



Diana Slijkerman, IMARES\*

Edwin Foekema, IMARES\*

Ron van der Oost, Waterproef\*\* / Waternet

Ruud Kampf, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier

# Hormoonverstoring bij vis, punt van aandacht in het zuiveringsmoeras

Met de aanleg van zuiveringsmoerassen bij rioolwaterzuiveringen worden twee vliegen in één klap geslagen. Enerzijds verbetert de kwaliteit van het effluent, anderzijds kan nieuwe natuur worden 'gecreëerd'. Doordat het rwzi-effluent rijk is aan voedingsstoffen, kunnen zuiveringsmoerassen waarschijnlijk met succes worden ingericht tot kraamkamer voor vis. Door de vissen in de zuiveringsmoerassen - feitelijk 100 procent effluent - te monitoren, kan een goede indicatie ontstaan voor mogelijk schadelijke effecten van de lozing van het effluent op het ontvangende water. Een belangrijk aandachtspunt hierbij is de invloed van hormoonverstorende stoffen op vispopulaties. De verkennende studie met volwassen stekelbaars in een zuiveringsmoeras op Texel geeft nog niet direct aanleiding tot ongerustheid. Een nader onderzoek waarbij effecten op het meer gevoelige levensstadium worden onderzocht, zal echter meer duidelijkheid verschaffen over de mogelijke risico's voor het ecosysteem. De in het moeras geboren en opgroeiende vislarven zullen namelijk het grootste risico op (hormoonverstorende) effecten lopen.

Enkele van de in het moeras blootgestelde stekelbaarsjes



Eind jaren negentig ging een grootschalig onderzoek van start naar aanwezigheid en effecten van stoffen die de hormoonhuishouding in het aquatisch milieu kunnen ontregelen. Dit landelijke onderzoek (Landelijk Onderzoek Estrogene Stoffen of afgekort LOES) gaf de eerste aanzet naar inzichten over de verspreiding van estrogene stoffen (stoffen met vrouwelijk hormonale werking) in het Nederlands milieu en hun effecten (vervrouwelijking) op vissen.

Uit het onderzoek bleek dat oestrogenen grotendeels verwijderd worden in rioolwaterzuiveringen. Toch bleek dat de geringe hoeveelheid oestrogenen in het effluent soms effecten kunnen hebben op vis. Naast rwzi's (waar de hormonen uit urine terecht komen) werden tijdens dit onderzoek ook andere bronnen geïdentificeerd, zoals industriële effluënten en uitspoelend water van intensieve veehouderij<sup>1)</sup>.

STOWA publiceerde in 2003 een overzichtsrapport over oestrogenen in het milieu, waaruit bleek dat voor een goede risico-beoordeling nog onvoldoende gegevens beschikbaar waren. Tevens werd in dit rapport onderschreven dat nog zeer veel

onderzoeksinspanning en tijd nodig is om tot een ecologische risicobeoordeling te komen<sup>2)</sup>.

### Zuiveringsmoerassen

Een zuiveringsmoeras wordt gebruikt als schakel tussen waterketen en watersysteem waarbij het effluent van een rwzi nagezuiverd wordt, ook bekend als de waterharmonica<sup>3)</sup>. Het zuiveringsmoeras heeft aan de afvoerszijde een min of meer open verbinding met het ontvangende oppervlaktewater. Vissen foerageren graag in water dat 'verrijkt' is met het voedselrijke rwzi-effluent en zullen dus ook graag het zuiveringsmoeras opzoeken. In het moeras van rwzi Eversteekooop op Texel leven vele tiendoornige stekelbaarzen. Bij een in 2005 aangelegd zuiveringsmoeras in het Friese Grou (zie ook H<sub>2</sub>O nr. 24, pag. 41) wordt heel bewust getracht een ideale paaibiotop voor snoek te creëren. Indien deze opzet slaagt, zal het voortplantingssucces van een deel van de lokale snoekpopulatie afhankelijk worden van de waterkwaliteit in het zuiveringsmoeras.

### Meten van hormoonverstoring

Met diverse methoden kunnen monsters (stoffen, effluënten, sedimenten) getest worden op de aanwezigheid van mannelijke en vrouwelijke hormonen en stoffen met een hormoonverstorende werking. Een voorbeeld hiervan zijn de ER- en AR-Caluxtesten, die gebruik maken van genetisch gemodificeerde cellijnen die gevoelig zijn voor alle stoffen die binden aan de estrogene en androgene receptoren. De testen drukken de hormonale werkingen van een monster uit in estradiol- of testosteronequivalenten. Omdat nog niet duidelijk is hoe de waarden uit de ER-Caluxtest moeten worden doorvertaald naar risico's voor organismen, bestaan op dit moment geen normen voor hormonale activiteit in effluënten. Daarom zal een gelijktijdig onderzoek met zowel vissen als Calux-bioassays ertoe bijdragen dat normen worden vastgesteld voor hormoonverstorende activiteit van effluënten.

De meest onderzochte verstoring van het hormoonsysteem is de aanwezigheid van typisch vrouwelijke eiwit vitellogenine (VTG) in mannelijke vis. Vitellogenine is betrokken bij de aanleg van eicellen. Bij mannelijke vissen die gedurende enkele weken zijn blootgesteld aan puur rwzi-effluent en ook bij in het 'wild' levende vissen worden regelmatig verhoogde VTG-gehalten waargenomen<sup>4),5)</sup>. Langere blootstelling aan hormoonverstorende stoffen kan leiden tot de vorming van eicellen in mannelijke vis.

Bij het huidige onderzoek naar hormoonverstoring gaat de meeste aandacht uit naar de effecten van vrouwelijke hormonen, terwijl ook de mannelijke hormonen een rol kunnen spelen. Blootstelling aan mannelijke hormonen kan bij vrouwelijke stekelbaarsjes leiden tot een 'vermannelijking'. In de nieren van mannelijke stekelbaarzen wordt de kleefstof spiggin aangemaakt, die nodig is bij de bouw van nesten. De spigginproductie kan ook worden geïnduceerd bij vrouwelijke vissen die zijn blootgesteld aan mannelijke

hormonen<sup>6),7)</sup>. De consequentie van de aanwezigheid van spiggin in vrouwtjes op de vispopulatie is nog niet bekend.

### Gevoelige vislarven

Uit laboratoriumproeven blijkt dat wanneer vislarven gedurende de eerste twee weken van hun leven worden blootgesteld aan vrouwelijke hormonen, dit van invloed is op de verhouding mannetjes en vrouwtjes (de sexe-ratio). Genetisch mannelijke larfjes ontwikkelen in deze situatie soms volledige vrouwelijke kenmerken<sup>8)</sup>. Het maakt hierbij niet uit of de visjes vervolgens opgroeien in 'schoon' water zonder hormonen. Mannelijke vissen met vrouwelijke geslachtkenmerken worden ook in het wild aangetroffen. Het meest herkenbare voorbeeld is wellicht de rivier de Dommel, waarvan het water voorbij Eindhoven voor een aanzienlijk deel uit rwzi-effluent bestaat en mannelijke vis vrouwelijke kenmerken heeft<sup>5)</sup>.

Bij lagere concentraties hormonen hoeft de blootstelling van de vislarfjes niet direct tot opvallende uiterlijke afwijkingen te leiden. In Engeland is onderzoek gedaan naar stekelbaarsjes die als larve gedurende twee weken waren blootgesteld werden aan veldrelevante hormoonconcentraties<sup>9)</sup>. De dieren ontwikkelden zich uiterlijk tot normale vis zonder afwijkingen. Een jaar later echter kwamen tijdens het broedseizoen toch nadelige effecten aan het licht. De blootgestelde vissen maakten minder nesten en legden minder eieren per nest, en bovendien was de sterfte onder de eieren hoger dan

bij 'normale' stekelbaarsjes in de controle-groep. Blijkbaar is een korte blootstelling aan hormonen tijdens de eerste levensdagen voldoende geweest om het voortplantingssucces op latere leeftijd te verstoren.

### Verkennde studie

Verwacht wordt dat de hormonale activiteit tijdens het verblijf in het zuiveringsmoeras zal afnemen, omdat de verantwoordelijke stoffen worden afgebroken of, gehecht aan deeltjes, bezinken. Het zuiveringsmoeras biedt dus ook voor deze stofgroepen naar waarschijnlijkheid een extra zuiverende stap. Door Derksen *et al*<sup>10)</sup> is echter een toename van de ER-Caluxrespons in een zuiveringsmoeras geconstateerd. Het verband tussen de ER-Caluxuitslag en biologische effecten (onder andere op vis) is echter nog onduidelijk. Daardoor is niet in te schatten of hormonale stoffen in het zuiveringsmoeras tot ecologisch relevante effecten leiden bij vissen in dat moeras.

Om een eerste indruk te krijgen van mogelijke hormoonverstoring in een zuiveringsmoeras is afgelopen voorjaar door IMARES, Waterproef\* en het Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier een verkennende studie uitgevoerd in het zuiveringsmoeras bij rwzi Eversteekooop op Texel. De hormoonverstorende activiteit van het effluent in het moeras is bepaald aan de hand van de ER- en AR-Caluxtoetsen. In de vissen zijn deze effecten onderzocht aan de hand van de bepaling van het vrouwelijke eiwit Vitellogenine in mannelijke stekelbaars en de gehalten van het mannelijke eiwit

Overzicht moerassyteem Eversteekooop op Texel; uitgehangen kooien met stekelbaars



Spiggin in vrouwelijke vis. De stekelbaars is één van de weinige soorten waarbij zowel mannelijke als vrouwelijke indicatoriwitten kunnen worden onderzocht. Daarnaast is deze soort als proefdier geselecteerd, omdat het moeras zich kenmerkt door intrekende wilde populaties van stekelbaars. De ER-Caluxtest gaf een uitslag van 2,9 µg/L (EEQ), terwijl met de AR-Caluxtest geen detecteerbare activiteit werd gevonden. Het EEQ-gehalte ligt binnen de reeks van bepaalde gehalten in Nederlandse rwzi-effluenten en is laag genoeg om te veronderstellen dat geen effecten op mannelijke stekelbaars waar te nemen zijn. Het 24-uursmonster dat met de Calux-assays is onderzocht, is echter een momentopname van het effluent, waarvan de kwaliteit enorm in de tijd kan variëren. De stekelbaarzen zijn gedurende vier weken in kooien blootgesteld aan het begin en het einde van het zuiveringsmoeras, zodat invloeden van het moeras bepaald konden worden. Hoewel de gegevens enige variatie vertoonden, werd geen harde aanwijzing gevonden van hormonale verstoring bij deze dieren.

### Reden tot geruststelling?

De uitkomsten van de verkennende studie gaven geen aanleiding tot acute ongerustheid. Kan dus geconcludeerd worden dat zuiveringsmoerassen bij rwzi's geen risico vormen voor de vis? De zaak ligt iets gecompliceerder. Afgezien van het feit dat de verkennende studie slechts éénmalig en op één locatie werd uitgevoerd, is in de beschreven pilotstudie niet het meest gevoelige levensstadium van de vis in het onderzoek betrokken. Het grootste risico op effecten als gevolg van hormoonverstoring ligt bij jonge vissen die gedurende hun eerste levensdagen worden blootgesteld aan endocriene stoffen. Juist een zuiveringsmoeras biedt deze situatie; adulte vissen zetten eieren af en het moeras wordt vervolgens als kraamkamer gebruikt. Een verandering van de sexe-ratio van de

populatie kan een gevolg zijn, maar op de langere termijn, zoals hierboven beschreven, ook een verminderd paaisucces als de in het moeras opgegroeide vissen zelf geslachtsrijp zijn.

Zuiveringsmoerassen zijn de schakel tussen waterketen en watersysteem en hebben hun verdiensten bewezen in de verbetering van de effluentkwaliteit. Hoewel er geen reden lijkt te zijn voor acute bezorgdheid, is aanvullend onderzoek nodig om de kennisleemtes op te vullen over mogelijk endocriene effecten op vis in een zuiveringsmoeras. Dan kunnen sluitende uitspraken gedaan worden over de mogelijke gevolgen van hormoonverstoring op vissen in zuiveringsmoerassen. Bovendien biedt dergelijk onderzoek de mogelijkheid een bijdrage aan een ecologische normering voor met Calux gemeten hormonale activiteit. De huidige zuiveringsmoerassen bieden een ideale onderzoekslocatie om de noodzakelijke kennis over ecologische effecten van hormoonverstoring te vergaren. Kennis die noodzakelijk is om in de toekomst met een gerust hart zuiveringsmoerassen zo in te richten dat deze zeker veilig zijn voor vis.

### LITERATUUR

- 1) Vethaak D. *et al.* (2002). LOES: Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands. Occurrence, potency and biological effects. RIZA-rapport 2002.001
- 2) STOWA (2003). Review oestrogenen en geneesmiddelen in het milieu. Stand van zaken en kennislacunes. STOWA-rapport 2003-09.
- 3) Schreijer M., R. Kampf, J. Verhoeven en S. Toet (2000). Nabehandeling van effluent tot bruikbaar oppervlaktewater in een moerassysteem met helofyten en waterplanten. Resultaten van een 4-jarig demonstratieproject op rwzi Everstekoog, Texel. Hoogheemraadschap Uitwaterende Sluizen en Universiteit Utrecht.
- 4) Sumpter J. en S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the

aquatic environment. *Environ Health Perspect* nr. 103 (Suppl. 7), pag. 173-178.

- 5) Vethaak D., J. Lahr, S. Schrap, A. Belfroid, G. Rijs, A. Gerritsen, J. de Boer, A. Bulder, G. Grinwis, R. Kuiper, J. Legler, A. Murk, W. Peijnenburg, H. Verhaar en P. de Voogt (2005). An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* nr. 59, pag. 511-524.
- 6) Katsiadaki I., S. Morris, C. Squires, M. Hurst, J. James en A. Scot (2005). A sensitive, in vivo test for the detection of environmental anti-androgens, using the Three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *The national institute of environmental health sciences*.
- 7) Hahlbeck E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James en B-E. Bengtsson (2004). The juvenile three spined stickleback as a model organism for endocrine disrupting II-kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquatic Toxicology* nr. 70, pag. 311-326.
- 8) Hahlbeck E., R. Griffiths en B-E. Bengtsson (2004). The juvenile three spined stickleback as a model organisms for endocrine disruption I: Sexual differentiation. *Aquatic toxicology* pag. 287-310.
- 9) Derksen A., I. Leenen, J. Roorda en C. Uijterlinde (2006). Verkennende monitoring naar aanvullende zuiveringstechnieken voor hormoonverstoringe stoffen in rwzi's. *H<sub>2</sub>O* nr. 5, pag. 30-31.

\* IMARES is medio 2006 opgericht en samengesteld uit het RIVO, onderdelen van Alterra en de afdeling Ecologische risico's van TNO. Het instituut richt zich op ecologische ecotoxicologisch onderzoek in zoet- en zoutwatersystemen.

\*\* Stichting Waterproef voert sinds 1 januari 2005 de laboratoriumactiviteiten uit van het Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier en Waternet.

### Kooi met blootgestelde stekelbaars

