



Hormoonontregelaars in water: speurtocht naar een dreigend probleem?

D. VETHAAK, RIKZ

G. RIJS, RIZA

H. PRINS, RIZA

C. VAN DE GUCHTE, RIZA

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

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

Voor hormoonontregelende stoffen bestaat momenteel veel aandacht, omdat:

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

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

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

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

Drieluik

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

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

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

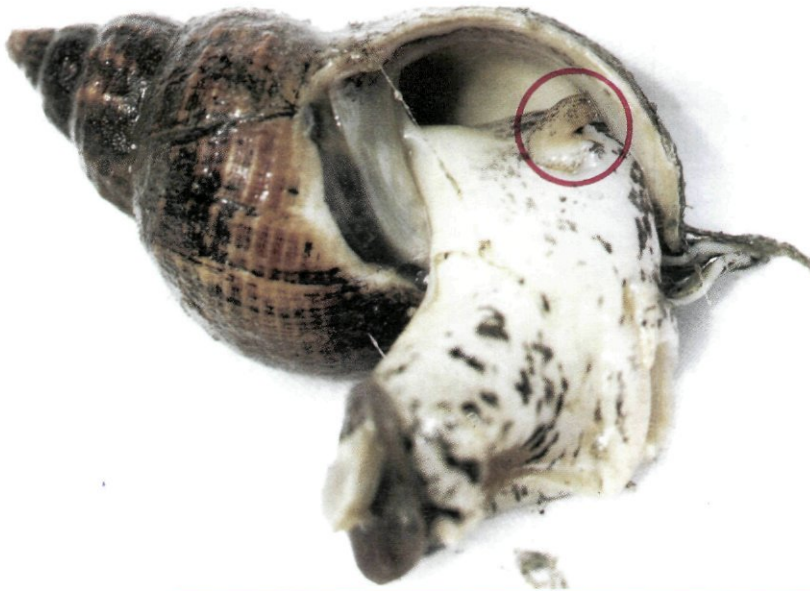
schappen van organotinverbindingen (TBT) die toegepast worden in aangroeiwerende verven op schepen.

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

Nieuwe fase in verontreinigings-problematiek

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

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



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

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

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

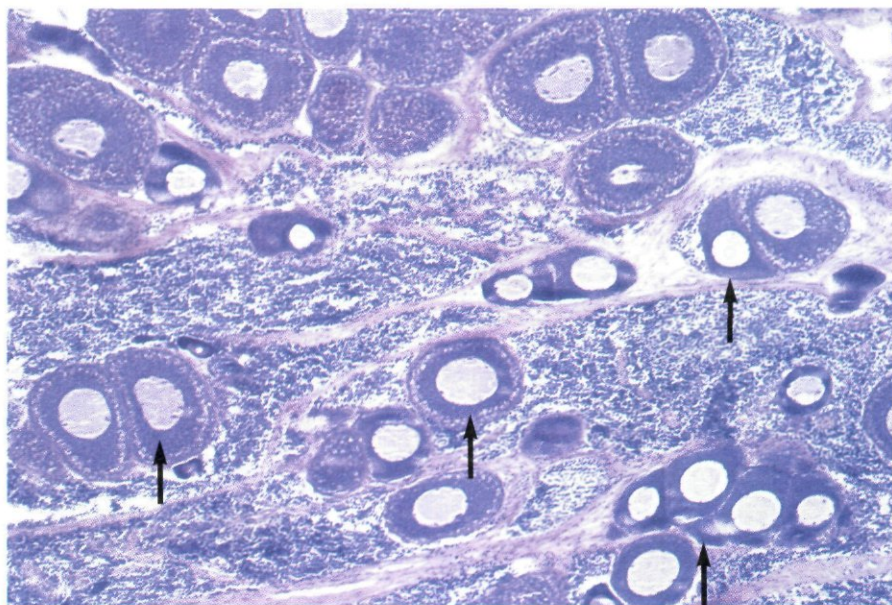
Tabel 1: Enkele gedocumenteerde effecten van hormoonontregelende stoffen op (populaties van) dieren in West-Europese en Nederlandse wateren (gebaseerd op CSTEE, 1999).

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

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

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

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



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

Effecten bij vissen

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

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

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

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

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

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

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

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

Ook in de ontvangende oppervlaktewate-

Nationaal beleid

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

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

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

Nationale onderzoeksactiviteiten

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

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

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

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

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

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

