiviteit (waaronder

EROD) plaats vindt, en dat de enzymactiviteit in dieren uit de uiterwaard hoger is dan in dieren uit de referentielocatie.

De gecombineerde EROD en MF_{PCB} resultaten van de drie opeenvolgende studies laten dus in alle gevallen een significant effect op enzymfuncties zien (1997: polder *de Dood* versus de polder *de Turfzakken*, EROD 4x verhoogd; 1998: polder versus uiterwaard *Noorderplaat*, MF_{PCB} 4x verhoogd; *Turfzakken* uiterwaard versus polder, EROD 2x verhoogd). De waargenomen verhogingen van de P450 activiteiten duiden erop dat de in de uiterwaarden aanwezige verontreinigingen doordringen tot in de hogere lagen van de voedselketen en daar interne functies ontregelen. Uit vele verschillende toxiciteitstudies is gebleken dat EROD inductie gekoppeld is aan de aanschakeling van de AhR gemedieerde effectketen welke kan leiden tot effecten op het immuunsysteem, de groei, en het reproductievermogen van de blootgestelde dieren (Safe 1984, 1986, 1990). Ondanks het feit dat dergelijke effecten in de Biesbos niet aangetoond (of adequaat onderzocht) zijn, moet een verhoogde EROD activiteit wel beschouwd worden als een waarschuwing voor de mogelijkheid van dergelijke effecten. Experimentele blootstellingstudies met de witvoetmuis (*Peromyscus leucopus*) laten zien dat bij doseringen waarbij EROD inductie optreedt, ook reeds een verhoogde sterfte onder zuigelingen optreedt. EROD inductie trad op bij doseringen vanaf 25 ppm PCB in het dieet en een interne concentratie van ca. 300 mg/kg vet in de muis. Zuigelingensterfte trad al op bij doseringen van 10 ppm in het dieet en een interne concentratie van 150 mg/kg (Merson & Kirkpatrick, 1976; Sanders & Kirkpatrick, 1977; Simmons & McKee, 1992). De concentraties waarbij deze effecten waargenomen zijn in de witvoetmuis zijn veel hoger dan de concentraties die in de dieren uit de Biesbosch gemeten zijn. Het feit echter dat zowel de bosspitsmuis als in de woelmuis een inductie van de EROD activiteit waargenomen is, suggereert dat in deze soorten onder de huidige omstandigheden ook ernstigere effecten op kunnen treden die met de gegeven onderzoeksopzet niet gedetecteerd worden.

Testosteronhydroxylase

Naast de microsomale EROD activiteit is in deelonderzoek 1 (*de Dood*) ook de testosteronhydroxylase activiteit in levermicrosomen bepaald. Uit deze bepaling bleek dat de 16 α - en 16 β -hydroxylase activiteit significant *lager* was in dieren uit de verontreinigde polder *de Dood* ten opzichte van dieren uit de referentie locatie *de Turfzakken*. Wanneer de relatieve activiteiten (t.o.v. de totale TH activiteit) beschouwd worden, blijkt de 2 β - en 16 α -TH significant verlaagd te zijn in de dieren uit het verontreinigde gebied. Deze effecten komen niet overeen met de waargenomen effecten van TCDD of PAK's in huisspitsmuizen [Bosveld et al 2000]. TCDD veroorzaakte een daling van alle TH activiteiten. Het PAK mengsel en BaP alleen gaven geen eenduidig effect te zien. Uit de resultaten blijkt dat TH geen gevoelige en duidelijk interpreteerbare biomarker voor blootstelling aan PAK's of dioxinen is en geen additionele informatie geeft over de effecten bij kleine zoogdieren in de Biesbosch.

4.4 Morfologische en histologische effecten

Wanneer de resultaten van de morfologische metingen aan dieren uit *de Dood* en referentie *Turfzakken* (deelonderzoek 1) beschouwd worden, blijkt het levergewicht en het hersengewicht bij dieren uit de verontreinigde polder *de Dood* significant hoger te zijn dan bij de dieren uit het referentiegebied. De waargenomen verschillen in lever- en hersengewicht zijn echter zeer waarschijnlijk terug te voeren op de verschillen in levensstadium. Twee van de drie dieren uit het referentiegebied waren subadult, terwijl alle dieren uit het verontreinigde gebied al in het adulte stadium verkeerden. Naast deze verschillen werd echter ook een significant ($p = 0.02$) verschil tussen de gebieden waargenomen op basis van het relatief levergewicht (Lever Somatische Index/LSI). Ook bleek de LSI gerelateerd ($p \leq 0.1$) aan EROD. EROD kan hierbij beschouwd worden als maat voor de interne blootstelling aan PCB's en verwante Ah-receptor actieve stoffen. Leververgroting is een bekend effect van dergelijke stoffen.

Voor wat betreft de histologische effectparameters is geen directe vergelijking te maken tussen wel en niet blootgestelde dieren. Histologisch onderzoek is alleen uitgevoerd bij dieren uit het verontreinigde gebied. Wanneer de resultaten echter vergeleken worden met de resultaten van deelonderzoek 3, waarbij wel dieren uit het referentiegebied *Turfzakken* (en de aangrenzende verontreinigde uiterwaard) onderzocht zijn, blijkt het aantal groeiende follikels in de dieren uit *de Dood* (gemiddeld 4 tot 18 groeiende follikels per ovarium) lager te liggen dan in dieren uit zowel verontreinigde als "schone" locaties in de polder de *Noorderplaat* (gemiddeld tussen de 30 en 40 groeiende follikels per ovarium). De afwezigheid van verschillen tussen de laag en hoog blootgestelde dieren uit de *Turfzakken* suggereert echter dat verontreinigingen hier niet de belangrijkste veroorzaker van zijn.

Bij beschouwing van de histologisch effecten in de gonaden van dieren uit *Noorderplaat* (deelonderzoek 2) bleek bij bosspitsmuizen een significant verschil tussen de twee gebieden (polder en uiterwaard) voor het oppervlak ingenomen door de corpora lutea in het ovarium van vrouwelijke dieren (gemiddelden polder en uiterwaard respectievelijk 204 ± 95 en 440 ± 132 ; $p=0.025$) en het testes gewicht in mannelijke dieren (gemiddelden polder en uiterwaard respectievelijk 366 ± 43 en 632 ± 211 ; $p=0.028$). Bovendien bleken deze effectparameters significant gerelateerd aan de interne concentratie Σ PCB. Wanneer MF_{PCB} of EROD genomen wordt als maat voor de totale blootstelling aan dioxine-achtige stoffen, blijkt alleen de relatie met het testesgewicht stand te houden. De vergroting van het orgaangewicht lijkt echter niet gerelateerd te zijn aan een vergroting van de functionaliteit van het orgaan, omdat het aantal spermatozoën dat geteld is in de tubuli seminiferi niet toeneemt, en in relatie tot de EROD activiteit juist afneemt.

Bij woelmuizen uit de *Noorderplaat* zijn duidelijkere verschillen tussen de twee vanggebieden waargenomen. In de uiterwaard werd in vergelijking met de polder een significant lager lichaamsgewicht, een geringer aantal embryo's, een lager levergewicht en een lager niergewicht geconstateerd. Behalve de vermindering van het aantal embryo's, lijken deze effecten vooral aan cadmium gerelateerd en niet aan

PCB's of de andere blootstellingindicatoren voor dioxine-achtige stoffen zoals MF_{PCB} en EROD. De vermindering van het aantal embryo's is juist wel aan deze blootstellingparameters (PCB's, MF_{PCB} , EROD) gerelateerd. Bij beschouwing van de histopathologische effecten blijkt geen eenduidig beeld. Wel suggereren de verschillende significante concentratie-effect relaties dat de aanwezige contaminanten de weefselstructuur in de ovaria (de testes zijn niet onderzocht in de woelmuis) aantasten.

Bij dieren (bosspitsmuizen en rosse woelmuizen) uit *Turfzakken* (deelonderzoek 3) zijn geen significante verschillen tussen de uiterwaard en de polder waargenomen op basis van morfometrie (lichaamsgewicht en orgaangewichten) en histologie (corpora lutea en follikels in ovarium, diameter tubuli seminiferi en aantal spermatozoën in testes). Zoals al bleek uit de metaalgehalten in de nieren van de gevangen dieren, was met name bij de dieren uit de polder de variatie aanzienlijk. Deze gezamenlijke resultaten van de bodemanalyses en de bepaling van de gehalten in het lichaam, suggereren dat de gevangen dieren niet sterk gebonden zijn aan het gebied waarin ze gevangen zijn en dat in beide gebieden dieren gevangen zijn die een deel van de tijd mogelijk in andere gebieden met een afwijkende graad van verontreiniging, doorgebracht hebben. In dat geval zullen alleen de effectparameters met een sterk onderscheidend vermogen, zoals EROD, verschillen tussen de beide gebieden kunnen duiden.

4.5 Interne dosis-effect relaties

Om te onderzoeken of de verschillende effectparameters, die geen verschillen tussen de gebieden laten zien, mogelijk wel beïnvloed worden door een blootstelling aan toxische stoffen, zijn de individuele interne dosis-effect relaties onderzocht. Hieruit bleek in de bosspitsmuis een significante positieve correlatie tussen de interne cadmium en/of koperconcentraties en het lichaamsgewicht en verschillende orgaangewichten. Voor koper bleken deze regressies echter in belangrijke mate bepaald door twee individuen met relatief zeer hoge Cd concentratie (>100 mg/kg). Voor Cu bleek één individu met een hoog gehalte de regressie in belangrijke mate te bepalen (zie Fig. 3.8). Voor de orgaangewichten gaven deze relaties een vergelijkbaar beeld te zien. Deze resultaten suggereren dat Cd en Cu in het dier accumuleren en toenemen bij toenemende leeftijd (gewicht).

Wanneer EROD beschouwd wordt als biomarker voor blootstelling aan dioxine-achtige stoffen, bleek deze gerelateerd ($p < 0.05$) aan de plasmaprogesteron concentratie in de bosspitsmuis. EROD gaf geen relatie te zien met histologische of morfometrische effectparameters.

4.6 Overige biomarkers

In deelonderzoek 3 (*Turfzakken*) zijn nog een aantal andere biomarkers onderzocht. Geen van deze biomarkers -vitamine A (retinol, retinylpalmitaat, en ratio Re/Rp), DNA adducten, en steroidhormonen (testosteron, progesteron, 17 β -oestradiol)-gaven significante verschillen tussen de verontreinigde en referentielocaties te zien.

In de rosse woelmuis bleek een sterk significante ($p < 0.001$) relatie tussen de interne Cd-concentratie enerzijds en de retinylpalmitaatconcentratie in de lever en het aantal hart adducten in de hersenen anderzijds. Een toename van het aantal hartadducten is een indicatie van verhoogde blootstelling aan muterende stoffen. Cd zelf staat echter niet als zodanig bekend en wordt hiervoor ook niet als de oorzakelijke factor beschouwd. EROD gaf in de woelmuis geen significante relaties met een van de effectparameters te zien behalve met PROD. PROD is geassocieerd met cytochroom P450 2B, en wordt bij blootstelling aan complexe mengsels zoals in de natuur vaak simultaan met EROD geïnduceerd.

5 Conclusies

De uiterwaarden in de Biesbosch zijn aanzienlijk verontreinigd met zware metalen en PAK's. In alle gevallen worden de streefwaarden voor metalen (behalve Ni) en PAK's overschreden. Voor de metalen cadmium en zink worden zelfs de interventiewaarden herhaaldelijk overschreden. De mate van verontreiniging is hierbij afhankelijk van de hoogte boven het waterniveau in de kreken (en dus afhankelijk van de mate van overstroming van de uiterwaarden). De concentraties zware metalen en PAK's in de bodem van de polders (de referentiegebieden in het uitgevoerde onderzoek) die sinds de tweede helft van de 19e eeuw door dijken omsloten zijn en daardoor nog maar sporadisch overstroomd worden, zijn aanzienlijk lager maar overschrijden in veel gevallen nog wel de streefwaarden voor Cu, Pb, Zn en PAK's.

De verhoogde bodemconcentraties in de uiterwaarden bij de polders *de Dood*, de *Noorderplaat* en de *Turfzakken* resulteren in die gevallen waar het onderzocht is, in een duidelijke toename van de interne concentraties zware metalen en PCB's in bosspitsmuizen of woelmuizen ten opzichte van de concentraties die aangetroffen worden in dieren uit de referentiegebieden. De BSAF's voor zware metalen varieerden sterk tussen de verschillende soorten en onderzoekslocaties. Alleen cadmium bleek met een BSAF > 1 duidelijk te accumuleren in de bosspitsmuis. Op één enkele verontreinigde locatie bleek ook voor de woelmuis voor Cd de BSAF > 1. Voor alle overige metalen was BSAF < 1 in beide soorten.

PAK's worden niet aangetroffen in de zoogdieren. Deze stoffen worden snel afgebroken in het lichaam en accumuleren niet in de bosspitsmuis of woelmuis. Bij vergelijking van de herbivore woelmuis en de meer carnivore bosspitsmuis bleken de concentraties van verschillende zware metalen en PCB's in de bosspitsmuis gemiddeld hoger dan in de woelmuis. De verschillende voedingspatronen van de herbivore woelmuis en vermivore (wormenetende) spitsmuis zijn hier een verklaring voor.

Naast de verhoogde concentraties in de dieren uit de uiterwaarden is bij zowel de bosspitsmuis als de woelmuis een eenduidig effect op de EROD activiteit of de daaraan verwante MFpcb waargenomen, wanneer een vergelijk gemaakt wordt met de bijbehorende referentiegebieden. Naast deze typische Ah receptor gemedieerde effecten zijn ook diverse minder duidelijk aan een stofgroep te relateren afwijkingen waargenomen. Deze afwijkingen varieerden per diersoort en per deelonderzoek. Er kunnen dus geen eenduidige uitspraken gedaan worden over de mate waarin de verhoogde concentraties ook leiden tot waarneembare schadelijke effecten in kleine zoogdieren in de Biesbosch.

Gezien de interne concentraties zware metalen en PCB's in kleine zoogdieren, de effecten op EROD en de incidenteel optredende histologische of morfologische effecten van verschillende aard kan echter geconcludeerd worden dat terrestrische zoogdieren die foerageren in de verontreinigde uiterwaarden van de Biesbosch een

verhoogd risico lopen op schadelijke effecten van toxische stoffen die aanwezig zijn in de bodem van Biesbosch

Uit de gezamenlijke resultaten kan geconcludeerd worden dat de in de uiterwaardbodem aanwezige verontreinigingen leiden tot meetbaar hogere blootstelling en accumulatie van zware metalen en PCB's in kleine zoogdieren, waarbij de carnivore bosspitsmuis hogere interne concentraties laat zien dan de meer herbivore woelmuis. De verhoogde blootstelling leidt bij zowel de bosspitsmuis als de woelmuis tot diverse effecten. Het meest duidelijke effect is een inductie van de EROD activiteit. EROD kan als een early warning voor meer schadelijke effecten zoals groeivertraging of verminderde reproductie beschouwd worden. Dit én het feit dat diverse grootschaligere en nadelige effecten incidenteel voorkomen in de onderzochte dieren suggereren dat de in de Biesbosch aanwezige concentraties verontreinigingen een risico vormen voor de daar aanwezige op het land levende kleine zoogdieren.

Literatuur

Beurskens, J.E.M., Mol, G.A., Barreveld, H.L., Van Munster, B. & Winkels, H.J. (1993). Geochronology of priority pollutants in a sedimentation area of the Rhine River. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1549-1566.

Bosveld A.T.C. & de Bie, P.A.F. (2001). Biomarkers voor blootstelling aan TCDD en PAK in de huisspitsmuis. Alterra rapport nr 154, 89 p. Wageningen 2001.

Bosveld A.T.C., de Bie, P.A.F., van den Brink, N.W., Jongepier, H. & Klomp, A. (2002). In vitro induction equivalency factors for the 10 PAH's generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere*. in press.

Bosveld A.T.C., Klok, T.C., Bodt, J.M. & Rutgers, M. (2000). Ecologische risico's van bodembverontreinigingen in toemaakdek in de gemeente De Ronde Venen. Alterra-rapport 151. Alterra, Wageningen.

Bosveld, A.T.C. and Van den Berg, M. (1994). Effects of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans on fish-eating birds. *Environ. Rev.* 2:147-166.

Bosveld, A.T.C., Gradener, J., Murk, A.J., Brouwer, A., Van Kampen, M., Evers, E.H.G., and Van den Berg, M. (1995). Effects of PCBs, PCDDs, and PCDFs in common tern (*Sterna hirundo*) breeding in estuarine and coastal colonies in the Netherlands and Belgium. *J. Environ. Toxicol. Chem.* 14:99-115.

Brink, N.W. van den & Bosveld, A.T.C. (2001). PCB concentrations and metabolism patterns in common terns (*Sterna hirundo*) from different breeding colonies in the Netherlands. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 4: 280-285.

Brink, N.W. van den, Bosveld, A.T.C., de Rooter-Dijkman, E.M., Broekhuizen, S. & Reijnders, P.J.H. (2000). PCB pattern analyses (PPA): a potential non-destructive biomarker in vertebrates for exposure to cytochrome P450 inducing organohalogenes. *J. Environ. Toxicol. Chem* 19(3):575-581. Van den Brink & Bosveld 2001b).

Broekhuizen, S., Hoekstra, B., van Laar, V., Smeenk, C., & Thissen, J.B.M. (1992). Atlas van de Nederlandse zoogdieren. Sticht Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, Utrecht.

Brouwer, A., Håkansson, H., Kukler, A., Van den Berg, K., Ahlborg, U.G. (1989). Marked alterations in retinoid homeostasis of Spague Dawley rats induced by a single i.p. dose of 10 g/kg of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* 58: 267-283.

Churchfield, S. (1990). The Natural History of Shrews. Christopher Helm, A&C Black, London.

Damoiseaux, J.H. & Vos, G.A. (1987). Bodemkaart van Nederland schaal 1:50 000; Toelichting bij kaartblad 44 West Oosterhout. Stiboka, Wageningen.

Domingo, J.L. (1996). Vanadium - A review of the reproductive and developmental toxicity. *Reproductive Toxicology* 10: 175-182.

Ferm, V.H. & Carpenter, S.J. (1967). Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature* 216: 1123.

Friberg, L., Nordberg, G.F., Vouk, V.B. (eds) (1986). Handbook on the toxicology of metals, Volume II: Specific metals, 2nd edition. Elsevier, Amsterdam.

Hamers, T., Smit, L.A.M., Bosveld, A.T.C. van den Berg, J.H.J., Koeman, J.H., van Schooten, F-J., Murk, A..J. (2002) Biomarker responses do not indicate a distinct gradient of pollution in small mammals collected at different distances from a highway. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Accepted 2002.

Hendriks, A.J., Pieters, H., de Boer, J. 1998. Accumulation of metals, polycyclic (halogenated) aromatic hydrocarbons, and biocides in zebra mussel and eel from the Rhine and Meuse rivers. *J. Environ. Toxicol. Chem* 17 (10) : 1885-1898.

Janssen, P.A.H., Faber, J.H. & Bosveld, A.T.C. (1998). (Fe)male? How contaminants can disrupt the balance of sex hormones and affect reproduction in terrestrial wildlife species. *IBN Scientific Contributions* 13. 150 p. IBN-DLO, Wageningen.

Kennette, D., Hendershot, W., Tomlin, A., Sauve, S. 2002. Uptake of trace metals by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in urban contaminated soils. *Applied-Soil-Ecology*. [19 (2): 191-198.

Laane, R.W.P.M., Sonneveldt, H.L.A., Van der Weyden, A.J., Loch, J.P.G., Groeneveld, G. 1999. Trends in the spatial and temporal distribution of metals (Cd, Cu, Zn and Pb) and organic compounds (PCBs and PAHs) in Dutch coastal zone sediments from 1981 to 1996.: A model case study for Cd and PCBs. *Journal of Sea Research* 41 (1-2) : 1-17.

Lange, R., A. van Winden, P. Twisk, J. de Laender & C. Speer. (1986). Zoogdieren van de Benelux, Herkenning en onderzoek met uitzondering van hoefdieren en de zeezoogdieren: De auteurs & de Jeugdbondsuitgeverij, 's-Gravenland/Zeist/Gent.

Lorenzen, A., Kennedy, S.W. (1993). A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* 214:346-348.

Ma, W.C. & Talmage, S. (2001). Insectivora. In: R.F. Shore & B.A. Rattner (eds.), *Ecotoxicology of wild mammals*. Chichester (UK) etc., Wiley, 2001, pp. 123-158.

Ma, W.C., van Kleunen, A., Immerzeel, J. & de Maagd, P.G.J. (1998). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: Assessment of

equilibrium partitioning theory in in situ studies and water experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:1730-1737.

Merson, M.H. & Kirkpatrick, R.L. (1976). Reproductive performance of captive white-footed mice fed a PCB. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16:392-398. Citeerd in Simmons & McKee (1992).

Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P. Van De Guchte, C., Brouwer, A.. (1996). Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): A novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundamental-and-Applied-Toxicology.* 33 (1) 149-160.

Nolet, B.A., Dijkstra, V.A.A., Heidecke, D. (1994). Cadmium in beavers translocated from the Elbe River to the Rhine/Meuse Estuary, and the possible effect on population growth rate. *Arch. Environm. Contam. Toxicol* 27:154-161.

Pedigo, N.G. & Vernon, M.W. (1993). Embryonic losses after 10-week administration of cobalt to male mice. *Reproductive Toxicology* 7: 111-116.

Pedigo, N.G., George, W.J. & Anderson, M.B. (1988). Effects of acute and chronic exposure to cobalt on male reproduction in mice. *Reproductive Toxicology* 2: 45-53.

Rouabah, L., Descamps, M. 2001. Cadmium bioaccumulation in three Oligochaeta species (*Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* and *Dendrobaena pygmaea*). *Bulletin de la Societe zoologique de France* 126 (4) : 321-329.

Safe, S. 1984. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology and mechanism of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 13:319-394.

Safe, S. 1986. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26:371-399.

Safe, S. 1990. Polychlorinated Biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalence factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* 21:51-87.

Sample, B.E., Suter, G.W., Beauchamp, J.J., Efroymson, R.A.. 1999. Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *J. Environ. Toxicol. Chem* 18 (9) : 2110-2120.

Sanders, O.T. & Kirkpatrick, R.L. (1977). Reproductive characteristics and corticoid levels of female white-footed mice fed ad libitum and restricted diets containing a polychlorinated biphenyl. *Environ. Res.* 13: 358-363.

Simmons, G.J. & McKee, M.J. (1992). Alkoxyresorufin metabolism in white-footed mice at relevant environmental concentrations of Aroclor 1254. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19:446-452.

Sloof, W., Janus, J.A., Matthijsen A.J.C.M., Montizaan, G.K., Ros, J.P.M. (1989). Report on PAH. (in dutch; Basisdocument PAK). RIVM report nr. 758474007. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.

Wegener, J.W.M., Burgers, I.C.B., van der Horst, A., Swart, C.P. & Mes, R.G. (1999). Zware metalen in wormen, mollen en muizen. Analyses en referentiewaarden in het kader van het Provinciaal Integraal Meetnet Milieukwaliteit 1996-1998. IVM rapport nr. R-99/06. VU, Amsterdam.

Wegman, R.C.C., Hofstee, A.W.M. 1982. Determination of organochlorines in river sediment by capillary gas chromatography. Application to Dutch river sediment. *Water-Research.* 1982, 16: 7, 1265-1272.

Winder, C. 1993. Lead, reproduction and development. *Neurotoxicology* 14: 303-318.