



# Oestrogene effecten in vissen in regionale wateren nabij rwzi's

GERARD RIJS, RIZA

ANTON GERRITSEN, RIZA

JOOST LAHR, AQUASENSE, THANS ALTERRA

ASTRID BULDER, RIVM

Het Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (LOES) heeft laten zien dat hormoonontregelende stoffen bijna overal in lage concentraties in het Nederlandse watermilieu voorkomen. Vissen in regionale wateren blijken evenwel een groter risico te lopen op nadelige effecten, zoals vervrouwelijking, dan de vissen in de wat grotere wateren. De oorzaak hiervoor lijkt te liggen in het feit dat wanneer regionale wateren onder directe invloed van lozingen met hormoonontregelende stoffen staan in kleinere wateren relatief weinig verdunning optreedt. Eén van de emissiebronnen die uitgebreid onderzocht is, is het effluent van een rioolwaterzuivering.

De problematiek van hormoonontregelende stoffen in het milieu staat zowel in Nederland als internationaal volop in de belangstelling, vooral in het aquatische milieu. Aanleiding vormen de waargenomen effecten bij waterdieren in de vrije natuur, die het gevolg (zouden) zijn van de aanwezigheid van dit soort stoffen. De ongerustheid over deze waarnemingen was voor het Ministerie van Verkeer & Waterstaat aanleiding voor het uitvoeren van een aantal inventariserende studies. Hierbij is enerzijds gekeken naar de aanwezigheid van enkele hormoonontregelende stoffen in het watermilieu en anderzijds naar de geassocieerde effecten van deze stoffen op vissen in het oppervlaktewater. Te noemen zijn het LOES-onderzoek<sup>1</sup> en het in Europees verband uitgevoerde COMPREHEND-onderzoek<sup>2</sup> (Community Programme of Research on Environmental Hormones and Endocrine Disruptors). De aandacht in beide onderzoeken was vooral gevestigd op de hormoonontregelende stoffen die vervrouwelijking teweegbrengen, de stoffen met oestrogene werking. Dit zijn ofwel de vrouwelijke hormonen zelf of stoffen die deze hormonen kunnen nabootsen (de xeno-oestrogenen). Bij vissen manifesteren de vervrouwelikkende effecten zich onder meer door de aanmaak van het vrouwelijk eiwit vitellogenine in het bloedplasma van mannelijke vissen alsmede door afwijkingen in de geslachtsorganen, zoals de vorming van eicellen in mannelijk testisweefsel (ovotestis). Dit fenomeen wordt ook wel interseksualiteit genoemd (zie hiernaast).

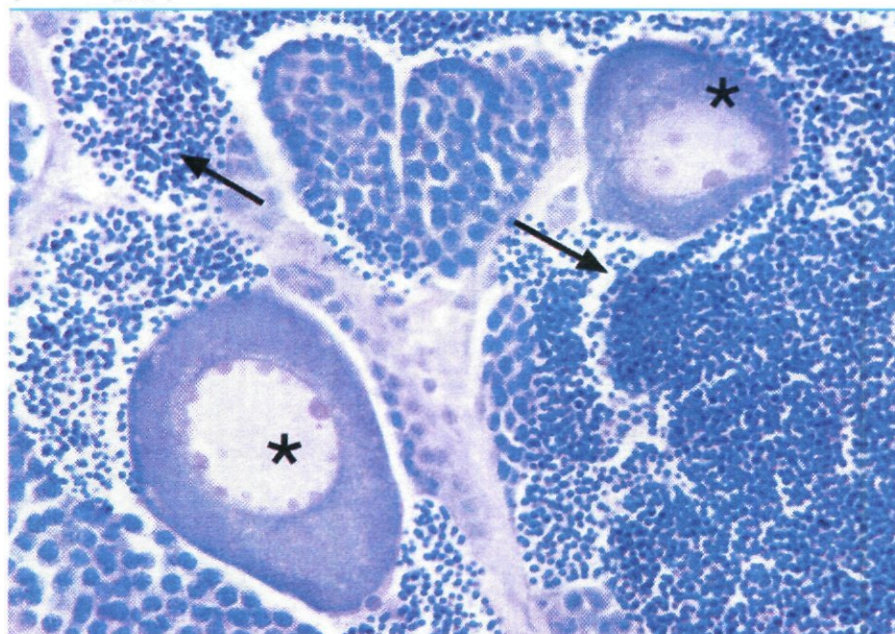
Om zo veel mogelijk inzicht te krijgen in de relatie tussen enerzijds de aangetoonde oestrogene effecten bij vissen in de vrije natuur en anderzijds de blootstelling aan concentraties hormoonontregelende stoffen en de hiervoor verantwoordelijk gestelde emissiebronnen, is in het LOES-onderzoek een combinatie aan een groot aantal - veelal nog in ontwikkeling zijnde - chemische en biologische testmethoden gebruikt. Mede hierdoor en door de inten-

sieve samenwerking tussen verschillende instanties, zoals universiteiten, adviesbureaus, waterbeheerders en verschillende ministeries is het gelukt een causaal verband aannemelijk te maken voor één van de potentiële emissiebronnen van oestrogene stoffen, namelijk het effluent van een rioolwaterzuivering. In het LOES-onderzoek is destijds als onderzoekslocatie het lozingspunt van de rwzi Eindhoven gekozen, omdat het rwzi-effluent een aanzienlijk deel vormt van het ontvangende oppervlaktewater, het riviertje de Dommel. In een later screeningsonderzoek<sup>3</sup> laten ook andere regionale wateren met een groot percentage rwzi-effluent eenzelfde beeld zien. Zowel tijdens LOES als het aansluitende screeningsonderzoek is de brasem als typische vis voor binnenwateren bestudeerd.

## Oestrogene effecten op vissen

Uit de LOES-veldstudie bleek dat vervrouwelijking van mannelijk brasems het duidelijkst kon worden aangetoond op de enige locatie waar de verdunning van de lozing met (xeno-)oestrogene stoffen met het ontvangende oppervlaktewater relatief klein was. Bij de brasem uit de Dommel, weggevangen uit de omgeving van het lozingspunt van de rwzi Eindhoven, werden zeer sterk verhoogde vitellogenine-gehalten in het bloed van mannetjes vissen aangetroffen (zie afbeelding 1). Uit histologisch onderzoek aan de geslachtsorganen van diezelfde mannelijke brasems kon bij circa eenderde van de vissen de vorming van eicellen in mannelijk testisweefsel worden waargenomen. Op de overige locaties, voornamelijk grote wateren, vertoonden de weggevangen brasems deze oestrogene effecten niet of in veel mindere mate<sup>1</sup>.

Ovotestis in mannelijke brasem: de vorming van vrouwelijke eicellen (de sterretjes) midden in testisweefsel met spermatozoën (pijl-tjes).



### Aanvullend screeningsonderzoek

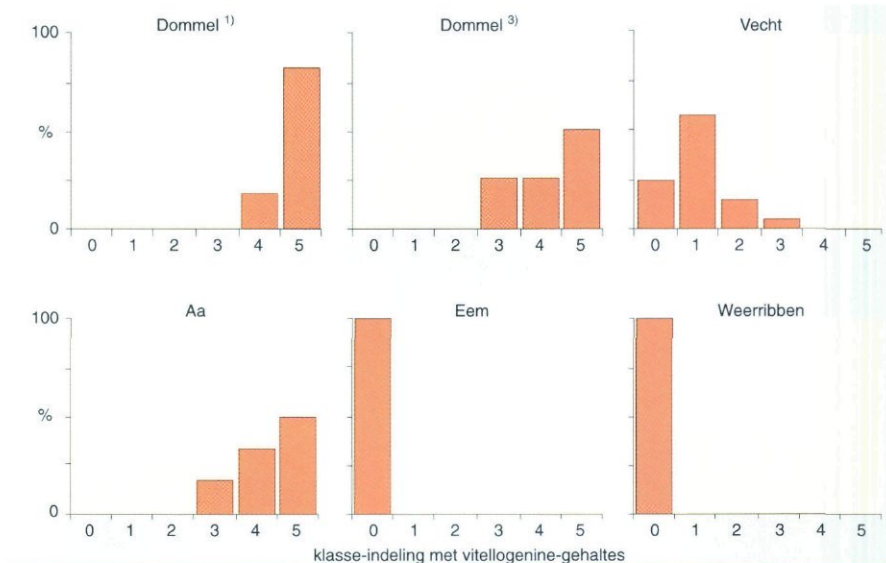
De vraag was of de Dommel ter hoogte van het lozingspunt van de rwzi Eindhoven als onderzoekslocatie een specifiek geval was of dat deze oestrogene effecten ook optraden in andere regionale wateren, die in belangrijke mate worden beïnvloed door rwzi-effluenten. In Nederland loost een groot aantal rwzi's op relatief kleine regionale oppervlaktewateren.

Gedurende een kort screeningsonderzoek<sup>3)</sup> zijn mannelijke brasems uit tien regionale wateren onderzocht op de oestrogene effecten, zoals vitellogenine-inductie en het optreden van ovotestis. Behalve de LOES-locatie de Dommel zijn de regionale wateren de Vecht, de Aa, Eem, Valleikanaal, Bornsche beek, Ringvaart Haarlemmermeer en de Linge bemonsterd op locaties die allen sterk worden beïnvloed door één of meerdere rwzi-effluenten. Het enige selectiecriteria voor deze locaties was de verdunningsratio tussen het rwzi-effluent en het ontvangende oppervlaktewater (zie tabel 1). Zuiveringstechnische aspecten van de diverse rwzi's hebben bij de keuze geen rol gespeeld.

Ook was het van belang te weten of ter vergelijking ook oestrogene effecten bij brasems in kleine oppervlaktewateren kunnen worden aangetoond, die nagenoeg niet worden beïnvloed door antropogene activiteiten. Hiervoor zijn locaties in de natuurgebieden Naardermeer en De Weerribben geselecteerd.

### Bevindingen regionale wateren

De resultaten uit dit screeningsonderzoek (zie tabel 1) bevestigen de bevindingen uit het LOES-onderzoek. Van de acht bemonsterde regionale wateren, die beïnvloed worden door rwzi-effluenten, bleken drie tot vier in meer of mindere mate oestrogene effecten bij in het



Afb. 1: Vitellogenine-gehalten in mannelijke brasem in enkele regionale wateren in Nederland<sup>1),3)</sup>. Frequentieverdelingen met verticaal percentages van de vissen en horizontaal klassen met vitellogeninegehalten.

Klasse-indeling met vitellogenine-gehalten

- 0 minder dan 10<sup>3</sup> ng/ml
- 1 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> ng/ml
- 2 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> ng/ml
- 3 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> ng/ml
- 4 10<sup>6</sup> - 10<sup>7</sup> ng/ml
- 5 meer dan 10<sup>7</sup> ng/ml

wild levende vissen te vertonen. Bij de riviertjes de Dommel en de Aa werden zowel hoge vitellogenine-gehalten in het bloed van mannelijke brasems aangetroffen alsmede het optreden van ovotestis in het testisweefsel bij respectievelijk eenderde en tweederde van de weggevangen mannelijke brasems. In de Vecht was sprake van alleen een verhoogd vitellogenine-gehalte in het bloed van mannelijke brasems, zij het in veel mindere mate dan de Dommel en de Aa (zie afbeelding 1). In de Bornsche beek werden bij blankvoorns ovotestis waargenomen, maar bij deze vissoort is

het nog onvoldoende duidelijk of het een onnatuurlijk fenomeen betreft. Bij brasems en enkele andere vissoorten is dit wel bekend. Onderzoek uit Groot-Brittannië heeft aangetoond dat 50 procent van de vissen waarbij in sterke mate ovotestis optraden, onvruchtbaar waren en bij de nakomelingen van deze vissen sprake was van 70 procent minder overleving<sup>4)</sup>.

Uit tabel 1 blijkt dat bij deze vier locaties het rwzi-effluent een aanzienlijk percentage (meer dan 30 procent) van het stroomafwaartse oppervlaktewater debiet vormt. Met name in de droge zomerperiode is het aandeel rwzi-effluent in verhouding tot het ontvangende oppervlaktewater groot. Opmerkelijk zijn de resultaten voor het Valleikanaal, waar ondanks de geringe verdunning toch geen oestrogene effecten bij brasems zijn aangetoond. Blijkbaar spelen hierbij ook andere locatiespecifieke factoren als zuiveringsrendement van de rwzi, habitat, bodemsoort en overige emissiebronnen een rol. Bij de resterende drie regionale wateren (de Eem, Linge en Ringvaart Haarlemmermeer) zijn de verdunningen veel hoger en werden bij de gevangen brasem geen oestrogene effecten waargenomen. Zij waren hiermee vergelijkbaar met de natuurlijke referentiewateren, de Weerribben en het Naardermeer.

### Rwzi-effluent als oestrogene emissiebron

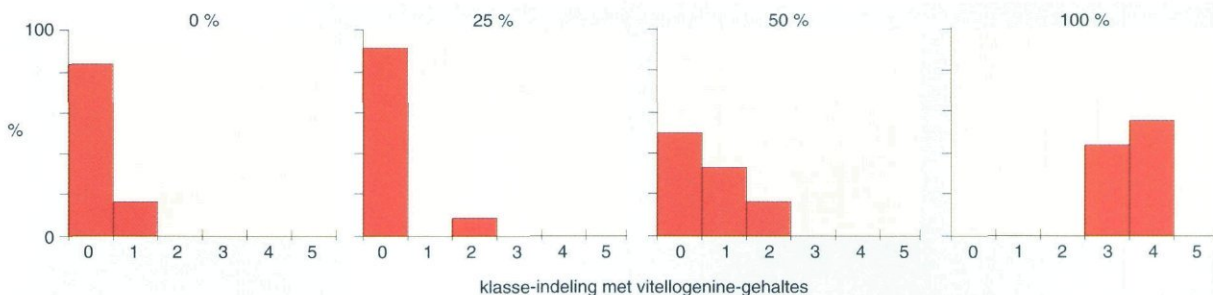
In het LOES-onderzoek zijn parallel aan de veldstudie, waarin oestrogene effecten bij in het wild levende vissen werden aangetoond, de concentraties van een aantal hormoonontregelende stoffen in onder andere het influent en effluent van de rwzi chemisch analytisch

Tabel 1. Oestrogene effecten bij mannelijke brasems uit tien regionale oppervlaktewateren<sup>3)</sup>.

oppervlaktewater	% rwzi-effluent na lozingspunt (droog/gemiddeld)	vitellogenine-inductie	ovotestis
wateren belast met rwzi-effluent			
Dommel	45/38	++	+
Vecht	46/37	+	-
Aa	64/27	++	+
Eem	25/16	-	-
Valleikanaal	60/31	-	-
Bornsche beek (blankvoorn)	88/94	nb	+*
Ringvaart Haarlemmermeer	10/5	-	-
Linge	3/3	-	-
natuurlijke referentiewateren			
Naardermeer	0	-	-
Weerribben	0	-	-

+ = aangetoond, - = niet aangetoond, nb = niet bepaald

\* Het is niet bekend of ovotestis in blankvoorn op de referentielocaties niet voorkomt.



Afb. 2: Frequentieverdeling van vitellogenine in mannelijke regenboogforel na in situ blootstelling aan rwzi-effluent (100%) en verdunningen met oppervlaktewater (0%).

Klasse-indeling met vitellogenine-gehaltenes

0 minder dan 10<sup>3</sup> ng/ml    1 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> ng/ml    2 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> ng/ml    3 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> ng/ml    4 10<sup>6</sup> - 10<sup>7</sup> ng/ml    5 meer dan 10<sup>7</sup> ng/ml

bepaald. Samen met de resultaten van zogeheten doorstroom-experimenten op locatie en met specifieke experimenten in het laboratorium kon aannemelijk worden gemaakt dat vooral de steroidhormonen (zoals het in de anti-conceptiepil toegepaste 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol en het natuurlijke vrouwelijke hormoon oestron) en mogelijk ook de nonylfenolen en nonylfenoethoxylaten verantwoordelijk ('weight of evidence') kunnen worden gesteld voor de waargenomen oestrogene effecten in het effluent en dus mogelijk ook in het ontvangende oppervlaktewater. De groep stoffen nonylfenol(ethoxylaten) worden onder meer gebruikt als industriële detergenten. Enkele meetresultaten staan in tabel 2.

### Aanwezigheid van hormoonontregelende stoffen

In ruw stedelijk afvalwater zijn de natuurlijke hormonen in alle watermonsters aantoonbaar: oestron en 17 $\beta$ -oestradiol komen in de hoogste concentraties voor. De in de anti-conceptiepil toegepaste 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol was aantoonbaar in eenderde van de ruwe rioolwatermonsters. Na biologische zuivering waren 17 $\alpha$ - en 17 $\beta$ -oestradiol niet meer in het effluent van een stedelijke rwzi aantoonbaar. Het verwijderingsrendement voor oestron in een rwzi was met meer dan 90 procent hoog. 17 $\alpha$ -Ethinyloestradiol werd slechts één keer in het rwzi-effluent aangetoond; de concentratie in de overige effluentmonsters lag beneden de detectiegrens.

De aanwezigheid van nonylfenolen en nonylfenoethoxylaten vertonen in ruw stedelijk afvalwater een grillig patroon; de ene keer worden ze in hoge concentraties en de andere keer in lage concentraties aangetroffen. Dit wijst op periodieke lozingen. Tijdens de zuivering worden de goed in water oplosbare nonylfenoethoxylaten afgebroken tot de meer persistente hydrofobe nonylfenolen, die aan het zwevend materiaal zullen adsorberen. Deze nonylfenolen hebben een hogere oestrogene potentie dan de oorspronkelijke nonylfenol-

ethoxylaten. In het biologische gezuiverde rwzi-effluent lagen de concentraties van de nonylfenol(ethoxylaten) in het totaalmonster doorgaans onder de detectiegrens. Dit betekent evenwel niet dat met het rwzi-effluent geen nonylfenol(ethoxylaten) in het oppervlaktewater terecht komt. Door gebruik te maken van een doorstroomcentrifuge voor het bemonsteren van het rwzi-effluent is het mogelijk gebleken om ook de gehalten in uitsluitend de zwevende stof fractie van het rwzi-effluent te bepalen. Voor nonylfenoethoxylaten bleken concentraties tot 70  $\mu$ g/g.ds en voor nonylfenol tot 12  $\mu$ g/g.ds in het zwevende stof aantoonbaar. Bij een geschat gemiddeld zwevend stofgehalte in het rwzi-effluent van drie milligram per liter en een totaal hoeveelheid geloosd rwzi-effluent in Nederland van bijna twee miljard kubieke meter per jaar komt dit overeen met een jaarlijkse belasting van circa 200 en 50 kilo respectievelijk voor nonylfenoethoxylaat en nonylfenol, dat via het rwzi-effluent wordt afgevoerd naar oppervlaktewater.

### Oestrogene potentie

Uit de meetresultaten blijkt dus dat rwzi's een groot aantal (xeno-)oestrogene stoffen efficiënt verwijderen. Hierdoor wordt de oestrogene potentie van het ruwe ongezuiverde rioolwater in zeer belangrijke mate gereduceerd. Desondanks kan het rwzi-effluent een deel van zijn oestrogene potentie behouden en een emissiebron van oestrogene potentie blijven. Dit kan leiden tot de eerder genoemde vervrouwelijkende oestrogene effecten op waterorganismen nabij het lozingspunt. Aan de hand van een aantal aanvullende biologische studies wordt dit verband verder geïllustreerd en aannemelijk gemaakt.

### In situ doorstroomexperimenten

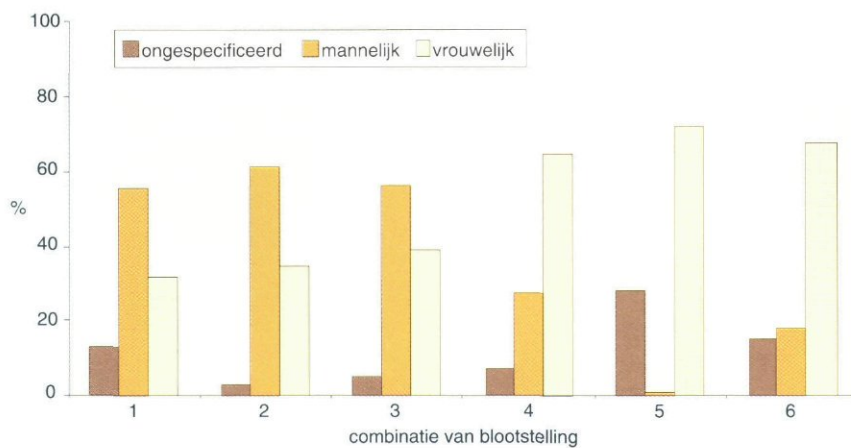
Zo zijn met in situ doorstroomexperimenten op de rwzi Eindhoven testvissen (regenboogforellen) ter plekke gedurende twee weken blootgesteld aan verdunningen van het effluent met het bovenstroomse oppervlaktewater uit de Dommel (van 100 procent rwzi-effluent tot 100 procent oppervlaktewater). Het

Tabel 2. Concentratieranges van steroidhormonen en nonylfenol(ethoxylaten) in ongezuiverd stedelijk afvalwater en rwzi-effluenten<sup>1)</sup>.

parameter	ongezuiverd stedelijk afvalwater	rwzi-effluent
17 $\alpha$ -oestradiol (ng/l)	0,7- 15	< 0,4
17 $\beta$ -oestradiol (ng/l)	17 - 150	< 0,8
oestron (ng/l)	20 - 130	< 0,3 - 11
17 $\alpha$ -ethinyloestradiol (ng/l)	< 0,3 - 5,9	< 0,3 - 2,6
nonylfenoethoxylaten ( $\mu$ g/l)	< 0,82 - 125	< 1,9 - 2,2
nonylfenol ( $\mu$ g/l)	< 0,24 - 19	< 0,55 - 1,5

Tabel 3. Aantal legsels en totaal aantal gelegde eieren per groep volwassen zebravissen<sup>1)</sup>.

testmedium	referentie (DSW)	vrouwelijk hormoon 1 nM 17 $\alpha$ -oestradiol	rwzi-effluent
aantal legsels	17	15	5
totaal aantal eieren	4366	3215	1859



combinatie van blootstelling	1 referentie	2	3	4	5	6
blootstelling volwassenen	DSW	E2	rwzi-effluent	DSW	E2	rwzi-effluent
blootstelling eieren/pasgeboren vissen	DSW	DSW	DSW	rwzi-effluent	E2	rwzi-effluent

Afb. 3: Geslachtsverschuiving van jonge zebravissen na blootstelling van de ouderlijke vissen en de eieren/pasgeborenen in verschillende combinaties van referentiewater (DSW), het vrouwelijk hormoon 17 $\alpha$ -oestradiol (E2, 1 nM) en het geloosde rwzi-effluent.

100 procent rwzi-effluent bleek oestrogene effecten te vertonen in de vorm van een hoge tot zeer hoge vitellogenine-inductie in alle mannelijke regenboogforellen. Verdunning van dit rwzi-effluent met oppervlaktewater uit de Dommel resulteerde in aanzienlijke verlaging van de vitellogenine-inductie (zie afbeelding 2).

### PLC-test in laboratorium

In een in vivo experiment, de zogenaamde 'partial life cycle test' (PLC-test) met zebravissen, zijn op laboratoriumschaal geslachtsverschuivingen bij jonge vissen aangetoond<sup>5)</sup>. In de PLC-test waren in eerste instantie volwassen zebravissen gedurende 25 dagen blootgesteld aan het referentiemedium Dutch Standard Water (DSW), aan het natuurlijke vrouwelijke hormoon 17 $\alpha$ -oestradiol en het daadwerkelijk geloosde rwzi-effluent uit Eindhoven. In de laatste twee gevallen nam het aantal legsels en het aantal gelegde eieren af ten opzichte van het referentiemedium DSW (tabel 3). Onduidelijk is of dit effect bij het rwzi-effluent veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van hormoonontregelende stoffen of algehele stress van de vissen door het (over)leven in een sterk gewijzigd medium.

Vervolgens werden de jongen vanaf het vroege eistadium gedurende zes weken blootgesteld aan dezelfde drie media als de ouderdieren. Na deze periode heeft geslachtbepaling van de jonge visjes plaatsgevonden. Bij de juvenielen die blootgesteld waren geweest aan

17 $\alpha$ -oestradiol en het geloosde rwzi-effluent was een duidelijke verschuiving ten gunste van het vrouwelijke geslacht te zien, resulterend voor de effluent-groep in 17 procent mannelijke, 15 procent ongedifferentieerde en 68 procent vrouwelijke zebravisjes (afbeelding 3). De feitelijke blootstelling van de juvenielen was hierbij doorslaggevend en niet de blootstelling van de ouders. Tot op heden is onbekend of de geslachtsverandering blijvend of reversibel is.

### Hoe nu verder?

Het screeningsonderzoek laat zien dat op basis van de momenteel beschikbare informatie over onder meer de emissiebronnen van de steroidhormonen en nonylfenol(ethoxylaten), de verdunningsratio's tussen rwzi-lozingen en het ontvangende oppervlaktewater het goed mogelijk is de risicolocaties voor hormoonontregeling in het Nederlandse aquatische milieu te identificeren. Alleen de emissie van de steroidhormonen uit mest naar de poldersloten en de mogelijke resulterende oestrogene effecten bij de waterdieren in gebieden met intensieve veehouderij dient nog nader gekwantificeerd te worden. Door deze inventarisatie naar potentiële risicolocaties in regionale wateren verder te continueren krijgen de waterbeheerders een beeld van de mate van voorkomen van hormoonontregeling in hun beheersgebied.

Verder is meer inzicht nodig in de gevolgen van langdurige blootstelling van andere vissoorten en waterdieren aan hormoonontregelende stoffen en de ecologische relevantie

van de aangetoonde oestrogene effecten bij mannelijke vissen (zoals vitellogenine-inductie of het optreden van ovotestis) voor de voortplanting en de populatie van de desbetreffende vissoorten. Zo is nog onbekend of de oestrogene effecten zullen verdwijnen als deze vissen niet meer worden blootgesteld aan (xeno-)oestrogene stoffen. De verwachting is dat de vitellogenine-inductie in de tijd zal afnemen, omdat vitellogenine in bloedplasma doorgaans een halfwaardetijd heeft van enkele weken. De aanwezigheid van ovotestis wordt wel eens in verband gebracht met de blootstelling aan (xeno-)oestrogene stoffen in het juveniele stadium wanneer de seksuele differentiatie plaatsvindt.

Voor het verwijderen van hormoonontregelende stoffen in een rwzi is het het beste een onderscheid te maken tussen aan zwevende stof adsorbeerbare en de hydrofiële stoffen. Het tegenhouden van hydrofobe hormoonontregelende stoffen (zoals nonylfenol) uit het rwzi-effluent kan zoveel mogelijk geschieden door middel van de momenteel bestaande of in ontwikkeling zijnde vergaande verwijderingstechnieken voor zwevende stof zoals zand- en membraanfiltratie of de membraanbioreactor. Voor verdere verbetering van de verwijderingsefficiëntie van de steroidhormonen in een rwzi dient aansluiting te worden gezocht bij de verdere optimalisatie van de zuiveringsprocessen van de huidige rwzi's of het toekomstig onderzoek naar geavanceerde zuiveringstechnieken voor de verwijdering van de goed in water oplosbare maar biologisch slecht afbreekbare stoffen in een rwzi. De resultaten van een STOWA-literatuurstudie<sup>5)</sup> naar de verwijdering van hormoonontregelende stoffen in een rwzi komen in het hiernavolgende artikel aan bod. ◀

### LITERATUUR

- 1) Vethaak D., G. Rijs, M. Schrap, H. Ruiter, A. Gerritsen en J. Lahr (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands. Occurrence, Potency and Biological Effects. RIZA/RIKZ-rapport 2002.001.
- 2) Pickering A. and J. Sumpter (2003). COMPRENDING Endocrine Disruptors in Aquatic Environments. Environmental Science & Technology nr. 9, pag. 331-336.
- 3) Gerritsen A., G. Rijs, J. Klein Breteler en J. Lahr (2003). Oestrogene effecten in vissen in regionale wateren. RIZA-rapport 2003.019.
- 4) ENDS (2002). Regulating estrogens: effluent controls the horizon. Report 327, pag. 24-28.
- 5) Lahr J., P. Loeffen, A. Derksen en P. Roelvelde (2003). Verwijdering van hormoonversturende stoffen in rioolwater-zuiveringsinstallaties. STOWA-rapport 2003-15.
- 6) Bulder A., E. van den Brandhof, S. van Beusekom, T. Traas en J. Canton (2003). Effects of (xeno-)estrogens in municipal effluent on reproduction and development of zebrafish (*Danio rerio*), measured by a partial life cycle test. In concept voor Environmental Toxicology and Chemistry.