
Hormoonontregelaars in ecosystemen

Aanbiedingsbrief

Hormoonontregelaars in ecosystemen

aan:

de Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer

Nr 1999/13, Den Haag, 22 juli 1999

Deze publicatie kan als volgt worden aangehaald:

Gezondheidsraad: Hormoonontregelaars in ecosystemen. Den Haag: Gezondheidsraad, 1999; 1999/13.

Preferred citation:

Health Council of the Netherlands: Hormone disruptors in ecosystems. The Hague: Health Council of the Netherlands. 1999; 1999/13.

auteursrecht voorbehouden

all rights reserved

ISBN: 90-5549-270-1

Inhoud

1	Inleiding <i>19</i>
1.1	Achtergrond <i>19</i>
1.2	Adviesaanvraag en commissie <i>21</i>
1.3	Opzet van dit advies <i>21</i>
2	De geslachtshormoonhuishouding van gewervelde dieren <i>23</i>
2.1	Wat is een hormoon? <i>23</i>
2.2	Geslachtshormonen: classificatie en synthese <i>24</i>
2.3	Functies van geslachtshormonen <i>27</i>
2.4	Regulering van de geslachtshormoonproductie <i>28</i>
2.5	Wisselwerking tussen de geslachtshormoonhuishouding en andere hormoonsystemen. <i>30</i>
2.6	Verstoring van de geslachtshormoonhuishouding <i>31</i>
2.7	Afbakening <i>33</i>
3	Gedocumenteerde effecten <i>35</i>
3.1	Effecten bij vogels en (zee)zoogdieren <i>37</i>
3.2	Effecten bij vissen <i>41</i>
3.3	Resultaten van in-vitrotests uitgevoerd in Nederland <i>43</i>
3.4	Veldwaarnemingen van effecten bij ongewervelde dieren <i>43</i>
3.5	Conclusies <i>45</i>

4	Classificatie van milieuvreemde potentiële hormoonontregelaars in het Nederlandse milieu 49
4.1	Criteria en gegevens 49
4.2	Discussie 59

5	Natuurlijke en synthetische hormonen in het milieu 61
5.1	Emissie van natuurlijke hormonen van menselijke en dierlijke herkomst 62
5.2	Lotgevallen van geëmitteerde natuurlijke en synthetische hormonen 66
5.3	Milieuconcentraties in Nederland 68
5.4	Effecten van natuurlijke en synthetische hormonen op aquatische organismen 69
5.5	Fyto-oestrogenen 69
5.6	Conclusies 72

6	Beantwoording van de vragen 73
---	--------------------------------

	Literatuur 83
--	---------------

	Bijlagen 95
A	De adviesaanvraag 97
B	De commissie 99
C	Overzichtstabel van het classificatieresultaat voor 77 stoffen 101
D	Indicatorsoorten 109

Samenvatting, conclusies en aanbevelingen

De laatste jaren zijn bij een groot aantal diersoorten verstoringen van de voortplanting gevonden die zijn toegeschreven aan de invloed van bepaalde stoffen in het milieu op hormoonsystemen. In diverse publicaties is het vermoeden geuit dat dergelijke stoffen ook de mens beïnvloeden. De Gezondheidsraad heeft in 1997 geconcludeerd dat de juistheid van dit vermoeden voor de Nederlandse bevolking niet is aangetoond. In het voorliggende advies beschrijft de Raad — op verzoek van de Minister van VROM — de stand van de wetenschap inzake de invloed van hormoonontregelende stoffen op de voortplanting van dieren in Nederlandse ecosystemen.

De commissie richt zich primair op stoffen die aangrijpen op de geslachtshormoonhuishouding. Zij noemt een stof een hormoonontregelaar als deze de voortplanting kan verstoren. Zijdelings beschouwt zij ook de effecten van stoffen op de schildklierhormoonhuishouding, gezien het belang van dit systeem voor de ontwikkeling en de voortplanting.

Om de betekenis van hormoonontregelaars voor de Nederlandse situatie in kaart te brengen, heeft de commissie het in ons land verrichte veldonderzoek geïnventariseerd. Daarnaast heeft zij ongeveer tachtig pesticiden en stoffen van industriële herkomst geclassificeerd naar hun hormoonontregelende potentie in het Nederlandse milieu. Ook de aanwezigheid en de mogelijke invloed van een aantal natuurlijke en synthetische hormonen komen aan de orde. Deze stoffen worden door de mens en vooral door landbouwhuisdieren in aanzienlijke hoeveelheden uitgescheiden.

In tegenstelling tot hetgeen bekend is over de situatie bij de mens zijn bij dieren in Nederlandse ecosystemen wel effecten op de voortplanting aangetoond of aannemelijk. De meeste onderzoeken hebben betrekking op dieren in aquatische ecosystemen (inclusief vogels en zoogdieren die hun voedsel aan die systemen ontlenuen); over de gevolgen van deze stoffen voor op het land levende dieren is veel minder bekend.

Onder de mogelijk met de aanwezigheid van dergelijke stoffen in het compartiment water geassocieerde schadelijke effecten neemt zogeheten interseksualiteit een prominente plaats in. Bepaalde slakkensoorten in de kustgebieden van de Noordzee zijn in mindere of meerdere mate door één enkele stof (tributyltin) aangetast. Onbekend is de doorwerking hiervan op populaties van andere soorten die zich in de voedselketen bevinden, en op het functioneren van een ecosysteem als geheel. Ook bij vissen zijn ongunstige verschijnselen gevonden die zijn toe te schrijven aan de invloed van hormoonontregelende stoffen. Het is echter nog onduidelijk om welke stoffen het gaat en op welke schaal zich effecten voordoen. Blijkens Brits onderzoek is er een associatie tussen interseksualiteit (die op grote schaal bij bepaalde vispopulaties is gevonden) en het voorkomen van verhoogde gehalten van een bepaald eiwit (vitellogenine) bij mannetjesvissen. Dergelijke verhogingen wijzen op een oestrogeen effect, veroorzaakt door in het milieu aanwezige stoffen. Uit het nog beperkte onderzoek onder vispopulaties in ons land blijkt dat er in de Nederlandse estuaria eveneens sprake is van een verhoging.

Bij bepaalde soorten van visetende vogels en (zee)zoogdieren zijn volgens de commissie negatieve effecten van DDE, PCB's en dioxines op de reproductie voldoende aangetoond. Door die effecten is de omvang van (plaatselijke) populaties verminderd. Vooral in sedimentatiegebieden van Rijn, Maas en Schelde zijn de milieuconcentraties van genoemde stoffen nog dermate hoog dat voor aldaar levende visetende toppredatoren nog steeds een ongunstige invloed op de reproductie en de ontwikkeling te verwachten is.

Van ongeveer tachtig als verdacht beschouwde pesticiden en stoffen van industriële herkomst bestempelt de commissie er 34 als (potentiële) hormoonontregelaars in Nederland. Het gaat hier om alkylfenolen, organochloor-, organobroom- en organotinverbindingen, ftalaten en triazines. Sommige van deze stoffen — bijvoorbeeld de organochloorverbindingen — zijn vooral in het verleden gebruikt, van andere is de toepassing — en daarmee de verspreiding in het milieu — van meer recente datum. Voorbeelden van deze laatste zijn de persistente organobroomverbindingen die al diep in de voedselketen in de oceanen zijn doorgedrongen. Voor de meeste stoffen zijn uitsluitend gegevens over zoogdieren beschikbaar. Daardoor is voor die stoffen niet na te gaan in hoeverre zij een rol spelen bij in het water levende dieren.

De commissie merkt ook enkele natuurlijke en synthetische oestrogenen aan als hormoonontregelaars. Deze stoffen worden door de mens en vooral door landbouwhuisdieren in aanzienlijke hoeveelheden uitgescheiden en komen door uitspoeling en via rioolwa-

terzuiveringsinstallaties in het oppervlaktewater terecht. De concentraties van deze zeer potente hormonen zijn in de grote rivieren, globaal genomen, voldoende hoog voor het te weegbrengen van effecten bij aquatische dieren. De commissie wijst erop dat het aanneemelijk is dat nog hogere concentraties van natuurlijke hormonen voorkomen in het oppervlakte water in gebieden met intensieve dierhouderij.

Volgens de commissie zijn er voldoende redenen voor bezorgdheid over de aanwezigheid van stoffen in vooral het aquatische milieu die de geslachtshormoonhuishouding van organismen kunnen ontregelen en daardoor het voortbestaan van soorten in ecosystemen in gevaar kunnen brengen. Bij sommige soorten zijn effecten op individuen en populaties aangetoond of aanneemelijk. Gegevens over de gevolgen daarvan voor levensgemeenschappen en gehele ecosystemen ontbreken. Aangezien maar zeer weinig gericht onderzoek is gedaan naar die gevolgen, is het goed mogelijk dat hormoonontregeling op een grotere schaal voorkomt dan blijkt uit deze inventarisatie. Doordat de laatste jaren veel stoffen zijn onderzocht op hun hormoonontregelende werking is de lijst van (potentiële) hormoonontregelaars sterk gegroeid. Gezien het grote aantal stoffen die de komende jaren nog onderzocht gaan worden, ligt het in de rede dat het aantal stoffen dat als (potentiële) hormoonontregelaar is aan te merken nog sterk zal toenemen.

Bij het voorgaande moet ook bedacht worden dat Nederland binnen Europa ten aanzien van de aanwezigheid van hormoonontregelaars in het milieu een unieke plaats inneemt. Verschillende Europese rivieren voeren hormoonontregelaars aan naar ons land. Doordat Nederland een sedimentatiegebied is, blijven juist de persistente stoffen achter in de waterbodems. Ook kent ons land een zeer intensieve landbouw waarin diverse stoffen worden gebruikt die (mogelijk) een hormoonontregelende werking hebben. De aanwezigheid van aanzienlijke hoeveelheden natuurlijke hormonen als gevolg van de grote aantallen mensen en vooral landbouwhuisdieren komt daar nog bij.

De commissie beveelt aan om de monitoringsprogramma's vooral te richten op het milieucompartiment water en op mest. Ten aanzien van de natuurlijke hormonen verdienen vooral kleine sloten en mest de hoogste prioriteit. Veel aandacht vragen de 34 stoffen die de commissie heeft geclassificeerd als (potentiële) hormoonontregelaars. Voor sommige van die stoffen, te weten enkele organochloorverbindingen, is overigens al succesvol beleid in uitvoering. Gezien haar constatering dat er weinig veldonderzoek is verricht naar de effecten van hormoonontregelaars in ecosystemen, pleit de commissie voor uitbreiding van de deels al bestaande monitoringsprogramma's.

De commissie vindt het beschikbare instrumentarium voor monitoring van effecten op de geslachtshormoonhuishouding bij dieren weliswaar beperkt maar voldoende. Tot dit instrumentarium behoren ondermeer leeftijdsopbouw en geslachtsverdeling van populaties, verplaatsing van individuen (van indicatorsoorten), in-vitrotests en chemische monitoring. Zij beveelt aan om de bestaande monitoringsprogramma's uit te breiden met

sommige van deze technieken. De commissie benadrukt dat er geen beproefde aanpak is: monitoring vereist een iteratief proces van samenwerking tussen disciplines, waarbij stapsgewijs moet blijken welke aanpak de meest effectieve is.

Executive summary

Health Council of the Netherlands: Hormone disruptors in ecosystems. The Hague: Health Council of the Netherlands. 1999; 1999/13

In recent years effects on reproduction have been identified in a large number of animal species and these effects have been attributed to the influence on hormonal systems of certain substances that are present in the environment. The supposition has been expressed in various publications that such substances also have an impact on human beings. In 1997 the Health Council of the Netherlands reached the conclusion that this supposition has not been verified for the Dutch population. In this advisory report, the Health Council — acting upon the request of the Minister of Housing, Spatial Planning and the Environment (VROM) — describes the current level of knowledge on the effects of hormone disruptors on animal reproduction in Dutch ecosystems.

The Committee focuses primarily on substances that interfere with the sex-hormone hormone balance. It calls a given substance a hormone disruptor if it is capable of disturbing reproductive physiology. The Committee also considers the effects of substances on the thyroid balance, in view of the important role which this system plays in development and reproduction.

In order to chart the implications of hormone disruptors for the situation in the Netherlands, the Committee has conducted an inventory of the field research that has been carried out in this country. In addition, it has classified around 80 pesticides and substances of industrial origin according to their hormone-disrupting capacity in the Dutch environment. The presence and possible effects of a number of natural and synthetic hormones have also been surveyed. These substances are excreted in substantial quantities by humans and especially by livestock.

In contrast to the situation in humans, effects on animal reproduction have definitely either been demonstrated, or else they are likely, in Dutch ecosystems. The majority of studies relate to animals in aquatic ecosystems (including animals predating in these systems), with much less being known about the effects of these substances on animals that live on the land.

Intersexuality is prominent among the (possible) harmful effects that are associated with the presence of such substances in the water compartment. It is clear, for example, that certain species of snail which inhabit the coastal areas of the North Sea have, to some extent, been affected by a specific substance (tributyltin). It is not known what impact this has on populations of different species that are present in the food chain, and thus on the functioning of the ecosystem as a whole. Unfavourable phenomena have also been identified in fish, which are attributable to the impact of hormone disruptors. What remains unclear, however, is precisely which substances are involved and the scale of the effects in question. According to British research, there is a link between intersexuality, which has been discovered on a large scale in certain fish populations, and the occurrence of increased levels of a specific protein (vitellogenin) in male fish. Such increases point to an oestrogenic effect caused by substances that are present in the environment. Based on research in our country, although as yet limited, it also appears that an increase of vitellogenin in male fish is occurring in the Dutch estuaries.

According to the Committee, there is sufficient evidence of the negative effects of DDE, PCBs and dioxins on reproduction in certain species of fish-eating birds and (marine) mammals. These effects have — especially in the past — led to a decrease in (local) populations. The environmental concentrations of these substances — especially in sedimentation areas of the Rhine, Meuse and Scheldt rivers — are still so high that an adverse impact on the reproduction and development of resident fish-eating top predators can still be expected.

The Committee designates 34 of the 80 or so pesticides and substances of industrial origin in the Netherlands as (potential) hormone disruptors. These are alkylphenols, organochlorine, organobromine and organotin compounds, phthalates and triazines. Some of these substances — for example, the organochlorine compounds — have mainly been used in the past, while in other cases usage — and therefore dispersion in the environment — is more recent. Examples of the latter category are the persistent organobromine compounds, which have already penetrated deep into the food-chain in the oceans. For the majority of substances, data are only available about mammals. For these substances it is therefore impossible to verify the extent to which xenobiotic substances play a role in aquatic animals and invertebrates.

The Committee also regards some natural and synthetic oestrogens as hormone disruptors. These substances are excreted in substantial quantities by humans and, in parti-

cular, by livestock and find their way into the surface water by a process of leaching and via sewage treatment plants. The concentrations of these extremely potent hormones in the major rivers are, broadly speaking, sufficiently high to give rise to effects on aquatic animals. In this regard, the Committee points out that it is likely that even higher concentrations of natural hormones occur in surface waters in areas of intensive livestock production.

According to the Committee, there are sufficient scientifically founded grounds for concern over the presence of substances — especially in the aquatic environment — which are capable of disrupting the sex-hormone balance in organisms and which might therefore pose a threat to the continued existence of species in ecosystems. In some species, effects on individuals and populations have actually been demonstrated, or else they are likely. Precisely what implications this has for biotic communities and entire ecosystems is unknown. However, because only very limited research has been carried out into the effects of the hormone disruptors that are present in the environment, it is quite possible that hormone disruption is more widespread than appears from the present report. It is precisely because many substances have been investigated in recent years for their hormone-disrupting action that this list has already grown considerably. Given the large quantity of substances that stand to be investigated over the next few years, it is reasonable to suppose that the number of substances that can be labelled as (potential) hormone disruptors will continue to rise substantially.

In this connection it should also be borne in mind that the Netherlands occupies a unique position in Europe as far as the presence of hormone disruptors in the environment is concerned. Various European rivers bring hormone disruptors into the Netherlands. Because the Netherlands is a sedimentation area, it is precisely the persistent hormone disruptors that remain in the sediments. This country also has an extremely intensive agriculture industry which uses various substances that (possibly) exhibit hormone disruptive effects. Account also needs to be taken of the presence in this small country of natural hormones as a result of its large numbers of humans and, in particular, livestock.

The Committee recommends that the monitoring programmes should be focused primarily on the water compartment and on manure. As far as the natural hormones are concerned, maximum priority needs to be given to small ditches and manure. Of the other substances, attention needs to be focused principally on the 34 substances which the Committee has classified as (potential) hormone disruptors, with the exception of a number of the organochlorine compounds, for which a successful policy has already been implemented. In view of its conclusion that little field research has been conducted into the effects of hormone disruptors within ecosystems, the Committee advocates that those monitoring programmes that already exist should be extended.

The Committee concludes that the instruments that are already available for monitoring effects on the sex-hormone balance in animals — although limited — are, nevertheless, adequate. These instruments include, amongst others, age structure and sex ratios of populations, transplanted sentinels, *in vitro* tests and chemical monitoring. It recommends extending the existing monitoring programmes with some of these techniques. The Committee emphasises the fact that there is no proven approach and that monitoring requires an iterative process, involving interdisciplinary collaboration, whereby ongoing efforts are made to determine which approach is the most effective.

Inleiding

1.1 Achtergrond

De mogelijkheid dat bepaalde milieucontaminanten hormonale (endocriene) effecten op mensen en dieren hebben, krijgt de laatste jaren grote belangstelling van de wetenschappelijke wereld, de media en andere belanghebbenden. Het gaat vooral om effecten op de reproductie door veranderingen in de (geslachts)hormoonhuishouding. Bij vogels, zeezoogdieren, panters, alligators, vissen en slakken zijn afwijkingen gevonden aan voortplantingsorganen of in het seksueel gedrag, die zijn toegeschreven aan blootstelling aan stoffen die hormoonsystemen kunnen beïnvloeden. Volgens diverse onderzoekers kunnen dergelijke stoffen ook bij de mens effecten hebben.

In de jaren zeventig en tachtig is veelvuldig gepubliceerd over endocriene effecten van stoffen bij mens en dier. De laatste tijd is zowel het onderzoek als de publieke aandacht voor deze effecten in een stroomversnelling geraakt.

Door in plaats van het effect een werkingsmechanisme — namelijk de verstoring van hormoonsystemen — centraal te stellen, is een ander beeld van de gevolgen van de in het milieu aanwezige stoffen ontstaan. In dat beeld spelen drie facetten een belangrijke rol, te weten de intrinsieke gevoeligheid van hormonale systemen, de veelheid van de in het geding zijnde stoffen en de zogeheten ‘*human-wildlife* connectie’.

Bij mens en dier zijn er tijdens de ontwikkeling van het organisme — vóór en na de geboorte — specifieke periodes van grote gevoeligheid voor hormonale verstoring. Zelfs een eenmalige en betrekkelijk lage dosis van een hormoonontregelende stof — zo laag dat nog geen sprake hoeft te zijn van ‘normale toxiciteit’ — kan dan al leiden tot onher-

stelbare schade. Mede dankzij de beschikbaarheid van uiterst gevoelige in-vitrotests staan inmiddels tal van stoffen te boek als potentiële hormoonontregelaars. Op een in 1993 in Winconsin gehouden conferentie is dit als volgt geformuleerd:

A large number of man-made chemicals that have been released in the environment, as well as a few natural ones, have the potential to disrupt the endocrine system of animals, including humans. Among these are the persistent, bioaccumulative, organohalogen compounds that include some pesticides (fungicides, herbicides, and insecticides) and industrial chemicals, other synthetic chemicals, and some metals...

Zowel mensen als dieren worden aan een (groot) aantal van deze stoffen tegelijkertijd blootgesteld. Dit feit, gecombineerd met de waarneming van afwijkingen bij in het wild levende dieren, én het gegeven dat de hormoonsystemen van de mens veel gelijkenis vertonen met die van dieren, heeft geleid tot het concept van de ‘*human-wildlife connectie*’. Centraal in dit concept staat het vermoeden dat, blijkens overtuigende waarnemingen bij in het wild levende dieren, hormoonontregeling ook het werkingsmechanisme is achter de in diverse publicaties beschreven verbanden tussen bepaalde ziekten of afwijkingen bij de mens en de aanwezigheid van milieucontaminanten. Te denken valt hier aan een vermindering van de spermakwaliteit en -kwantiteit, afwijkingen aan de geslachtsorganen en het ontstaan van hormoonafhankelijke tumoren. In de media is dit vraagstuk — met het accent op de vermindering van de mannelijke vruchtbaarheid — onder de aandacht van een groot publiek gebracht. Het is de vraag in hoeverre genoemd vermoeden gerechtvaardigd is. Niet alleen zijn de gehalten waaraan dieren in sterk gecontamineerde gebieden worden blootgesteld veel hoger dan bij de mens het geval is, het gaat bij dieren ook om andere cocktails van stoffen. Feit is niettemin dat de ‘*human-wildlife connectie*’ heeft geleid tot een *early warning* voor problemen bij de mens.

De Gezondheidsraad heeft in 1997 een advies uitgebracht over de vraag in hoeverre er reden is voor bezorgdheid over de invloed van hormoonontregelaars op de menselijke voortplanting en ontwikkeling, speciaal in Nederland (GR97). Uit dat advies komt naar voren dat blootstelling aan een aantal van deze stoffen wel plaatsvindt en dat deze stoffen ook een (negatieve) invloed op de voortplanting en ontwikkeling kunnen hebben, maar dat een causaal verband tussen blootstelling en het vóórkomen van effecten bij de bevolking niet is vastgesteld. Niettemin verdient, aldus het advies, de mogelijke invloed van hormoonontregelaars op de gezondheid van de mens serieuze aandacht.

Als vervolg op het zojuist genoemde advies, gaat het voorliggende advies over de invloed van hormoonontregelaars op de voortplanting van dieren in ecosystemen in Nederland. Er zijn redenen om aan te nemen dat de Nederlandse situatie met betrekking tot ecosystemen anders kan zijn dan in de ons omringende landen. Niet alleen is Nederland een delta-gebied, waardoor veel milieuverontreiniging vanuit het buitenland in ons land terecht-

komt, ook door de intensieve landbouw en veeteelt en de grote bevolkingsdichtheid neemt Nederland een unieke positie in.

In dit advies worden naast de industriële chemicaliën en pesticiden ook enkele in het milieu voorkomende hormonen in beschouwing genomen. Het gaat daarbij om natuurlijke en synthetische oestrogenen uitgescheiden door mens en (landbouwhuis)dieren en om fyto-oestrogenen die na consumptie door landbouwhuisdieren van plantaardig materiaal in het milieu belanden. Fyto-oestrogenen worden door bepaalde planten geproduceerd en kunnen bij dieren als hormoonontregelaars werken.

1.2 Adviesaanvraag en commissie

Op 29 september 1998 vroeg de Minister van VROM de Gezondheidsraad om advies over de stand van de wetenschap ten aanzien van de invloed van hormoonontregelaars op ecosystemen. Bijlage A geeft de volledige tekst van de adviesaanvraag. De Voorzitter van de Gezondheidsraad heeft een daartoe door hem geïnstalleerde commissie — hiera te noemen: de commissie — opgedragen het gevraagde advies op te stellen. De samenstelling van de commissie is vermeld in bijlage B.

1.3 Opzet van dit advies

In hoofdstuk 2 bespreekt de commissie de geslachtshormoonhuishouding van dieren, de mogelijke aangrijpingspunten voor verstoring en de afbakening van het onderwerp. De commissie bewandelt in de hoofdstukken 3, 4 en 5 drie wegen om een beeld te schetsen van de mate van bedreiging van (dieren in) ecosystemen in Nederland. In hoofdstuk 3 inventariseert zij de in Nederland gevonden effecten op dieren. De hoofdstukken 4 en 5 zijn gewijd aan de stoffen en bronnen die debet kunnen zijn aan effecten op dieren. In hoofdstuk 4 classificeert de commissie ruim zeventig verdachte milieuvreemde stoffen naar de mate van hun hormoonontregelende potentie. In hoofdstuk 5 komen de natuurlijke en synthetische hormonen en fyto-oestrogenen aan de orde. Hoofdstuk 6 bevat, ten slotte, de antwoorden op vragen van de minister.

De geslachtshormoonhuishouding van gewervelde dieren

De commissie bespreekt in dit hoofdstuk de geslachtshormoonhuishouding van gewervelde dieren (zoogdieren, vogels, reptielen, amfibieën en vissen). Zij gaat ook nader in op het schildklierhormoonsysteem gezien de belangrijke invloed daarvan op zowel de embryonale ontwikkeling als de voortplanting. Na een bespreking van mogelijke aangrijpingspunten voor ontregeling van de hormoonhuishouding door stoffen, geeft zij een afbakening van het type effecten die stoffen veroorzaken.

In dit hoofdstuk komen de ongewervelde dieren niet ter sprake. De reden hiervoor is dat voor de meeste ongewervelden — behalve voor de geleedpotigen — weinig bekend is over de geslachtshormoonhuishouding. Ook zijn er nauwelijks gegevens over de ontregeling door stoffen van de geslachtshormoonhuishouding. Bovendien wijken de (steroïd)hormoonsystemen van ongewervelden in een aantal gevallen sterk af van die van gewervelde dieren. De commissie wil echter geenszins het belang van ongewervelden bagatelliseren: 95 procent van de diersoorten in ecosystemen behoort immers tot de ongewervelden.

2.1 Wat is een hormoon?

Hormonen zijn signaalstoffen, zowel in planten als in dieren, die door hun werking essentiële levensfuncties zoals ontwikkeling, groei, voortplanting, gedrag, afweer en energiehuishouding regelen. Zij zorgen ervoor dat moleculen, cellen, weefsels en organen binnen een organisme in onderlinge samenhang functioneren met betrekking tot de interne processen maar ook in interactie met de omgeving. Een goed functionerend hormonaal

systeem is van levensbelang, in eerste instantie voor het individu maar ook een populatie is er uiteindelijk van afhankelijk.

De klassieke opvatting is dat hormonen geproduceerd worden door hormoonklieren. De zojuist gegeven brede definitie van hormonen omvat echter ook signaalstoffen als cytokines, groeihormonen, neuropeptides en dergelijke. Het wordt steeds duidelijker dat signaalstoffen vanuit allerlei weefsels en organen beschikbaar komen. Naast de hormonen afkomstig van bijvoorbeeld de schildklier en de pancreas, zijn ook de door het hart, de longen of de hersenen geproduceerde signaalstoffen van essentieel belang. Hormonen worden aan de bloedbaan en de intercellulaire vloeistof afgegeven: secretie naar binnen dus, en niet naar buiten zoals dat bijvoorbeeld geldt voor onder meer melk, zweet of speeksel. We spreken dan ook van inwendige of endocriene secretie (in tegenstelling tot exocriene secretie). Het orgaanstelsel en de bijbehorende producten vormen het endocriene stelsel.

Hormonen zijn in de bloedbaan aanwezig als vrije moleculen, of, en dat geldt voor het merendeel, gebonden aan transporteiwitten. Via de bloedbaan bereiken hormonen alle levende cellen, maar niet al die cellen reageren op een bepaald hormoon. Dat doen alleen de zogeheten doelwitcellen. Dat zijn cellen die specifieke stoffen bevatten, de receptoreiwitten, die in staat zijn bepaalde hormonen te binden en de cel binnen te sluizen zodat ze daar hun werking kunnen uitoefenen. De wijze waarop die werking wordt uitgeoefend verschilt per celsoort en per type hormoon. Geslachtshormonen, maar ook schildklierhormoon en retinoïden of vitamine A binden bijvoorbeeld aan receptoren die zich in de celkern bevinden. Het hormoon-receptorcomplex bindt in de kern aan een specifieke plaats op het DNA, het zogeheten *hormone responsive element* of HRE, waarna overschrijving (transcriptie) van een of meer genen naar boodschapper RNA plaats vindt. RNA bevat daardoor de code die vervolgens vertaald wordt (translatie) naar specifieke eiwitten waarmee de cel een gerichte functie kan uitoefenen.

2.2 Geslachtshormonen: classificatie en synthese

De geslachtshormonen worden doorgaans ingedeeld in een drietal functionele groepen: oestrogenen, androgenen en progestagenen.

De belangrijkste vertegenwoordiger van de oestrogenen is het 17β -oestradiol. Daarnaast kennen we de minder potente oestrogenen zoals oestron en oestriol. Oestrogenen worden, algemeen gesproken, gevormd in het ovarium door cellen die rond de rijpende eicellen gelegen zijn (de thecacellen en de granulosa-cellen).

Van de progestagenen is bij zoogdieren progesteron het belangrijkste. Bij lagere ongewervelden spelen daarvan afgeleide vormen, zoals het dihydro- of trihydroprogesteron een belangrijke rol. Progestagenen danken hun naam aan een belangrijke functie bij zoogdieren, te weten het handhaven van de zwangerschap. Ze worden bij zoogdieren ge-

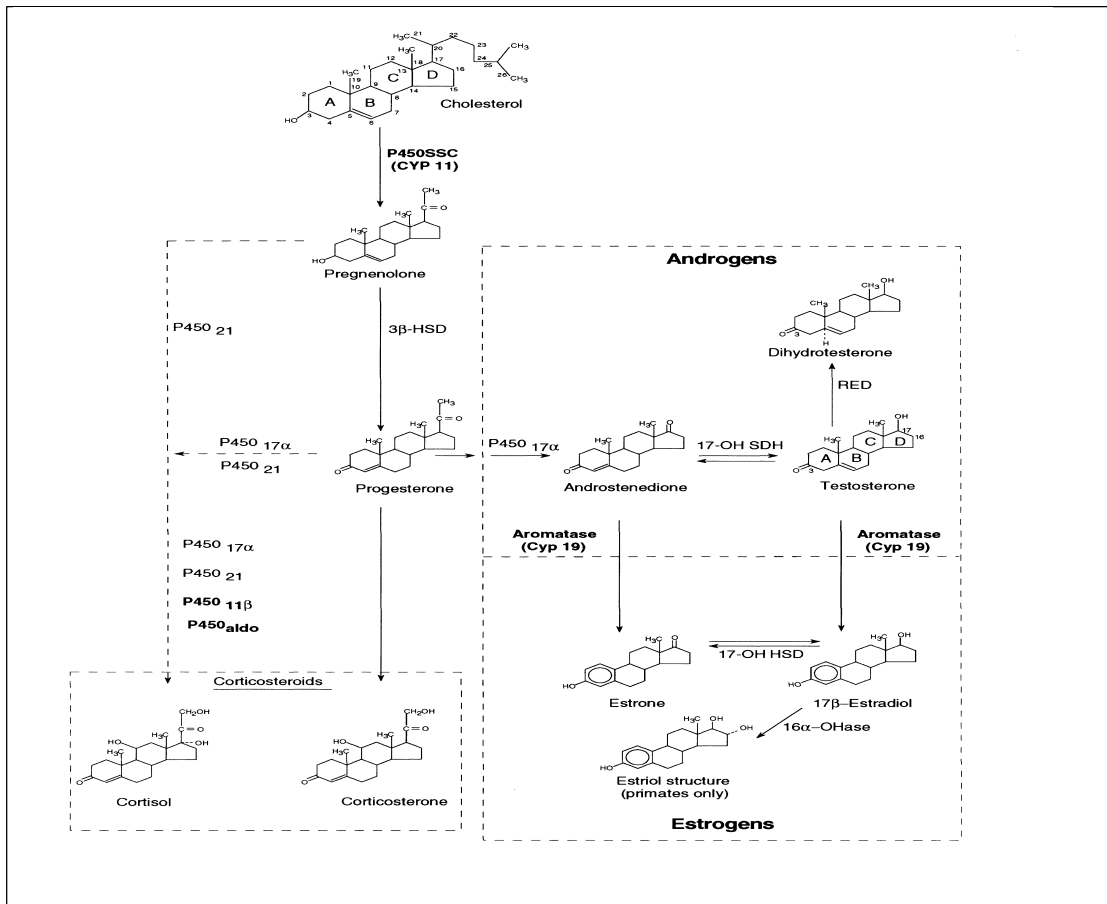
maakt in het gele lichaam of *corpus luteum*, een kliertje dat ontstaat uit de cellen rond de rijpende eicel wanneer deze na de eisprong het ovarium heeft verlaten.

Bij de androgenen of mannelijke geslachtshormonen zijn testosteron en het daarvan afgeleide product dihydrotestosteron de belangrijkste vormen. Minder potente androgenen zijn het androsteendion en het dihydro-epiandrosteron. Bij vissen, maar ook bij andere lagere vertebraten, is vaak een geoxideerde variant, het 11-ketotestosteron het meest werkzame androgeen. Androgenen worden gemaakt door de zogeheten cellen van Leydig in de testis, maar ook in de bijnier.

Geslachtshormonen behoren tot de groep van de steroïden. De biosynthese van alle geslachtshormonen vindt plaats vanuit een gemeenschappelijke basisstof, het cholesterol. Cholesterol wordt met het voedsel opgenomen, maar kan ook door de lever worden gesynthetiseerd. Het wordt, ingesloten door bepaalde lipoproteïnes, door het bloed vervoerd en via speciale receptoren opgenomen door onder meer de cellen die er geslachtshormonen uit maken. Die cellen liggen in de geslachtsklieren, de ovaria en de testis, en de bijnier. De ovaria synthetiseren voornamelijk de oestrogenen en progestagenen, de testis de androgenen. De synthese van geslachtshormonen uit cholesterol bestaat uit een serie subtiele enzymatische omzettingen. Al deze omzettingen laten het steroïdskelet intact, maar de groepen op de hoekpunten van het skelet ondergaan veranderingen. Methylgroepen kunnen worden afgekoppeld, -OH-groepen omgezet tot =O-groepen en omgekeerd. Hierdoor ontstaan een groot aantal sterk op elkaar lijkende producten, waarvan echter slechts een beperkt aantal hormonaal actief is. Figuur 1 is een sterk vereenvoudigd schema van de steroïdsynthese. Daarin zijn de syntheseroutes aangegeven, die leiden tot de drie types van geslachtshormonen, alsook enkele belangrijke enzymen (de zogeheten P450-enzymen) die de verschillende stappen katalyseren.

Of een weefsel uit cholesterol androgenen, oestrogenen dan wel progestagenen maakt, hangt af van welke enzymen in het betreffende weefsel tot expressie komen. Dat hoeven niet altijd dezelfde te zijn. Zo produceren de granulosa-cellen rond de rijpende eicel in het ovarium vóór de ovulatie oestradiol, maar daarna progesteron. Dat komt omdat ze dan de enzymen die nodig zijn om de syntheseroute van progesteron naar oestradiol te doorlopen niet langer tot expressie brengen.

Geslachtshormonen kunnen buiten de plaats van oorsprong belangrijke omzettingen ondergaan waardoor hormonaal actieve verbindingen ontstaan of juist inactivatie optreedt. Zo is de omzetting van testosteron naar dihydrotestosteron een voorwaarde voor de effecten van het androgeen op de ontwikkeling van de uitwendige mannelijke geslachtsorganen (penis en scrotum) en van de secundaire geslachtskenmerken zoals baardgroei.



Figuur 1 Sterk vereenvoudigd schema van de steroidhormoonsyntheseroutes en de daarbij betrokken enzymen.

Bij vissen is aangetoond dat de testes het 11-hydroxyandrosteneendion maken, dat op zichzelf slechts een zwak androgene werking heeft. Het wordt echter in de lever omgezet tot 11-ketotestosteron, het belangrijkste vissenandrogeen. Een zeer belangrijke omzetting is die van testosteron naar oestradiol, die bijvoorbeeld optreedt in de hersenen. Vrijwel alle effecten van testosteron op de vrouwelijke ontwikkeling van de hersenen en dus ook vrouwelijk seksueel gedrag komen tot stand onder invloed van het vrouwelijke hormoon oestradiol, gevormd uit testosteron. De termen mannelijk en vrouwelijk hormoon worden daarmee erg relatief. Waarschijnlijk vinden dergelijke omzettingen in een groot aantal weefsels plaats en worden daardoor producten gevormd die lokale of systemische hormonale effecten teweegbrengen. Zo zijn steroid-omzettingen aangetoond in longen, lever, vet, baarmoeder, vagina, aorta, botweefsel, huid en bloed. De fysiologische betekenis ervan is nog veelal onbekend.

Steroïden zijn hydrofobe stoffen en kunnen daardoor moeilijk door de nieren worden uitgescheiden. Daarom worden ze geconjugeerd tot fosfaten, sulfaten of glucuroniden; deze verbindingen kunnen de nieren wel passeren. Het wordt meer en meer duidelijk dat conjugatie niet alleen in de lever maar in allerlei weefsels plaatsvindt en daar tot producten leidt die niet altijd als geïnactiveerde stoffen beschouwd moeten worden maar wel als andere vormen van werkzame steroïden die intercellulaire migratie in een waterig milieu mogelijk maken. Van vissen is bovendien bekend dat ze steroïdconjugaten in het water uitscheiden die als geurstoffen (feromonen) dienen en zo communicatie met soortgenoten mogelijk maken. Die communicatie kan gaan over territoriumkwesties, maar ook over voortplantingsgedrag.

2.3 Functies van geslachtshormonen

Geslachtshormonen spelen een rol bij alle aan de voortplanting gerelateerde ontwikkelingen en processen. Het zou te ver voeren alle bekende functies van de geslachtshormonen hier te behandelen, maar de functies die algemeen gelden voor alle gewervelde dieren kunnen wel globaal worden aangegeven.

Na de bevruchting zijn de geslachtshormonen bepalend voor het tot expressie komen van het geslacht van de vrucht (de geslachtsdifferentiatie). Dat wil zeggen het tot ontwikkeling komen van de mannelijke in- en uitwendige geslachtsorganen en de differentiatie van de hersenen in de mannelijke richting; de ontwikkeling in vrouwelijke richting is bij zoogdieren de 'default'; zij komt tot stand bij de afwezigheid van mannelijk hormonen. Daarmee wordt de basis gelegd voor de latere geslachtsdimorfie, niet alleen in de uitwendige anatomie, secundaire geslachtskenmerken zoals beharing en vocalisatie, maar ook in het voortplantingsgedrag en de cycliciteit van de voortplanting. Geslachtshormonen zijn vervolgens essentieel voor de puberteitsontwikkeling, de rijping van eicellen en de vorming van vitale zaadcellen, partnerherkenning, geslachtsdrift en baltsgedrag, synchronisatie tussen partners en timing van de voortplanting en het functioneren van de voortplantingsorganen in brede zin. Bij zoogdieren spelen geslachtshormonen ook een rol bij de initiatie en handhaving van de zwangerschap, het verhinderen van de immunologische afstoting van de vrucht, de geboorte en de ontwikkeling van de melkklieren. Bij niet-zoogdieren, waarbij het embryo zich buiten het moederlichaam moet ontwikkelen en daarvoor reservevoedsel in de vorm van dooierewitten nodig heeft, zorgt oestradiol ervoor dat de lever dit eiwit (vitellogenine) maakt, dat vervolgens als dooier in de eicel wordt ingebouwd. Zoals eerder opgemerkt, vormen ook de bijnieren geslachtshormonen, met name androgenen. Het gaat hier vooral om het zwakke androgeen androsteendion, dat perifeer omgezet kan worden tot het eveneens zwakke oestrogene hormoon oestron. De functies zijn niet goed bekend. Algemeen wordt aangenomen dat bijnier-androgenen zowel bij mannen als vrouwen een rol spelen bij de vroege puberteitsontwikkeling.

Naast een functie bij de voortplanting hebben geslachtshormonen ook metabole functies. Zo is testosteron bij de mens verantwoordelijk voor de pre-puberale groeisput. Meer algemeen gesteld is het een eiwitanabool hormoon, hetgeen de zwaardere spier- en skeletmassa van de meeste mannen t.o.v. vrouwen verklaard. Oestrogenen hebben daarnaast een effect op de ontwikkeling van bindweefsel en onderhuids vet. Voor bepaalde weefsels zijn oestrogenen en androgenen bovendien mitogeen: ze bevorderen celdeling. Onder normale condities is dat functioneel, bijvoorbeeld voor de groei van het baarmoederslijmvlies tijdens de eerste fase van de menstruele cyclus, of voor de groei van melkklieren tegen het einde van de zwangerschap.

De meeste van de zojuist aangeduide processen zijn niet continue maar vinden cyclisch plaats (menstruele cyclus, seizoensbepaalde voortplanting). Maar ook processen die per individu slechts eenmaal voorkomen, zoals puberteit en menopauze, worden bepaald door geslachtshormonen. Dat betekent een eigen dynamiek voor hormoonproductie, circulerende hoeveelheden hormoon, hormoonafbraak en uitscheiding, die aan nauwkeurige regelsystemen onderworpen moeten zijn willen alle voortplantingsprocessen in de juiste volgorde en in overeenstemming met de interne en externe omstandigheden van het individu plaatsvinden. Het betekent eveneens dat voortdurende blootstelling aan hormoonactieve stoffen, wanneer bepaalde drempelwaarden overschreden worden, vrijwel altijd verstorend zal werken op processen die gestuurd worden door geslachtshormonen.

2.4 Regulering van de geslachtshormoonproductie

Hoewel de testes en de ovaria tot een zekere mate van autonome, basale secretie van geslachtshormonen in staat zijn, worden de fluctuaties in hun activiteit in belangrijke mate bepaald door de hypofyse. Daar worden de gonadotrope hormonen FSH en LH (respectievelijk het follikelstimulerend hormoon en het luteïniserend hormoon) gevormd. Deze twee hormonen reguleren de dubbele functie van de geslachtsorganen: de productie van geslachtscellen en van geslachtshormonen. Zeer in het algemeen, maar er zijn veel nuances mogelijk als naar verschillende diersoorten gekeken wordt, geldt dat de hoofd-functie van het FSH het bevorderen van de vorming van geslachtscellen is en die van LH de vorming van geslachtshormonen. Voor de mens, bijvoorbeeld, gaat dit maar ten dele op; vóór de ovulatie zorgt het FSH samen met LH voor de synthese van oestradiol.

De secretie van LH en FSH wordt gereguleerd door zowel de hersenen als de geslachtshormonen; daarnaast die van het FSH nog door een tweetal andere eiwitachtige hormonen uit de gonaden, het activine en het inhibine. De hersenen produceren neurohormonen, waaronder het *gonadotropin releasing hormone* (GnRH). Dat is een klein peptide, dat via een speciale bloedvatverbinding vanuit de hypothalamus de hypofyse bereikt en daar de FSH- en LH-afgifte (en bij een aantal diersoorten en de mens ook de synthe-

se) stimuleert. Naast het GnRH zijn inmiddels tal van andere neurohormonen gevonden die direct of indirect van invloed zijn op dit proces, waaronder dopamine, taurine, glutaminezuur, GABA, melatonine en neuropeptide Y.

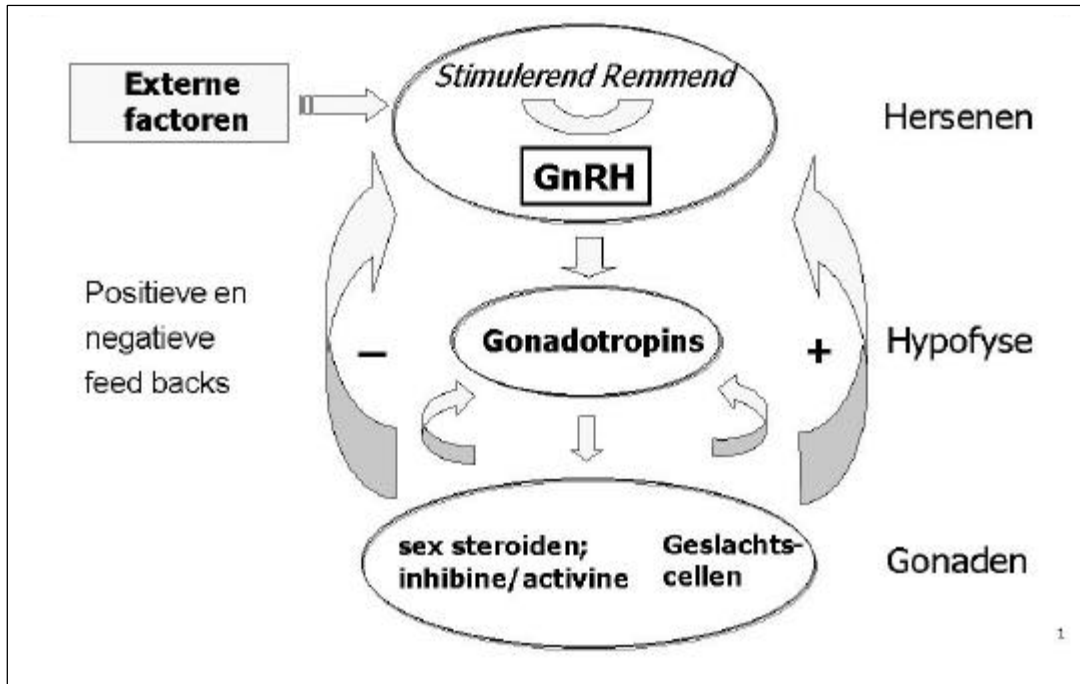
Ook de geslachtshormonen hebben, zoals gezegd, op hun beurt effect op de productie van FSH en LH. Afhankelijk van het type geslachtshormoon en van de situatie (bijvoorbeeld het stadium van de menstruele cyclus) kan deze *feedback* positief of negatief zijn, waarbij ook nog weer onderscheid gemaakt moet worden tussen effecten op de synthese en die op de afgifte. Deze terugkoppeling maakt het, bijvoorbeeld, mogelijk dat tijdens de menstruele cyclus oestradiol aanvankelijk de synthese van LH stimuleert, maar de afgifte remt; via een stimulatie van het GnRH echter leidt een stijgend oestradiolniveau tot een plotselinge afgifte van LH, hetgeen aanleiding is tot de ovulatie. Dezelfde cellen die aanvankelijk het oestradiol vormden, produceren na de ovulatie, als ze tot *corpus luteum* zijn geworden, het progesteron, dat weer een negatieve *feedback* op het hypothalamus-hypofysesysteem uitoefent en zodoende de secretie van GnRH remt met als gevolg minder FSH-afgifte. Pas als aan het einde van de menstruele cyclus het corpus luteum ten gronde gaat en geen progesteron meer produceert, wordt weer FSH afgegeven en begint een nieuwe cyclus.

Van alle geslachtshormonen is oestradiol het meest effectief in dit hierboven bedoelde *feedback*-systeem. Het beïnvloedt, direct maar ook via de activiteit van neurohormonen, zowel de genexpressie van LH en FSH als hun afgifte. Dat geldt voor vrouwelijke én mannelijke individuen. Het testosteron uit de testis wordt in de hersenen en de hypofyse in oestradiol omgezet en heeft dan dezelfde werking.

Het totale systeem dat de voortplanting reguleert, wordt aangeduid als de hersen-hypofyse-gonaden-as. Omdat zowel het zenuwstelsel als het hormonale stelsel erbij betrokken is, spreekt men van een neuro-hormonaal systeem. Door de betrokkenheid van het zenuwstelsel is het voor het organisme mogelijk te reageren op stimuli van buitenaf. Bij veel diersoorten zien we bijvoorbeeld een seizoensafhankelijke voortplanting: het dier is dan in veel gevallen in staat om de daglengte als ‘kalender’ te gebruiken. De lichtprikkel bereikt via de ogen de hersenen en wordt daar in contact gebracht met het hormonale systeem. Figuur 2 is een sterk vereenvoudigde weergave van het hersen-hypofyse-gonaden-as.

2.5 **Wisselwerking tussen de geslachtshormoonhuishouding en andere hormoonsystemen.**

Naast de geslachtshormonen zijn nog diverse andere hormonen en groeifactoren van belang bij de voortplantingsfysiologie, de aanleg en ontwikkeling van gonaden en het gedrag. Daarnaast zijn er sturende en regulerende invloeden van het zenuwstelsel op het



Figuur 2 Schematische weergave van de hersen-hypofyse-gonaden-as.

voortplantingssysteem. Sensorische prikkelingen (o.a. daglicht) kunnen via bepaalde neurale netwerken de afgifte van specifieke neurotransmitters (dopamine, GABA, glutaminezuur) stimuleren, die vervolgens de afgifte van GnRH door de hypothalamus en daardoor de hypofyse-gonaden-as stimuleren (zie 2.4).

Van de hormoonsystemen heeft vooral het schildklierhormoonsysteem een belangrijke invloed op de groei in het algemeen en op de aanleg en ontwikkeling van bepaalde organen, zoals de hersenen en gonaden, alsmede op processen, zoals metamorfose bij amfibieën. Bij zoogdieren is er een invloed van de schildklierhormoonstatus op de ontwikkeling van de testes (vergroete testes bij een relatief tekort aan schildklierhormoon en vice versa). Bij kikkers vindt pas inductie van vitellogenine plaats door oestradiol als eerst een bepaalde hoeveelheid schildklierhormoon is gedoseerd. Bij vissen spelen schildklierhormonen naar alle waarschijnlijkheid een rol bij de rijping van de eicellen.

Behalve voor de voortplanting is het schildklierhormoon vooral van belang voor een normale ontwikkeling van de hersenen en de hersenfuncties, zoals motoriek en cognitie. Een tekort aan schildklierhormoon tijdens het foetale stadium van ontwikkeling bij zoogdieren kan leiden tot een ernstige vorm van onderontwikkeling van het brein (cretinisme bij de mens), geassocieerd met duidelijk waarneembare stoornissen in de ontwikkeling van motorische en cognitieve functies.

Het schildklierhormoonsysteem kent een organisatie en regulatie die vrij goed overeenkomt met die van de geslachtshormoonhuishouding. Er is een hersen-hypofyse-schild-

klier-as aanwezig, die stimulatie en regulatie van de thyroxine(T4)- en triiodothyronine(T3)-productie door de schildklier verzorgt. De door de schildklier geproduceerde hormonen worden aan de bloedbaan afgegeven en voornamelijk in gebonden vorm (aan transporteiwitten) vervoerd naar de doelcellen, alwaar het vrije schildklierhormoon (T4) wordt opgenomen en intracellulair geactiveerd tot T3. T3 bindt vervolgens aan specifieke thyroidhormoonreceptoren die na complexatie met zogeheten thyroid-responsieve elementen (TREs) op het DNA tot verhoging leiden van de transcriptie van bepaalde (thyroidresponsieve) genen en tot de productie van eiwitten die betrokken zijn bij het uitoefenen van de functies van het schildklierhormoon.

2.6 Verstoring van de geslachtshormoonhuishouding

Aangrijpingspunten

De voorgaande bespreking van de geslachtshormoonhuishouding is verre van volledig. Het moge echter duidelijk zijn dat het om een zeer gecompliceerd systeem gaat, waarbinnen vele hormonen interageren om alle facetten van de voortplanting mogelijk te maken. Juist door de hoge mate van complexiteit van hormoonsystemen is er een groot aantal aangrijpingspunten voor verstoring. Hormoonontregelaars kunnen bovendien op verschillende plaatsen tegelijkertijd aangrijpen. De aangrijpingspunten zijn als volgt in te delen;

- De stof bindt aan een geslachtshormoonreceptor en gedraagt zich als een geslachtshormoon (hormoonmimicry), doordat na binding ook activatie van de receptor plaatsvindt.
- De stof bindt aan de geslachtshormoonreceptor maar er vindt geen activatie plaats. De bezetting van de receptor van zo'n stof leidt ertoe dat het echte hormoon niet meer daaraan kan binden. De stof werkt dan als hormoon-antagonist (competitieve inhibitie). In dit verband is nog een ander type werking te noemen namelijk binding van stoffen op die delen van het DNA waar zich de *responsive elements* van de geslachtshormonen bevinden.
- De stof grijpt aan op het metabolisme, het transport en de uitscheiding van het geslachtshormoon, inbegrepen alle eiwitten en enzymen die daarbij betrokken zijn.

In paragraaf 1.1 zijn een aantal groepen stoffen genoemd die kunnen leiden tot hormoonontregeling. In algemene zin is over de aangrijpingspunten en werking van deze stoffen het volgende op te merken. De meeste kennis over hormoonontregelaars uit veld- en laboratoriumonderzoek heeft betrekking op de binding aan de oestrogenreceptor of op oestrogene of anti-oestrogene effecten. Het is echter niet uit te sluiten dat, en eerste onderzoeksresultaten wijzen daarop, hormonaal-actieve stoffen in het milieu ook onbedoelde

androgene, progestagene of thyroidogene effecten kunnen hebben omdat ze aan de betreffende receptoren binden. Van sommige milieuvreemde stoffen is ook bekend dat zij aangrijpen op de enzymen die verantwoordelijk zijn voor de omzetting van de geslachtshormonen.

Blootstelling aan natuurlijke en synthetische oestrogenen zal leiden tot ontregeling van de geslachtshormoonhuishouding door binding aan de oestrogeenreceptoren en vervolgens activatie van het DNA. Oestradiol is bij alle gewervelde dieren het meest potente oestrogene hormoon. Doordat de hormoonbindingspecificiteit van oestrogeenreceptoren van alle gewervelde dieren nagenoeg gelijk is, leidt blootstelling aan lage concentraties oestradiol (of aan synthetische oestrogenen) tot ontregeling bij de meest uiteenlopende diersoorten.

Tal van milieuvreemde stoffen en fyto-oestrogenen zijn eveneens in staat om te binden aan oestrogeenreceptoren, waardoor ze zowel hormoonmimicry als antagonisme kunnen vertonen. Deze stoffen worden aangeduid als pseudo-oestrogenen of xeno-oestrogenen. Hoewel de meeste ervan zwak oestrogeen zijn — dat wil zeggen een relatief lage affiniteit voor oestrogeenreceptoren hebben — kunnen zij door hun voortdurende aanwezigheid in vaak hoge concentraties toch de oestrogeenhuishouding ontregelen. Bovendien zijn veel van de hier bedoelde milieuvreemde stoffen vaak hydrofoob, waardoor bio-accumulatie bevorderd wordt en concentraties in bijvoorbeeld vissen gevonden worden die ordes van grootte hoger zijn dan de omgevingswaarden.

Experimenteel is vastgesteld dat blootstelling aan zwak-oestrogene stoffen, die op zichzelf weinig effect hebben, kan leiden tot extra aanmaak van oestrogene receptoren. Dit zal de respons op blootstelling aan hormoonontregelaars, of aan endogene hormonen versterken (synergisme). Voor verschillende milieuvreemde stoffen is wel additiviteit van de effecten gevonden, maar geen synergisme. Er zijn aanwijzingen bij vissen dat blootstelling aan oestron leidt tot een versterkte respons op blootstelling aan oestradiol (Boh82).

Ontregeling van de schildklierhormoonhuishouding

Er zijn veel stoffen bekend, zowel milieuvreemde als natuurlijke verbindingen, die kunnen interfereren met de schildklierhormoon-huishouding. In tegenstelling tot hetgeen geldt voor bijvoorbeeld stoffen die werken als oestrogenen, vindt de grootste beïnvloeding van het schildklierhormoonstelsel plaats op het niveau van het metabolisme en nauwelijks op het niveau van directe receptor-interactie.

2.7 Afbakening

Voor de schatting van risico's van stoffen met een hormoonontregelende werking richt de commissie zich op effecten op de voortplanting. Verstoring van de voortplanting heeft immers potentieel een grote invloed op populaties en daarmee op het ecosysteem. De commissie neemt daarbij alle geslachtshormoongemedieerde effecten in beschouwing, dat wil zeggen werkingen als gevolg van geslachtshormoonmimicry en antagonisme als gevolg van receptorbinding, en beïnvloeding van de hormoonhuishouding als gevolg van interferentie met geslachtshormoon synthese, -transport, -afbraak en -uitscheiding. Daarnaast beschouwt zij de effecten die tot stand komen door interactie met het schildklierhormoonsysteem. Het kiezen van de effecten op de voortplanting als uitgangspunt houdt in dat pas sprake is van een 'ontregelaar' als de stof in kwestie ook daadwerkelijk de voortplantingsfysiologie (of het voortplantingsgedrag) verstoort bij individuen of hun nakomelingen. Een verandering van een hormoonspiegel die binnen de grenzen van de normale homeostase valt, en dus niet leidt tot een fysiologische respons (ontregeling), merkt de commissie niet aan als een ontregeling.

Gedocumenteerde effecten

In dit hoofdstuk inventariseert de commissie het in Nederland verrichte veldonderzoek waarin effecten van hormoonontregelende stoffen op (populaties van) dieren zijn gevonden. Daarnaast geeft zij een kort overzicht van het in het buitenland uitgevoerde onderzoek aan verwante diersoorten. Gezien de beperkte schaal waarop onderzoek is verricht en de methodologische problemen die dergelijk onderzoek met zich meebrengt, is het de vraag in hoeverre deze inventarisatie inzicht geeft in de volle omvang van de gevolgen van blootstelling aan deze stoffen. Bovendien zijn de gevolgen van effecten van stoffen op populaties — zo die al bekend zijn — voor levensgemeenschappen en ecosystemen* als geheel onbekend.

Het veldonderzoek dat zoals gezegd op beperkte schaal is verricht, vond meestal plaats naar aanleiding van (toevallige) observaties dat er iets aan de hand is bij een populatie. De doelstelling ervan was meestal niet gelegen in de opsporing van geslachtshormoonontregelende stoffen. De meeste onderzoeken hebben bovendien betrekking op dieren in aquatische ecosystemen; over de gevolgen van deze stoffen voor op het land levende dieren is veel minder bekend.

Methodologisch gezien is het zeer moeilijk om in veldonderzoek een causaal verband aan te tonen. Het zijn namelijk niet alleen stoffen die effecten op de voortplanting kunnen hebben. Veranderingen in omgevingsfactoren, zoals voedselaanbod, verstoringdruk, ha-

* Een ecosysteem is een geïntegreerde en een voornamelijk zichzelf in stand houdende structuur van een uit meerdere soorten bestaande gemeenschap van organismen binnen een bepaalde fysiek begrensde omgeving, functionerend in energiestromen en stofkringlopen (Ver95).

bitatversnippering en destructie, kunnen eveneens een essentiële rol spelen. Voor de bewijskracht is het dus nodig om effecten die zijn waargenomen in het veld multifactorieel te interpreteren.

Zowel kennis van de werking van een stof zelf als het waarnemen van een hormoonontregelend effect bij (een populatie van) dieren kan in de praktijk als vertrekpunt dienen voor een veldonderzoek. In het eerste geval geeft laboratoriumonderzoek — waaruit blijkt dat een stof een bepaald effect bij bepaalde dieren zou kunnen veroorzaken — aanleiding tot het doen van veldonderzoek. Zo zou bijvoorbeeld de notie dat een veel voorkomende stof de vitellogenine-productie bij mannetjesvissen* induceert, aanleiding geven tot veldonderzoek op die plaatsen waar deze stof in hoge concentraties in het milieu voorkomt. In het tweede geval gaat het om (eco)epidemiologisch onderzoek waarin wordt nagegaan of er effecten op een populatie optreden. Onderzocht kan, bijvoorbeeld, worden of er storingen zijn in hormoonconcentraties bij dieren, of er evidente afwijkingen in de reproductie optreden en of pathologische afwijkingen zijn gekoppeld aan ontregeling van de hormoonhuishouding. Vervolgens is aan de orde wat de oorzaak is van het gevonden effect. Op populatieniveau zijn er echter — zoals gezegd — vele (natuurlijke en antropogene) omstandigheden die aan het effect kunnen bijdragen. Het is vaak niet mogelijk is om deze te ontrafelen.

Zijn effecten op populaties wel aan te tonen dan is de vraag wat de gevolgen daarvan zijn voor andere populaties en vervolgens voor het betreffende ecosysteem. Een mogelijk bruikbare benadering schuilt in het voedselwebben-concept. Hierin zijn de voedselrelaties tussen soorten beschreven; wie eet wat en door welke soort wordt een andere soort gegeten. Het voedselweb maakt inzichtelijk wat de mogelijke consequenties zijn van aantasting van een soort voor andere soorten. Het uiteindelijke doel van de voedselwebbenbenadering is om het dynamisch gedrag van een levensgemeenschap en de daaraan gekoppelde energiestromen en stofkringlopen te kwantificeren (GR97). Daaruit kunnen de gevolgen van de aantasting van populaties op ecosystemen worden afgeleid. Een dergelijke benadering voor het schatten van risico's voor levensgemeenschappen en voor gehele ecosystemen staat echter nog in de kinderschoenen.

* Het dooierbestanddeel vitellogenine wordt normaal alleen door vrouwtjes geproduceerd. Mannetjes vissen kunnen wel vitellogenine produceren, echter in slechts kleine hoeveelheden. Een hoge productie bij mannetjes wijst op blootstelling aan stoffen met een oestrogene werking (zie ook 2.3).

3.1 Effecten bij vogels en (zee)zoogdieren

3.1.1 (Zee)zoogdieren

Zeehonden in Nederland

In de jaren zeventig liep de zeehondenpopulatie in de Waddenzee sterk terug als gevolg van een verminderd reproductiesucces. De concentraties van PCB's in weefsel van zeehonden afkomstig uit de Nederlandse Waddenzee bleken zeven tot tien keer zo hoog te zijn als die in weefsel van zeehonden uit de Duits/Deense Waddenzee, waar de reproductie normaal was (Reij80). Bij onderzoek aan twee groepen gewone zeehonden gevoerd met respectievelijk relatief gecontamineerde vis uit het Nederlandse deel van de Waddenzee en relatief schone vis uit de Atlantische Oceaan zijn lagere gehalten aan 17β -oestradiol gevonden in de groep met de hoogste PCB-opname, namelijk de dieren die vis kregen afkomstig uit de Waddenzee (Boo87, Reij86, Reij96b). Dit verschil kwam alleen tot uitdrukking rond de implantatieperiode bij vrouwelijke dieren. Ook zijn verlaagde concentraties van schildklierhormonen gevonden. Die verlaging wordt toegeschreven aan een competitie tussen die hormonen en hydroxy-PCB-metabolieten bij de binding aan een transporteiwit (Bro89). Het verschil in gehalte in het bloed van zeehonden gevoerd met vis afkomstig uit het schone referentiegebied en uit de Waddenzee bedroeg een factor vijf voor de PCB's en een factor twee voor 4,4'-DDE (Boo87). Zeehonden uit de hoogst belaste groep die vervolgens werden gevoerd met schone vis, bleken binnen twee jaar weer terug te zijn op hun oude reproductieniveau. Uit onderzoek naar de doorgifte van PCB's en PCB-methylsulfonylmetabolieten* van moederdier naar pup blijkt voorts dat stabiele metabolieten onbelemmerd worden doorgegeven met de moedermelk (Gre96, Gre97). Bij de ongemetaboliseerde PCB's is de doorgifte selectief, namelijk minder bij de meer hydrofobe PCB's. Verlaging van schildklierhormoonconcentraties bij zeehonden kan gevolgen hebben voor de vroege ontwikkeling en het latere reproductievermogen. Blijkens laboratorium onderzoek met zoogdieren kunnen PCB's eveneens het paargedrag beïnvloeden (Pet93). Er zijn hierover echter onvoldoende gegevens uit veldonderzoek.

Opgemerkt zij dat het functioneren van het immuunsysteem wordt beïnvloed door onder andere oestrogenen en androgenen. Ontregeling van de hormoonbalans zou dus kunnen leiden tot verstoringen van dat systeem. Dit is vooral van belang voor de maternale afstotingsrespons van de bevruchte eicel, die wordt onderdrukt door een juiste balans tussen 17β -oestradiol en progesteron. De problemen rond de implantatie van de bevruchte eicel bij zeehonden zouden hier mee kunnen samenhangen, maar verder onder-

* Na oxydatie van PCB's door het cytochroom P450-systeem, kunnen ofwel stabiele hydroxy-PCB's ontstaan, ofwel is na conjugatie ook de vorming van methylsulfonylmetabolieten mogelijk .

zoek is nodig om dit te bevestigen. Tussen eind zeventig en eind tachtig zijn de PCB-gehalten in zeehonden in Nederland gedaald met ca 50%. De reproductie is nu weer bijna terug op een normaal niveau (Reij97).

Zeezoogdieren in het buitenland

In weefsel van vele soorten zeezoogdieren zijn ettelijke milieuvreemde stoffen met hormoonontregelende eigenschappen aangetroffen (Agu95, Boe98, Reij96a, Wag84). Blijkens sommige onderzoeken zijn afwijkingen in de reproductie of hormoonregulatie gerelateerd aan bepaalde chloorkoolwaterstoffen en hun metaboliëten, onder meer in ringelrobber (*Phoca hispida botnica*) en grijze zeehonden (*Halichoerus grypus*) in de Oostzee (Ber85, Hel80), Californische zeeleeuwen (*Zalophus californianus*) (DeL73), en beluga's (*Delphinapterus leucas*) (Bél87). Als belangrijkste ontregelaars worden meestal PCB's, DDT en de bijbehorende metaboliëten genoemd.

In bepaalde bruinvissen (*Phocoenoides dalli*) is een negatieve correlatie gevonden tussen het testosterongehalte en concentraties van PCB's en metaboliëten van DDT (DDE) (Sub87).

In de Oostzee is bij 30% van de onderzochte volwassen vrouwelijke grijze zeehonden en bij 70% van de volwassen vrouwelijke ringelrobber gedeeltelijke of gehele onvruchtbaarheid geconstateerd (Ber85). De onvruchtbaarheid werd toegeschreven aan een blokkering van de eileiders. Uit vervolgonderzoek zijn aanwijzingen verkregen dat hier vooral de methylsulfon-metaboliëten van DDE (een metaboliëte van DDT) en PCB's de verantwoordelijke toxische stoffen kunnen zijn (Ols94).

Beluga's in Canada staan bloot aan hoge milieuconcentraties van onder andere PCB's, DDT en polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) (Bél87). Van 94 onderzochte mannelijke beluga's bleek er één een hermafrodiëte te zijn: naast duidelijke uitwendige mannelijke kenmerken zag men een uterus en kleine ovaria (DeG94). Deze afwijking wordt toegeschreven aan een door PCB's of DDT veroorzaakte hormonale storing vroeg in de dracht waardoor normale intra-uteriene differentiatie van mannelijke en vrouwelijke organen ontregeld raakt. Toekomstig onderzoek zal de werkelijke frequentie van het voorkomen hiervan bij de beluga-populatie aan het licht kunnen brengen.

Otters

Er is een relatie gelegd tussen de achteruitgang van het aantal otters (*Lutra lutra*) in de geïndustrialiseerde landen en de toename van de PCB-belasting in het milieu (Kih92, Leo97, Mas89, Ols83). Tegenwoordig zijn er alleen nog in de grensgebieden van Europa, waar de laagste concentraties aan PCB's worden gevonden, stabiele florerende populaties (Leo97). Voederproeven met de aan de otter verwante nerts hebben uitgewezen dat

toediening van PCB's via het voedsel een grote invloed heeft op de voortplanting (Boe84, Jen77). De grenswaarde voor het optreden van effecten bij otters ligt bij een gehalte van 0,7 ng TEQ/kg vis (Smi96). Alleen in vissen uit de schoonste gebieden in Nederland zijn de gehalten lager dan deze grenswaarde. In het Haringvliet zijn gehalten in vis gevonden van 40 ng TEQ per kilogram vis. Dit duidt erop dat in veel gebieden in Nederland, vooral de gebieden die door de Rijn en Maas worden beïnvloed, gezondheidseffecten van PCB's voor de otter kunnen worden verwacht bij herintroductie van dit dier. In otters zijn gehalten gevonden die 16 tot 36 maal hoger zijn dan die in andere marterachtigen (Voo94). Dit komt doordat otters uitsluitend vis eten.

3.1.2 Vogels

Vogels in Nederland

Al rond 1970 hebben in Nederland Koeman en medewerkers geconstateerd en gedocumenteerd dat DDT, PCB's en dioxine-achtige stoffen de reproductie van visetende vogelsoorten, zoals de grote stern en de eidereend, verstoren (Koe69, Koe72). Ook de aanwezigheid van de 'drins' Endrin en Telodrin in de Waddenzee, als gevolg van lozingen in de Nieuwe Waterweg speelde een grote rol bij de grote stern en de eidereend (Swe72).

In Nederland zijn reproductie-effecten bij twee visetende vogelsoorten, de aalscholver (*Phalacrocorax carbo*) en de visdief (*Sterna hirundo*), het best gedocumenteerd. Sinds de jaren zestig zijn de gehalten van gechloroerde koolwaterstoffen bij Nederlandse toppredatoren, inclusief visetende vogelsoorten, sterk verminderd. Desondanks is uit veld- en laboratoriumonderzoek met Nederlandse visdieven en aalscholvers in de eerste helft van de jaren negentig gebleken, dat de gehalten van alle stoffen (behalve de 'drins') in vis nog steeds voldoende zijn om (subtiele) effecten op de reproductie te kunnen veroorzaken.

Vergelijkend onderzoek bij een aantal Nederlandse broedkolonies van de aalscholver toonde een relatief slecht broedresultaat aan in De Biesbosch. In dit onderzoek correleerden de DDT-metabolieten in het ei en het voedsel positief met het vóórkomen van dunne eischalen, terwijl de PCB-gehalten negatief waren geassocieerd met het percentage uitgekomen eieren en het broedsucces (Dir95). Onderzoek met aalscholverembryo's uit twee verschillende blootgestelde kolonies toonde eveneens aan dat *in ovo* blootstelling aan de huidige niveaus van PCB's en dioxines een negatief effect heeft op de embryonale ademhaling en ontwikkeling (Ber94).

Uitgebreid laboratoriumonderzoek is eveneens gedaan met eieren en embryo's van de visdief (Bos95, Mur94). Gebleken is dat in gebieden met de hoogste concentratie van PCB's en dioxine, bijvoorbeeld het Haringvliet, de broedduur verminderde met circa twee dagen (Bos95). Ook zijn diverse veranderingen in de cytochroomP450-inductie, en

de schildklierhormoon- en vitamine A-huishouding gevonden, waarvan de fysiologische of toxicologische relevantie echter onduidelijk is. Deze effecten zijn geassocieerd met de gehalten van PCB's en dioxines in de dooierzak (Bos95, Mur94, Mur96). Bosveld berekende dat een gehalte van circa 50 picogram dioxine equivalenten/gram vis (versgewicht) als een LOEC (*lowest observed effect concentration*) voor inductie van cytochroomP450 gezien kan worden. Deze enzyminductie wordt algemeen beschouwd als een van de voor dioxine-achtige verbindingen, inclusief sommige PCB'S, meest gevoelige biochemische processen (Saf90, Saf94).

Vogels in het buitenland

Effecten op de reproductie van vogels in het buitenland zijn met name voor Noord-Amerika goed beschreven. Al in 1962 gaf Rachel Carson aan dat de accumulatie van chloorkoolwaterstoffen verantwoordelijk was voor het dunner worden van de eischaal bij zangvogels (Car62). De daaruit voortvloeiende verminderde reproductie wordt in belangrijke mate toegeschreven aan DDE (Ris89). Correlaties tussen hoge gehalten DDE en dunnere eischalen zijn aangetoond bij onder meer aalscholvers, zilvermeeuwen, sterns en bij roofvogels zoals de *bald eagle*, prairievalk en smelleken (All91, Gil74, Pea75, Pea88, Rat67, Wes83). Ook zijn bij een groot aantal in het wild levende visetende vogelsoorten effecten op gedrag, nestgrootte, ontwikkeling van de gonaden en embryo-mortaliteit aangetoond (Fry95). Over het algemeen zijn deze nadelige effecten bij vogels in Noord-Amerika geassocieerd met hogere concentraties van chloorkoolwaterstoffen, aangenomen wordt dat, naast DDE, ook dioxine-achtige stoffen en PCB's een essentiële rol spelen (Fry95). Bij vergelijking van de Nederlandse situatie met die in Noord-Amerika loopt vooral de associatie tussen dunne eischalen en DDE bij aalscholvers in de Biesbosch in het oog.

Behalve naar (duidelijk gebleken) nadelige effecten op de eischaaldikte en de embryonale ontwikkeling is in Noord-Amerika het laatste decennium eveneens veel onderzoek gedaan naar meer subtiele biochemische variabelen die als vroege indicatoren van blootstelling kunnen dienen. Hierbij is vooral gebruik gemaakt van de inductie van een bepaald cytochroom, namelijk P4501A(1), een enzym dat in vogels al bij lage concentraties van dioxine-achtige stoffen en PCB's geïnduceerd kan worden (Bel90, Bos95, Hof87, Ken96, San94a, San94b). Ofschoon de (statistische) correlatie tussen P4501A(1)-inductie en nadelige effecten van dioxine-achtige stoffen bij wilde vogelsoorten niet zo diepgaand onderzocht is als bij knaagdieren, heeft het Amerikaans en Canadees onderzoek met de Foster's stern, de visdief en de blauwe reiger voldoende basis gegeven om aan te nemen dat deze relatie eveneens bij vogels bestaat (Ken96, San94). De onderzoeksresultaten blijken een goede overeenkomst te vertonen met de uitkomsten van het al genoemde Nederlandse onderzoek met aalscholvers en visdieven (Ber94, Bos95).

Voor een meer uitgebreid overzicht van effecten van contaminanten op de reproductie en ontwikkeling van vogels verwijst de commissie naar een publicatie van de CSTEE (CTS99).

3.2 Effecten bij vissen

Nederland

Eerste metingen in Nederland bij de bot afkomstig uit ondermeer het IJsselmeer en een aantal brakke en estuariene wateren, laten met name in de Euromonding en het Noordzeekanaal significante vitellogenine-inductie bij mannelijke vissen zien (Bri97). De oestrogene effecten kunnen zelfs nog in lichte mate worden waargenomen op de in open zee gesitueerde paaigronden (20 tot 40 km uit de Hollandse Noordzeekust) (All97, Mat98). Vitellogenine kan meerdere weken in het bloed van mannelijk vissen aanwezig zijn en het is daarom mogelijk dat de paaipopulaties van de bot in open zee de blootstelling aan oestrogene stoffen grotendeels in de estuaria hebben opgelopen (Mat98). De mogelijkheid van contaminatie in open zee kan echter niet op voorhand worden uitgesloten. Ook is *in vitro* in de meeste sedimentextracten afkomstig uit estuaria een significante oestrogeniteit met behulp van receptor/reporter gen-assays aangetoond (Leg98).

Dat de niveaus van inductie van vitellogenine in mannelijke bot uit Nederlandse estuaria en kustwateren vergelijkbaar zijn met die in soortgelijke gebieden in Engeland zou er volgens de commissie op kunnen wijzen dat interseksualiteit* bij vissen ook in Nederland kan voorkomen.

Gegevens van het RIVO vanaf de jaren zestig geven geen verandering van sekseratio's bij platvissen zien. Lang en medewerkers hebben daarentegen enigszins afwijkende ratio's aangetoond in schaar uit bepaalde gebieden in de Noordzee, met nu eens meer en dan weer minder vrouwelijke dieren (Lan95). Ook zijn er sinds de jaren tachtig berichten van een verspreid voorkomen, in bepaalde gebieden vaak in relatief hoge prevalenties, van embryonale afwijkingen bij diverse vissoorten in de kustwateren van de Noordzee (Cam92). Het is echter niet duidelijk of deze waarnemingen samenhangen met blootstelling aan hormoonontregelende stoffen.

Op Texel is met de bot effectonderzoek gedaan in bassins met middelmatig vervuild baggerslib (klasse 2) afkomstig uit het Rotterdamse havengebied. Naast een toename van de incidenties van een virale huidziekte en de inductie van levertumoren (Vet97) is een

* Interseksualiteit bij vissen is een abnormaliteit die gekenmerkt wordt door de ontwikkeling van eicellen in (een overigens normale testis van) mannelijke individuen, waardoor verminderde fertiliteit en steriliteit kan ontstaan. (Dit in afwijking van hermafroditisme waarbij twee geslachten functioneel en van nature voorkomen in één individu.)

verschuiving van de afrijptijd met drie tot vier maanden bij vrouwelijke vissen vastgesteld (Jan97). Het exacte werkingsmechanisme is niet opgehelderd.

Buitenland

Verstoringen van de reproductie — waaronder verminderde vruchtbaarheid, masculinisatie van vrouwtjes en feminisatie van mannetjes — als gevolg van hormoonverstoring zijn de laatste jaren lokaal in de buurt van vervuilingsbronnen (effluenten van RWZI's, hout- en papierverwerkende industrie, textielindustrie, etc.) waargenomen in Canada, VS, en UK (Gag95, Har96, Har97, Job96, Job97, Job98, Leb97, Lye97, Mun91, Pur94, War96).

Voor het Engelse onderzoek, waarin recentelijk effecten van hormoonontregelende stoffen bij natuurlijke vispopulaties uitvoerig zijn onderzocht, is mogelijk relevant voor de Nederlandse situatie. Blijkens dat onderzoek leiden de meeste onderzochte effluenten van RWZI's tot oestrogene effecten bij vis (Pur94, Sum95). Ook in een aantal ontvangende oppervlaktewateren is oestrogene activiteit gevonden (Har97). Gekooide mannelijke regenboogforellen (*Oncorhynchus mykiss*) bleken vitellogenine aan te maken. Daarnaast is een vertraging van de groei van de testikels gevonden. Hoewel in eerste instantie alleen alkylfenolderivaten als bron zijn geïdentificeerd (Job96), is later vastgesteld dat de oestrogene activiteit van de watermonsters mede kan worden verklaard uit de aanwezigheid van natuurlijke oestrogenen (17β -oestradiol en oestron) en, in mindere mate, synthetische oestrogenen afkomstig van de anticonceptiepil (17α -ethynyl-oestradiol) (Des98).

De ruime mate waarin oestrogene effecten optreden, blijkt ook uit een grootschalig veldonderzoek waarbij in een aantal riviersystemen — waarop afvalwater-effluenten worden geloosd — verhoogde gehalten aan vitellogenine bij de blankvoorn (*Rutilus rutilus*) zijn gevonden. Bovendien bleek dat zeer hoge prevalenties (tot plaatselijk meer dan 90% van de onderzochte populatie) interseksualiteit voorkwamen (Job98).

Deze zojuist geschetste bevindingen leveren een eerste aanwijzing voor een wijdverspreid effect van oestrogeen-actieve stoffen in het aquatische milieu. De in het veld waargenomen reproductiestoornissen bij vissen zijn consistent met uitkomsten van laboratoriumonderzoek en vertonen een associatie met lozingen van RWZI's die aantoonbaar oestrogene steroïden bevatten (Job98).

Niet alleen in de Engelse rivieren maar ook in de estuaria zijn oestrogene effecten gevonden. Ook bij de bot in een vijftal estuaria langs de kust van Wales en Engeland vertoonden bijna alle mannelijke exemplaren verhoogde vitellogenine-concentraties en werd tot ongeveer 20% interseksualiteit in de meest vervuilde estuaria waargenomen (All97, Mat98). De oorzaken van deze verschijnselen bij de bot zijn onbekend maar industriële

effluenten zouden een grotere rol kunnen spelen dan het geval is bij vissen in het zoete water (Mat98).

Relatie tussen de Engelse en de Nederlandse situatie

Verontrustend voor de Nederlandse situatie is de in het Engelse onderzoek geconstateerde associatie tussen het voorkomen van interseksualiteit en de gevonden vitellogenine-gehalten. In Nederland, waar onderzoek naar interseksualiteit nog niet heeft plaatsgevonden, zijn namelijk vitellogenine-niveaus in estuariene vis aangetoond die overeenkomen met de niveaus in estuaria in Engeland.

3.3 Resultaten van in-vitrotests uitgevoerd in Nederland

Uit in vitrometingen blijkt dat in veel wateren oestrogene activiteit voorkomt. Niet alleen is dit het geval bij effluenten van RWZI's, industriële zuiveringsinstallaties en het water van grote rivieren (Bel99) maar ook, vooral, in waterbodems van estuaria met grote industriële activiteiten, zoals de Europoort en de haven van IJmuiden (Leg98). Metingen aan Rotterdams havenslib en aan verontreinigde sedimenten in het algemeen doen vermoeden dat het voornamelijk om verbindingen gaat die goed oplosbaar zijn in water (Leg97, Leg98). Gebleken is namelijk dat voor het grootste deel de oestrogene activiteit te vinden is in de polaire aceton-extracten van de sedimenten en nauwelijks in de meer apolaire hexaan-extracten (Leg97). Op dit moment is niet bekend om welke stoffen het hier gaat. Wel staat vast dat in de buurt van zuiveringsinstallaties, maar ook in het water van de Rijn en de Maas, oestrogene activiteit en concentraties van natuurlijke en synthetische hormonen zijn gemeten waarbij effecten op vissen verwacht mogen worden. In hoofdstuk 5 gaat de commissie nader in op de aanwezigheid van natuurlijke en synthetische hormonen in het Nederlandse milieu.

3.4 Veldwaarnemingen van effecten bij ongewervelde dieren

Wulken en purperslakken

Bij prosobranche slakken van de subklassen Mesogastropoda en Neogastropoda zijn in kustgebieden over de hele wereld afwijkingen gevonden die worden toegeschreven aan tributyltin (TBT) in aangroeiwerende scheepsverven (Ell90, Foa93, Hor94, Saa90). Het gaat om imposeks en interseksualiteit. Imposeks is het voorkomen van een mannelijk orgaan of gedeelte daarvan bij een vrouwtjesdier, terwijl de primaire vrouwelijke geslachtsorganen volledig intact zijn. Het mannelijk orgaan is als het ware toegevoegd

(*superimposed*). Bij interseksualiteit bij slakken daarentegen zijn sommige vrouwelijke organen omgevormd tot een mannelijk orgaan.

Alle populaties van de purperslak (*Nucella lapillus*) en de alikruik (*Littorina littorea*) in de kustgebieden van de Noordzee zijn in mindere of meerdere mate aangetast (NST93). In de Waddenzee is de wulk (*Buccinum undatum*) verdwenen en in het Nederlandse deel van de Noordzee zijn de populaties achteruitgegaan. Hierbij speelt echter ook de schade van de boomkorvisserij een rol van betekenis.

Imposeks is buiten de kustgebieden voor het eerst gevonden bij de wulk in het zuidelijke deel van de Noordzee (Hal94). Er was een zeer sterke associatie tussen de frequentie van optreden en de intensiteit van het scheepvaartverkeer in bedoeld gebied. Later is ook in de Oosterschelde imposeks gevonden bij meer dan 90% van de vrouwelijke exemplaren van de wulk (Men96b). Ondanks deze hoge prevalentie planten deze dieren zich nog steeds voort, gezien de aanwezigheid van eipakketten op de bodem en sperma rond de eicellen van vrouwelijke wulken met duidelijke imposeks. Dit is niet het geval bij de purperslak, omdat hier — in tegenstelling tot de wulk — imposeks leidt tot afsluiting van de vrouwelijke geslachtsopening door de zich ontwikkelende zaadleider (Mer88). Interseksualiteit bij de alikruik is in de Duitse Waddenzee gevonden (Bau95, Bau97). Vooral in de omgeving van havens was de fertiliteit sterk verminderd.

Naast de gevonden sterke associatie tussen de intensiteit van het scheepsverkeer en de prevalentie van imposeks, bevestigen uitkomsten van laboratoriumonderzoek dat het hier gaat om een dosisafhankelijk effect van TBT. De concentraties van TBT in gebieden waar imposeks optreedt, zijn voldoende hoog om het optreden te verklaren. Het precieze mechanisme is niet bekend. Er zijn twee hypothesen over de werking van TBT. De ene hypothese gaat uit van een verstoring van de geslachtshormoonregulatie. Het is namelijk duidelijk dat blootstelling aan TBT leidt tot een verhoging van het testosteronniveau (Oeh93). De andere hypothese zoekt de oorzaak in een neuro-endocrien mechanisme (Fer87, LeG83). Voor die laatste hypothese pleit dat juist zeer jonge wulken — waarbij de primaire geslachtsorganen zich nog niet hebben ontwikkeld — het meest gevoelig zijn voor TBT. Uit onderzoek in het laboratorium blijkt dat imposeks al kan optreden vanaf zeer lage blootstellingsconcentraties van TBT: 1 nanogram tin/liter bij de purperslak en 7 ng/l bij de wulk (Gib87, Men97). Interseksualiteit bij de alikruik treedt op bij concentraties van 10-15 nanogram/liter.

Het optreden van imposeks als gevolg van de aanwezigheid van tributyltin is aangetroffen bij een honderdtal prosobranche zeeslakkensoorten (Fio91). Interseksualiteit daarentegen is alleen bij de alikruik gevonden. Tributyltin is daarnaast ook zeer toxisch voor bijvoorbeeld de larven van oesters. TBT illustreert dat er stoffen bestaan die al bij zeer lage concentraties de geslachtshormoonhuishouding van slechts een bepaald aantal diersoorten ontregelen. Effecten van dergelijke stoffen zijn zowel in veld- als in laboratoriumonderzoek gemakkelijk over het hoofd te zien.

Aangroeiwerende verven bevatten naast tributyltin soms ook trifenyltin (tot 10%). Trifenyltin (TFT) wordt daarnaast op grote schaal als fungicide toegepast in de aardappelteelt. Het experimentele bewijs dat TFT ook imposeks kan veroorzaken, is nog niet geleverd. Sommige onderzoekers vinden wel imposeks, andere niet. Wel is in laboratoriumonderzoek gebleken dat TFT het optreden van imposeks bevordert. Imposeks is gevonden in Japanse wateren waar de scheepvaartintensiteit laag is maar waar TFT-concentraties door de aanwezigheid van de landbouw waarschijnlijk wel hoog zijn (Hor94). Ook in Nederland zijn de concentraties van TFT vaak hoog (Stä95).

Effecten van TBT op levensgemeenschappen

Over de gevolgen van TBT voor levensgemeenschappen is weinig bekend. Bij het eiland Man verwijderden onderzoekers alle purperslakken, teneinde de gevolgen van imposeks bij purperslakken op de levensgemeenschap te simuleren (Spe90). Het gevolg was een toename van de aantallen van bepaalde prooidieren van de purperslak: bepaalde schelpsoorten - waaronder de mossel- en zeepokken. Deze toename leidde tot lagere aantallen macrofyten, waarmee deze prooidieren zich voeden.

Het is aannemelijk — maar nog niet aangetoond — dat effecten bij de wulk hun weerslag hebben op de levensgemeenschap waarin de wulk zich bevindt. De wulk is een vrij actieve jager die leeft van tweekleppige schelpdieren, wormen, kleine kreeftachtigen en eieren. Wulken voeden zich ook met dood materiaal. Zij worden op hun beurt gegeten door kreeften, krabben en grotere vissen zoals rog en kabeljauw. De schelp van de wulk vervult een speciale rol in het ecosysteem. Holtedieren, sponzen en zee-anemonen gebruiken de schelp als aanhechtingsplaats. De heremietkrab (*Pagurus bernardus*) beschermt zich tegen predatoren door de schelp als onderkomen te gebruiken. In het zuidelijk gedeelte van de Noordzee is de wulk de enige leverancier van schelpen die groot genoeg zijn om volwassen heremietkrabben te herbergen (Hal93). Naast een achteruitgang van de organismen die worden begraasd of bejaagd door de prooidieren van de wulk, zijn dan ook effecten op heremietkrabben te verwachten.

3.5 Conclusies

In tabel 1 heeft de commissie de bewijskracht samengevat voor het causale verband tussen geslachtshormoonontregelende stoffen en waargenomen effecten in het Nederlandse milieu. Daarvoor zijn de criteria gebruikt die door Vethaak en medewerkers (Vet97) zijn opgesteld. De criteria zijn een modificatie van de veel gebruikte algemene criteria van Fox en Hill (Fox91, Hil65).

Tabel 1 Bewijskracht voor de oorzakelijke relatie tussen geconstateerde effecten en milieuvreemde stoffen, aan de hand van causaliteitscriteria.

	zeehond	otter	aalscholver/ visdief	bot	wulk/ purperslak
aangetoonde effecten bij individuele dieren	+	+	+	+	+
aangetoonde nadelige effecten in populaties	+	+/-	?	-	+
mate van coherentie tussen effecten waargenomen in populaties versus die in individuen	+	+/-	+	-	+
identificatie van een waarschijnlijk werkingsmechanisme consistent met effecten waargenomen in individuen	+/-	-	+	+	+/-
positieve identificatie van specifieke contaminanten die via dit mechanisme werken	+/-	-	+	+	+
aannemelijkheid dat blootstelling plaatsvindt, in termen van effecten op individueel niveau die optreden via het werkingsmechanisme	+	+	+	+	+
bewijs van herstel van populaties of individuen na wegnemen van chemische stressor of aangetoond concentratie-afhankelijk effect in milieu	+	?	?	-	+

Toppredatoren

Voor visetende zoogdieren en vogels in het Nederlandse milieu is naar de mening van de commissie voldoende aangetoond dat bij bepaalde soorten negatieve effecten op de reproductie door DDE, PCBs en dioxines zijn veroorzaakt. De commissie verwijst voor de bewijskracht afkomstig uit laboratoriumonderzoek naar paragraaf 4.2. De in het veld waargenomen effecten hebben in het verleden zeker bij de zeehonden en waarschijnlijk bij otters en aalscholvers geleid tot reducties van (plaatselijke) populaties. Vooral in sedimentatiegebieden van Rijn, Maas en Schelde is de contaminatie door genoemde stoffen nog dermate hoog dat voor aldaar levende visetende toppredatoren nog steeds nadelige effecten op reproductie en ontwikkeling te verwachten zijn.

De commissie merkt op dat onderzoek bij zuigelingen naar de mogelijke effecten van bovengenoemde stoffen, met name PCB's en dioxines, voldoende aanwijzingen heeft opgeleverd dat deze stoffen de ontwikkeling en het gedrag van de mens in het eerste levensstadium kunnen beïnvloeden (Hui95, Jac93, Sau94). Vergelijkbare informatie hierover bij de Nederlandse wilde fauna ontbreekt. Toch kunnen dergelijke effecten bij de wilde fauna optreden, zoals aangetoond in onderzoek in Noord-Amerika met onder meer zilvermeeuwen.

Aquatische dieren

De commissie vindt nog onduidelijk welke stoffen verantwoordelijk zijn voor de gevonden effecten bij vissen en in in-vitrotests. Veldonderzoek naar de ontregeling van de geslachtshormoonhuishouding bij aquatische organismen in het veld heeft nog maar beperkt plaatsgevonden. In het algemeen meent de commissie dat aquatische organismen, door de blootstellingsroute en de hoge concentraties in het aquatische milieu, hogere risico's lopen dan soorten die zich hoger in de voedselketen bevinden. De commissie bespreekt in de volgende hoofdstukken om welke stoffen het hier kan gaan. Het bewijs van een hormoonontregelend effect (op individuen en populaties) bij wulken en purperslakken in Nederlandse kustwateren en de Noordzee, zoals aangetoond voor TBT, is volgens de commissie wel overtuigend geleverd. Veld- en experimenteel onderzoek heeft uitgewezen dat de effecten van TBT op de reproductie van deze ongewervelden al plaatsvindt bij zeer lage concentraties (enkele nanogrammen per liter). Dit illustreert dat ongewervelden eveneens zeer gevoelig kunnen zijn voor hormoonontregelende effecten van stoffen. Effecten op ongewervelde dieren verdienen dan ook meer aandacht.

Classificatie van milieuvreemde potentiële hormoonontregelaars in het Nederlandse milieu

Er zijn in Nederland verschillende bronnen van milieuvreemde stoffen die de geslachtshormoonhuishouding van dieren zouden kunnen ontregelen. Bronnen van deze stoffen zijn RWZI's, landbouw, grensoverschrijdende rivieren en atmosferische depositie. Het gaat vaak om ongedefinieerde mengsels. Ook is niet altijd voldoende kennis over de geslachtshormoonontregelende werking beschikbaar. De commissie richt zich in dit hoofdstuk dan ook niet op bronnen maar op afzonderlijke pesticiden en stoffen afkomstig uit industriële productieprocessen. Het betreft 77 stoffen waarvoor in de literatuur effecten op de hormoonhuishouding zijn beschreven of vermoed.

Na toetsing aan een aantal criteria ten aanzien van blootstelling, effectconcentraties en werkingsmechanisme, volgt een indeling in drie klassen op grond van de '*weight of evidence*'. Bij de stoffen uit klasse 1 is deze het grootst.

De in klasse 1 ingedeelde stoffen krijgen een afzonderlijk bespreking. In de slotparagraaf signaleert de commissie feiten en overwegingen met betrekking tot de onvermijdelijke onzekerheden in de gegevens en de veronderstellingen waarop haar stoffenclassificatie berust. Ook tracht zij haar bevindingen te koppelen aan de gevolgen van deze stoffen voor ecosystemen in Nederland.

4.1 Criteria en gegevens

Het belangrijkste selectie criterium is de zogeheten PEC/N(O)EC-verhouding. Behalve van deze verhouding wordt bij de selectie tevens gebruik gemaakt van informatie over het werkingsmechanisme verkregen uit in-vitrotests.

4.1.1 De PEC/N(O)EC-verhouding

De verhouding tussen de blootstelling (*predicted environmental concentration, PEC*) en de hoogste concentratie waarbij nog geen effect optreedt (*no (observed) effect concentration**) is een veel gebruikte maat voor het uitdrukken van het risico dat een stof oplevert. In dit advies zijn uitsluitend gemeten blootstellingsconcentraties gebruikt. Indien de PEC/N(O)EC-verhouding groter is dan 1, mogen effecten verwacht worden. Als gevolg van interacties tussen hormoonontregelende stoffen kan echter de concentratie waarbij effecten optreden aanzienlijk lager zijn dan de voor elke afzonderlijke stof bepaalde PEC (synergisme, additiviteit). Ook moet rekening gehouden worden met langere blootstellingstijden in het veld, blootstelling gedurende alle levensfasen, en verschillen in gevoeligheid tussen diersoorten. Om deze reden heeft de commissie een arbitrair gekozen veiligheidsfactor van 100 gehanteerd. Dit betekent dat zij een risico aanwezig acht als de PEC/N(O)EC-verhouding van een stof groter is dan 0,01.

Het vaststellen van de PEC/N(O)EC-verhouding loopt langs de volgende lijnen:

- De directe blootstelling (PEC), bijvoorbeeld de concentratie van een stof in water, wordt gedeeld door de N(O)EC voor een aquatisch organisme.
- Voor toppredatoren wordt — indien de stof kan accumuleren in organismen — de PEC bepaald als het gemeten of geschatte gehalte in voedsel (bijvoorbeeld vis). Zo is het gehalte van een stof in vis te schatten uit het gehalte in het sediment of zwevend stof. Ook de toepassing van een partiticoëfficiënt op een gehalte in water geeft een — zij het minder betrouwbare — schatting van het gehalte in vis. De PEC wordt vervolgens gedeeld door de N(O)EC (bepaald in voer) voor een zoogdier. Ook een gehalte in de toppredator zelf, of in eieren van de toppredator, kan als schatting van de PEC worden gebruikt. Zo'n gehalte wordt dan gedeeld door de *interne* N(O)EC (de concentratie *in* het organisme waarbij nog geen effect is waargenomen).

Organismen kunnen zowel *direct* aan een stof in een milieucompartiment zijn blootgesteld als *indirect* via voedsel. Door omzetting van een stof door een organisme ontstaan metabolieten in dat organisme. Het eten van dat organisme door een dier betekent dus blootstelling aan de stof én aan de metabolieten daarvan. Meestal is alleen informatie beschikbaar over het gehalte van de stof in een organisme, terwijl voor de metabolieten dergelijke gegevens ontbreken.

Blootstelling van kieuwademde dieren vloeit vooral direct voort uit de aanwezigheid van de stof in water, en meestal in mindere mate indirect uit de aanwezigheid van de stof en de metabolieten daarvan in hun voedsel. Toppredatoren zoals vogels en zoogdie-

* Een NOEC-waarde is experimenteel bepaald; een NEC-waarde is berekend uit een dosis-effectcurve.

ren worden voornamelijk blootgesteld aan stoffen en hun metabolieten die aanwezig zijn in het voedsel. De commissie gaat ervan uit dat *indirecte* blootstelling alleen voor top-predatoren van belang is, en dan alleen voor stoffen die accumuleren in (voedsel)organismen. Naast rechtstreeks verkregen meetuitkomsten voor het accumulatievermogen van een stof in organismen, kan ook de hydrofobiteit van een stof als maat dienen voor het accumulatievermogen. De commissie gaat ervan uit dat een stof kan accumuleren in organismen indien de $\log K_{ow}$ -waarde (K_{ow} = partiticoëfficiënt n-octanol/water*) groter is dan 3. Deze maat zegt overigens niets over de omzetting van de stof die in een organisme kan plaatsvinden.

4.1.2 Selectie van N(O)EC-waarden

Uitgangspunt bij de selectie van N(O)EC-waarden is dat het om een *in vivo* gemeten effect moet gaan dat duidt op een verstoring van de geslachtshormoonhuishouding (zie hoofdstuk 2). Niet altijd is ondubbelzinnig vast te stellen of een waargenomen effect het gevolg is van hormoonontregeling danwel van cytotoxiciteit (celtoxiciteit). Schade aan de testes kan bijvoorbeeld het gevolg zijn van beide werkingsmechanismen. Andere informatie over het werkingsmechanisme, bijvoorbeeld verkregen uit in-vitrobindingsassays voor een hormoonreceptor, of informatie over de verstoring van het testosteronmetabolisme, kan meer inzicht geven over het meest waarschijnlijke werkingsmechanisme. Soms heeft de commissie haar keuze van de N(O)EC-waarde mede gebaseerd op dergelijke *in vitro* verkregen gegevens.

Een ander selectie criterium is dat hormoonontregeling het primaire effect van een stof moet zijn. Bij sterfte door hoge blootstellingsconcentraties aan een stof, is vaak sprake van een cascade van (secundaire) effecten op een groot aantal systemen in een organisme. Ontregeling van de hormoonhuishouding bij dergelijke concentraties is dan waarschijnlijk een secundair effect. Het niveau van blootstelling geeft de waarschijnlijkheid aan of het een primair of een secundair effect betreft. Theoretisch is binding aan de receptor al bij zeer lage concentraties van belang. Verstoring van het metabolisme vindt vaak bij een iets hogere concentratie plaats, omdat de stof dan tegen het homeostase mechanisme in moet werken. Toxiciteit voor cellen en vervolgens voor het hele organisme treedt doorgaans op bij nog hogere niveaus. Gevonden N(O)EC-waarden zijn dan ook niet geaccepteerd indien uit andere onderzoeken blijkt dat bij die concentratie ook andere effecten optreden die niet direct aan hormonen gerelateerd zijn.

In een vorig hoofdstuk is gesteld dat er pas sprake is van een ‘ontregelaar’ als ook daadwerkelijk de fysiologische condities worden ontregeld. In diverse onderzoeken zijn bio-

* De K_{ow} waarde beschrijft de verdeling van een stof tussen octanol en water. Deze verdeling staat model voor de verdeling van een stof tussen (het vet van) een organisme en het omringende water.

chemische effecten gemeten, zoals enzyminductie, waarbij er nog geen sprake hoeft te zijn van een fysiologische verstoring. Van dioxines is bekend dat er een factor 10 verschil is tussen de laagste concentraties waarbij (*in vivo*) biochemische effecten optreden en de laagste concentraties die nadelige fysiologische effecten hebben. Wanneer er geen andere N(O)EC's zijn gevonden dan op basis van een biochemisch eindpunt, gebruikt de commissie deze factor tien als een schatting om binnen één soort te extrapoleren van een biochemisch effect naar een N(O)EC-waarde.

Selectiecriteria voor gegevens uit *in-vitro* tests

In-vitrotests kunnen aanvullende informatie geven over het mogelijke werkingsmechanisme en de ontregelende potentie van een stof. De commissie meent nadrukkelijk dat voor een classificatie de uitkomsten van een in-vivotest bepalend zijn. In-vitrotests zijn noodzakelijk als bevestiging om een stof definitief als hormoonontregelaar te kunnen aanwijzen. In de classificatie zijn de gegevens uit in-vitrobindingstests voor oestrogenen, androgenen en schildklierhormonen betrokken.

Ter zake heeft de commissie de volgende twee selectiecriteria gehanteerd. Wegens de stofspecificiteit van de affiniteit voor binding aan een receptor, is de affiniteit van een stof uitgedrukt ten opzichte van 17 β -oestradiol. Stoffen waarvan de affiniteit voor de receptor groter is dan een miljoenste van die van 17 β -oestradiol worden als positief geclassificeerd. Het tweede criterium is dat de concentratie van de stof in de in-vitrotest niet hoger mag zijn geweest dan 10 micromolair. Boven dergelijke concentraties kan er namelijk sprake zijn van toxiciteit voor de cellen.

4.1.3 *Classificatiegetal*

De commissie heeft de 77 in de wetenschappelijke literatuur in verband met hormoonontregeling genoemde organische stoffen als volgt in klassen ingedeeld:

Klasse 1. Hormoonontregelaars in Nederland.

De commissie deelt een stof in klasse 1 in als de PEC/N(O)EC-verhouding groter is dan 0,01. Bovendien moet de stof positief scoren in een in-vitrotest. Deze stof is bij de in Nederland aangetroffen concentraties in hoge mate van waarschijnlijkheid aan te merken als hormoonontregelaar.

Klasse 2. Potentiële hormoonontregelaars in Nederland

Kan de PEC/N(O)EC-verhouding niet worden vastgesteld, dan wordt een beroep gedaan op gegevens over gebruik (ook emissie en productie) en over fysisch-chemische eigenschappen (hydrofobiteit, accumulatievermogen en persistentie in het milieu). Is de stof hydrofoob, is het gebruik in Nederland groter dan 10 ton per jaar en scoort bovendien de stof positief in in-vitrotests, dan wordt zij aangemerkt als een potentiële hormoonontregelaar in Nederland.

Klasse 3. Van hormoonontregeling verdachte stoffen in Nederland

Voor deze stoffen is er minder evidentie dat de stof een hormoonontregelaar is in de Nederlandse situatie. Dit kan verschillende oorzaken hebben. De PEC/N(O)EC verhouding is lager dan 0,01, of deze verhouding kan niet worden vastgesteld, maar er zijn wel aanwijzingen uit de literatuur dat de stof een hormoonontregelaar is. Ook kan er sprake zijn van reproductietoxiciteit zonder dat duidelijk is dat de stof aangrijpt op de geslachtshormoonhuishouding. Ook het vermogen de schildklierhormoonhuishouding te ontregelen bij een hoge blootstelling leidt tot indeling in deze klasse.

Voor de overblijvende stoffen geldt hetzij dat er geen of onvoldoende aanwijzingen zijn dat zij de geslachtshormoonhuishouding ontregelen, hetzij dat ze niet in het milieu in Nederland zijn aangetoond.

In bijlage C is een overzicht gegeven van het classificatieresultaat voor alle stoffen. Het laat zich als volgt samenvatten:

- klasse 1 : 13 stoffen
- klasse 2: 6 stoffen
- klasse 3: 15 stoffen
- niet in één van de drie klassen: 43

De commissie bespreekt nu de hormoonontregelende stoffen die in klasse 1 zijn ingedeeld.

Alkyfenolen

Alkyfenolen komen hetzij rechtstreeks in het milieu terecht, hetzij als afbraakproducten van alkyfenol-ethoxylaten.

4-nonylfenol

Nonylfenol wordt toegepast als een mengsel van isomeren. In de literatuur is vaak niet duidelijk van welk mengsel sprake is.

Bij concentraties nonylfenol van 10-30 µg/l is bij mannetjesvissen productie van vitellogenine gevonden (Job96, Lec96, Ren96). Ook zijn bij deze concentraties vermindering van de testisgroei en verstoring van het testosteronmetabolisme waargenomen bij vissen en bij gehalten van 100 µg/l veranderingen van de sekseverhouding (Gra97, Job96). Blijkens de resultaten van in-vitrotests bindt de stof aan de oestrogeenreceptor. De bindingsverhouding ten opzichte van 17β-oestradiol varieert van $1 \cdot 10^{-3}$ tot $9 \cdot 10^{-6}$. In een andere in-vitrotest (ER-CALUX) was deze verhouding $3 \cdot 10^{-5}$. Concentraties van 0,14 µg/l tot 10 µg/l zijn gevonden in oppervlaktewater. De PEC/N(O)EC-verhouding is voor vissen aanmerkelijk groter dan 0,01. De stof is — zo blijkt uit de effecten — een duidelijke ontregelaar van de geslachtshormoonhuishouding.

Octylfenol

Bij regenboogforellen zijn, zoals voor 4-nonylfenol, effecten op de vitellogenineproductie en een vermindering van de testisgroei gevonden bij concentraties van 5 en 30 µg/l (Ash95, Job96). De *in vitro* gemeten binding aan de oestrogeenreceptor is vijfmaal sterker dan de binding van 4-nonylfenol. De concentraties in het milieu zijn vermoedelijk een factor 10 lager dan voor 4-nonylfenol. De PEC/N(O)EC-verhouding voor octylfenol is groter dan 0,01.

DDT

p,p'-DDT

In Nederland zijn gehalten in aalscholvereieren gevonden van 9,2 mg/kg vet en 171 µg/kg versgewicht. Weliswaar liggen deze interne gehalten meer dan een factor 100 onder de concentraties die bij ratten, kippen en kwartels effecten te zien geven (95 mg/kg lichaamsgewicht bij de rat (Bit70) en 136 en 190 mg/kg lichaamsgewicht bij respectievelijk de kip en de kwartel (Bit68)), maar vanwege de omzetting tot de sterk hormoonontregelende metabooliet *p,p'*-DDE (zie hieronder), deelt de commissie *p,p'*-DDT toch in klasse 1 in.

o,p'-DDT

Er zijn effecten gevonden op de geslachtsdifferentiatie van vogels, bij gehalten in de eieren van 2 mg/kg vers gewicht (Fry81). Deze gehalten zijn minder dan een factor 100 hoger dan de in Nederland gemeten gehalten in aalscholvereieren (<0,2 - 282 µg/kg). Uit een in-vitrotest bleek de binding ten opzichte van 17β-oestradiol $3 \cdot 10^{-5}$ te zijn. De PEC/N(O)EC-verhouding is groter dan 0,01. Deze stof is een duidelijke verstoorder van de geslachtshormoonhuishouding.

p,p'-DDE

De gehalten (20 mg/kg vers gewicht) in vogeleieren waarbij effecten op de geslachtsdifferentiatie zijn gevonden (Fry81), zijn in orde van grootte gelijk aan de in Nederland gevonden gehalten in aalscholvereieren (388-4460 µg/kg versgewicht, IVM93). Ook de concentraties waarbij Fry feminisatie van mannelijke embryo's vond (Fry81) hebben dezelfde orde van grootte. Het is dan ook te verwachten dat p,p'-DDE bij de huidige gehalten in het milieu hier te lande tot effecten leidt.

Chloordaan

Technisch chloordaan is een mengsel dat naast chloordaan onder meer nonachloor en heptachloor bevat. Bij de rat is een vergroting van de baarmoeder waargenomen (uterotropie) bij een geïnjecteerde dosis van 75 mg chloordaan per kg lichaamsgewicht (Wel71). *In vitro* vertoont chloordaan geen binding aan de oestrogenreceptor (Von96). In vetweefsel van aangespoelde zeehonden zijn gehalten gevonden van 1270 µg/kg versgewicht (5217 µg/kg vet). Een directe beoordeling van deze waarde wordt bemoeilijkt doordat het gehalte in vet is gemeten voor de som van alle componenten van het mengsel en de metabolieten, terwijl het bij de eerder genoemde geïnjecteerde dosis alleen om chloordaan ging. Bij een directe vergelijking is de PEC/N(O)EC-verhouding groter dan 0,01. De stof is een duidelijke ontregelaar van de geslachtshormoonhuishouding.

Dieldrin

Bij ratten trad een remming van een door oestron opgewekte uterotropie op bij een injectie in de buikholte van 21 mg/kg lichaamsgewicht (Wel71). Gezien de in Nederland gevonden gehalten in eieren van aalscholvers (0,66 mg/kg versgewicht) is de PEC/N(O)EC-verhouding groter dan 0,01.

De in-vitroresultaten spreken elkaar enigszins tegen. Hoewel er celdeling (proliferatie) in borstklieren (MCF-7 cellen) is gevonden — hetgeen als een oestrogeen effect

gezien wordt — is in een andere in-vitrotest geen binding aan de oestrogenreceptor aangetoond. Beide tests geven echter geen zekerheid over de capaciteit van een stof om de oestrogenreceptor te binden en te activeren. De relatieve potentie in een in-vitrotest (ER-CALUX) ten opzichte van oestradiol was $3 \cdot 10^{-6}$. Gezien de PEC/N(O)EC-verhouding en de waargenomen effecten — waaronder een dunner wordende eischaal — is dieldrin een duidelijke ontregelaar van de geslachtshormoonhuishouding.

Endosulfan

Bij blootstelling van vissen aan 0,2-1 $\mu\text{g/l}$ is schade aan de testes en ovaria gevonden (Kim95). De in-vitroresultaten spreken elkaar, net als bij dieldrin, enigszins tegen. Hoewel er proliferatie bij MCF7-cellen is gevonden, is er geen sterke binding aan de oestrogenreceptor. Er is een relatieve binding ten opzichte van oestradiol gevonden van $3 \cdot 10^{-6}$. In Nederland liggen voor zover bekend de concentraties in oppervlaktewater tussen $<0,001$ en $0,005 \mu\text{g/l}$. De PEC/N(O)EC-verhouding kan dan groter zijn dan 0,01 en derhalve beschouwt de commissie endosulfan als een ontregelaar van de geslachtshormoonhuishouding.

Lindaan (γ -HCH)

Na blootstelling van zwangere ratten zijn bij de mannelijke nakomelingen effecten gevonden op testisgewicht, spermatidenaantal en testosterongehalte in het plasma. Het gehalte in de lever van de mannelijke nakomelingen bedroeg $0,6 \text{ mg/kg}$ (Dal97a). Gehaltes in voegeleieren en vet van palingen zijn minder dan een factor 10 lager. Bij vissen zijn schade aan de ovaria en een vermindering van de gonadotropineconcentratie in het plasma gevonden bij een blootstellingsconcentratie van 5-10 $\mu\text{g/l}$ (Hir75). Deze gehaltes zijn ongeveer 100 maal hoger dan die welke in ons land in water zijn aangetroffen. De PEC/N(O)EC-verhouding is groter dan 0,01.

β -HCH

Blootstelling van ratten aan 50 mg/kg via het voedsel leidde tot uterotropie (Loe84). In Nederland zijn gehaltes β -HCH in aalscholvereieren gevonden tot $5,1 \text{ mg/kg}$; in vis is tot $8,1 \mu\text{g/kg}$ versgewicht en $989 \mu\text{g/kg}$ vet (IVM93) en $69 \mu\text{g/kg}$ versgewicht aangetroffen (1996, RIVO-DLO). Blijkens deze gegevens is de PEC/N(O)EC-verhouding in ieder geval groter dan 0,01.

Bij mannelijke vissen is productie van vitellogenine waargenomen na blootstelling aan $32 \mu\text{g/l}$ β -HCH (Wes85).

Chloordioxines (PCDD's), -dibenzofuranen (PCDF's) en -biphenylen (PCB's)

Bij zowel vogels als (zee)zoogdieren zijn in het veld aangetoonde effecten geassocieerd met het voorkomen van PCB's (zie hoofdstuk 3). Teneinde deze causale relatie aannemelijk te maken, gaat de commissie nader in op het werkingsmechanisme en de in het laboratorium gevonden effecten van PCB's en stoffen met een overeenkomstige werking.

Gedurende de laatste 15 à 20 jaar is via tal van laboratoriumexperimenten aangetoond dat PCDD's, PCDF's en PCB's al bij zeer lage concentraties een nadelig effect op de voortplanting en ontwikkeling van zoogdieren, vogels en vissen hebben. In het algemeen doen deze effecten zich al voor bij blootstellingsniveaus van 10^{-9} gram TEQ per kg lichaamsgewicht.

Ondanks uitgebreid onderzoek in de afgelopen decennia is nog steeds niet duidelijk via welk werkingsmechanisme deze verbindingen hun negatieve effect op de reproductie en de ontwikkeling uitoefenen. Wel bestaat in de wetenschappelijke wereld een zekere consensus over de rol van de Ah-receptor. Men neemt aan dat dit eiwit de initiële mediator is voor de meeste toxische en biologische effecten van dit soort verbindingen (Pol82, Saf86, Saf90, Saf94).

Zowel *in vivo* als *in vitro* is gevonden dat dioxine-achtige verbindingen, inclusief sommige PCB's, een anti-oestrogene werking kunnen hebben. Op dit moment gaat men er van uit dat deze werking voortvloeit uit interacties op DNA-niveau tussen de Ah- en oestrogeenreceptor. De meeste potente anti-oestrogene PCDD's en PCDF's hebben een 2,3,7,8-chloorsubstitutiepatroon. Zij accumuleren sterk in de voedselketen en zijn het meest toxisch voor zoogdieren, vissen en vogels (Ber94, Bos92, Saf90, Wal91).

Tot op heden is weinig onderzoek gedaan naar de directe relatie tussen de anti-oestrogene werking van dioxine-achtige stoffen en nadelige effecten op de voortplanting. Die werking komt het sterkste naar voren uit het *in vitro* onderzoek met levercellen van de regenboogforel, waarin is aangetoond dat de productie van vitellogenine geremd kan worden door de aanwezigheid van gechlorideerde dioxines en dibenzofuranen. De individuele potentie van deze stoffen om die productie te remmen lijkt overeen te komen met die voor andere toxische en biochemische effecten. (And96). Vanuit mechanistisch oogpunt zou hiermee het sterke effect van PCDD's, PCDF's en PCB's op de voortplanting en ontwikkeling van bepaalde vissoorten verklaard kunnen worden.

Naast de anti-oestrogene werking van PCDD's, PCDF's en PCB's is vooral voor een aantal metabolieten van PCB's een oestrogene werking gevonden (Con97, Kram97, Moo97, Ram97). Het betreft hier vooral bepaalde hydroxymetabolieten, die zich aan de oestrogeenreceptor kunnen binden. Metabolieten zijn aangetoond bij mensen en zeehonden in serumconcentraties die in dezelfde orde van grootte liggen als die van de congene-

ren waaruit ze gevormd worden. In het algemeen is voor deze specifieke hydroxymetaboliëten de oestrogene respons in de testsystemen drie tot vijf ordes van grootte minder sterk dan die van oestradiol (Con97, Ram97).

De 2,3,7,8-gesubstitueerde PCDD's en PCDF's en enkele dioxine-achtige PCB's moeten tot de meest giftige stoffen gerekend worden op het gebied van de voortplanting en ontwikkeling van jonge organismen.

Gezien de in het veld gevonden effecten, de hoge gehalten in het milieu, en de lage effectconcentraties is de PEC/N(O)EC-verhouding duidelijk hoger dan 0,01. Hoewel onduidelijk is of interactie met de oestrogeenreceptor hierbij een sleutelrol speelt, staat vast dat de hier beschouwde stoffen ontregelaars van de geslachtshormoonhuishouding zijn.

Toxafeen

Technisch toxafeen is een mengsel van ongeveer duizend verbindingen. Al deze verbindingen gedragen zich verschillend. Bij ratten is uterotropie gevonden na toediening van in totaal 100 mg/kg lichaamsgewicht (Wel71). In de witsnuitdolfijn zijn gehalten gemeten van 19 mg/kg lichaamsgewicht (Boe93). Aangenomen mag worden dat bij het ratexperiment de uiteindelijke interne concentratie aanzienlijk beneden de 100 mg/kg zal hebben gelegen, als gevolg van omzetting van toxafeen in de rat. Bij een directe vergelijking van het gehalte in de dolfijn en de concentratie toxafeen in de rat is de PEC/N(O)EC verhouding duidelijk hoger dan 0,01. Het is echter de vraag of die verhouding langs deze weg goed is te bepalen aangezien in het onderzoek bij ratten toxafeen is toegediend als technisch mengsel en er bij de gehalten van toxafeen in de dolfijn sprake is van een mengsel met een veel eenvoudiger samenstelling. De commissie classificeert deze stof voorlopig als een hormoonontregelaar.

Organotinverbindingen

Er is een zeer sterke associatie tussen de frequentie van optreden en de intensiteit van het scheepvaartverkeer en het optreden van imposeks in de Noordzee (zie hoofdstuk 3). Uitkomsten van laboratoriumonderzoek laten zien dat het hier gaat om een dosisafhankelijke effect van TBT. Imposeks is gevonden bij concentraties TBT van 1 nanogram tin per liter (Gib87). De concentraties van TBT in gebieden waar imposeks optreedt zijn voldoende hoog om het optreden te verklaren. Deze stof hoort dan ook thuis in klasse 1.

4.2 Discussie

Met nadruk plaatst de commissie in deze paragraaf kanttekeningen van voorbehoud bij de door haar aangebrachte stoffenindeling. Niet alleen zag zij zich soms geconfronteerd

met een groot gebrek aan onderzoeksgegevens, maar ook zijn verschillen in interpretatie van de beschikbare uitkomsten van onderzoek mogelijk.

De lijst van beschouwde stoffen is niet limitatief, want nog lang niet alle industrieel geproduceerde stoffen zijn op hun hormoonontregelende werking getest. Is dat wel gebeurd dan ging het voornamelijk om de oestrogenenhuishouding; naar verstoring van de androgenenhuishouding is nauwelijks onderzoek gedaan. Voor veel stoffen zijn onvoldoende gegevens beschikbaar over de concentraties in het milieu. Sommige gegevens zijn niet goed bruikbaar, omdat zij in een minder relevant milieucompartiment zijn gemeten, bijvoorbeeld concentraties van hydrofobe stoffen die in water zijn gemeten. Het aantal geteste diersoorten is zeer beperkt. De meeste gegevens hebben betrekking op de rat. Het vrijwel geheel ontbreken van gegevens over ongewervelden is een belangrijk manco, aangezien 95% van de diersoorten in een ecosysteem hiertoe behoort en daardoor een belangrijk deel van de voedselketen vormt.

Hoewel de hormoonsystemen bij gewervelde dieren in grote lijnen sterk op elkaar lijken, zijn er tussen soorten toch aanmerkelijke detailverschillen, waardoor geconstateerde effecten bij de ene soort niet zonder meer extrapoleerbaar zijn naar andere soorten. De kennis van hormoonsystemen beperkt zich tot enkele diersoorten, en is zelfs dan nog niet volledig.

De gevolgen van verstoring zijn afhankelijk van de levensfase waarin de verstoring plaatsvindt. Er bestaan grote verschillen tussen gewervelde diersoorten ten aanzien van de kritische fase. Vaak is onbekend of een bepaalde blootstelling tijdens een kritische fase heeft plaatsgevonden. Ook is op grond van resultaten van laboratoriumonderzoek vaak maar zeer beperkt te voorspellen wat de gevolgen zijn op populatieniveau.

De commissie heeft in haar definitie van het begrip hormoonontregelaar gesteld dat het om een effect op de voortplanting moet gaan, als gevolg van een verstoring van de geslachtshormoonhuishouding. Sommige van de waargenomen effecten zijn echter niet ondubbelzinnig toe te schrijven aan een verstoring van de hormoonhuishouding, maar kunnen het gevolg zijn van een ander type werking. Zo kunnen afwijkingen van de testes zowel een gevolg zijn van een directe inwerking van een stof op het orgaan zelf, als van een ontregeling van de geslachtshormoonhuishouding.

Niettemin meent de commissie dat haar classificatieresultaat voldoende weergeeft welke industrieel geproduceerde stoffen — op grond van de huidige kennis — door inwerking op de geslachtshormoonhuishouding de voortplanting van organismen potentieel bedreigen. Ook meent zij daarmee te hebben aangegeven welke stoffen prioriteit verdienen voor nader onderzoek, en waar zich kennishiaten bevinden.

In veruit de meeste gevallen zijn — zoals gezegd — de gegevens verkregen uit onderzoek met ratten. Dit houdt in dat de classificatie voornamelijk een (kwalitatieve) weerspiegeling is van de (kwalitatieve) risico's voor vogels en zoogdieren. Deze dieren worden vooral via hun voedsel blootgesteld aan hormoonontregelende stoffen. Het is dan ook niet verbazingwekkend dat het veelal gaat om stoffen die sterk accumuleren in de voedselketen.

Naast de in hoofdstuk 3 al genoemde PCB's en DDT-metabolieten komen in klasse 1 veel andere organochloorverbindingen terecht die eveneens in het verleden veel zijn gebruikt. Voor sommige zijn in het veld duidelijke hormoonverstoringen geconstateerd. De bewijskracht is echter minder sterk dan voor PCB's en DDT-metabolieten.

Uit de inventarisatie komen echter ook andere persistente stoffen met een hormoonontregelende werking naar voren waarvan het gebruik van veel recentere datum is. Te denken valt onder meer aan de organobroomverbindingen, die als vlamvertrager in gebruik zijn. Deze stoffen komen nu al in hogere organismen voor in aanzienlijke concentraties. Er is relatief weinig bekend over hun werking en werkzame concentraties. Dat zij door hun persistentie tot een wereldomvattend probleem kunnen leiden, blijkt uit een recente publicatie over het voorkomen van polybroomdifenyl-ethers in onder meer potvissen (Boe98). Potvissen leven van inktvissen die op een diepte tot twee kilometer voorkomen. Kennelijk zijn deze vlamvertragers — die nog niet zo lang in het milieu voorkomen als bijvoorbeeld de PCB's — al tot ver in de mariene voedselketen doorgedrongen.

Gegevens over effecten op aquatische organismen zijn voor zeer weinig stoffen beschikbaar. Op grond van hun effecten op kieuwademde organismen zijn alkylfenolen en organotinverbindingen ingedeeld in klasse 1. De effecten van tributyltin in Nederland op zoutwaterslakken zijn beschreven in hoofdstuk 3. Het is niet duidelijk welke stoffen verantwoordelijk zijn voor de andere in hoofdstuk 3 geconstateerde effecten. Wel geeft — op grond van het gegeven dat de geslachtshormoonhuishouding van zoogdieren sterk lijkt op die van gewervelde aquatische dieren — een hormoonontregelende werking bij zoogdieren (de rat) wel degelijk aanleiding om te vermoeden dat de stof(fen) in kwestie ook bij aquatische organismen tot hormoonverstoring kan leiden.

Natuurlijke en synthetische hormonen in het milieu

De commissie beschouwt in dit hoofdstuk de gevolgen voor ecosystemen van emissies van natuurlijke en synthetische hormonen (in de anticonceptiepil). Het gaat hier vooral om hormonen met een oestrogene werking.

Bij alle gewervelde dieren is oestradiol het meest potente oestrogene hormoon. De bindingsspecificiteit van oestrogeenreceptoren voor oestradiol is bij zeer uiteenlopende soorten — bijvoorbeeld de forel en de mens — nagenoeg gelijk. Met andere woorden: het systeem van hormoon en bijbehorende receptoren is gedurende de loop van de evolutie bij gewervelde dieren betrekkelijk weinig veranderd. Door de zeer hoge bindingsspecificiteit van natuurlijke en ook van synthetische hormonen leidt blootstelling aan lage concentraties bij alle soorten tot effecten op de voortplanting. Synthetische hormonen, zoals die in de anticonceptiepil, zijn juist bedoeld om bij lage concentraties de voortplanting te verhinderen.

Van nature zullen oestrogenen in zeer lage concentraties in ecosystemen aanwezig zijn, als gevolg van de uitscheiding van deze hormonen door gewervelde dieren. Dergelijke concentraties geven naar verwachting geen effecten op dieren. Door de grote aantallen mensen en (landbouw)huisdieren in Nederland en de ons omringende landen is de emissie van natuurlijke hormonen qua omvang niet meer als natuurlijk te bestempelen. De vraag is dan ook wat daarvan de gevolgen zijn voor ecosystemen. Hetzelfde geldt voor de fyto-oestrogenen: stoffen die door planten worden geproduceerd en die bij dieren als oestrogenen werken. Zij komen vooral via het gebruik van diervoeders in het milieu terecht.

Door de manier waarop natuurlijke en synthetische hormonen in het milieu belanden — namelijk via rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) of door afspoeling in gebieden met landbouw of veeteelt — worden vooral aquatische ecosystemen met deze stoffen belast.

5.1 Emissie van natuurlijke hormonen van menselijke en dierlijke herkomst

De door zoogdieren en de mens endogeen geproduceerde natuurlijke geslachtshormonen worden deels uitgescheiden in urine en in feces. Dit geldt ook voor de synthetische hormonen in de anticonceptiepil. Teneinde de orde van grootte van de emissies naar het milieu in kaart te brengen heeft de commissie zich — gelet op de in het geding zijnde aantallen — beperkt tot mensen, koeien, varkens en kippen. Zij beperkt dit nader tot zwangere vrouwen, drachtige dieren en eierleggende kippen, aangezien hier de grootste hoeveelheden uitgescheiden geslachtshormonen in het geding zijn. Bij de meeste zoogdieren vindt uitscheiding vooral via de urine plaats. Bij herkauwers zoals koeien en schapen daarentegen is uitscheiding via de feces het belangrijkste (Vel76). De commissie beperkt zich telkens tot de belangrijkste uitscheidingsroute .

5.1.1 Rundvee

De draagtijd van koeien varieert normaliter van 277 tot 286 dagen. Na ongeveer 110 dagen begint de productie en uitscheiding, voornamelijk via de feces van oestrogenen duidelijk toe te nemen. Het gaat dan om 17α -oestradiol, 17β -oestradiol en oestron in ongeconjugeerde vorm (resp 56%, 32% en 11%) (Hof97). Volgens Hoffman is het totale oestrogeengehalte in de feces aan het einde van de zwangerschap gemiddeld 0,5mg/kg feces (Hof97). Desaulniers vond na 28 weken al gemiddelde (totale oestrogeen) gehalten van ruim 1 mg/kg feces (Des89). Van dag 115 tot aan de geboorte is — blijkens Hoffman (Hof97) — de uitscheiding van oestrogenen gemiddeld 83 μ g/kg feces. Deze schatting lijkt aan de lage kant vergeleken met andere gegevens. Zo vonden, onder andere, Bamberg en Desaulniers tussen 20 en 28 weken (niet verder gemeten dan 28 weken) gemiddelde gehalten van respectievelijk 187 (17α -oestradiol) en 947 μ g (totaal oestrogenen)/kg feces (Bam84, Des89). Voor de berekening van de emissie in Nederland gaat de commissie uit van de gegevens van Hoffmann*, daarbij aanteknend dat ze waarschijnlijk een onderschatting inhouden.

* Het gehalte van 83 μ g/kg feces geldt voor de periode van 115 dagen tot de dracht. Uitgesmeerd over de hele dracht geeft dat 51,5 μ g/kg feces.

Tabel 2 Overzicht van de productie van oestrogenen in Nederland door vrouwelijk jongvee ouder dan 1 jaar en melkkoeien.

populatie	aantal dieren (maal 1000)	fecesproductie (kg per dier per dag)	conc oestrogenen in feces (µgram/kg feces)	totale oestrogenen uitscheiding via feces (in gram- men per dag)
jongvee, vrouwelijk 1 jaar en ouder	508	12,5	51,5	202
melk- en kalffkoeien	1 600	25	51,5	1 277

Tabel 2 is een overzicht van de productie van oestrogenen in Nederland door vrouwelijk jongvee ouder dan 1 jaar en melkkoeien. Het zijn namelijk deze twee groepen rundvee die een groot deel van de tijd drachtig zijn*.

5.1.2 Varkens

De normale duur van de dracht bij varkens is 110 tot 120 dagen. Uitscheiding van oestrogenen vindt voornamelijk via de urine plaats, en wel als oestransulfaat. De oestrogenenproductie en -uitscheiding stijgen gedurende de eerste 27 dagen van de dracht sterk tot waarden van 1,6 mg oestransulfaat/liter urine (Atk87). Vervolgens is er een sterke daling tot waarden iets boven het niveau van voor de dracht. Na ongeveer 50 dagen tot aan de geboorte nemen de productie en de uitscheiding opnieuw sterk toe, tot concentraties in de urine van 5 mg per liter urine (Rae63).

Het schatten van de emissie wordt bemoeilijkt doordat de gegevens uit de onderzoeken van Atkins en Reaside kwantitatief niet goed overeenkomen. Zo geeft Atkins alleen de gehalten gedurende de eerste 30 dagen. Gedurende dezelfde periode van de dracht vond Reaside gehalten van 0,2 mg/l, uitgedrukt als totaal oestrogenen. Mogelijk dat de waarden van Reaside — die uit 1963 dateren — structureel te laag zijn vanwege de destijds gebruikte analysetechnieken. Uit zowel het onderzoek van Reaside als dat van Edgerton (Edg71) blijkt dat het gehalte aan oestrogenen in de urine aan het einde van de dracht een factor 10 tot 20 hoger is dan het maximum van de eerste 30 dagen. Toepassing van deze factoren op de gegevens van Atkins zou resulteren in gehalten aan het einde van de dracht die aanzienlijk hoger zijn dan 5 mg/l. De commissie komt op grond van schatting uit de door Reaside en Atkins gepresenteerde curven tot een gemiddelde concentratie aan oestrogenen in de urine gedurende de gehele dracht van 0,5 tot 1 mg/l. Dit

* Koeien kalveren gemiddeld op 2,2 jarige leeftijd voor de eerste keer en worden op een leeftijd van gemiddeld 4,6 jaar afgevoerd. Bij een drachtijd van 270 dagen houdt dit in dat zij 62 % van hun levensduur drachtig zijn. Dit percentage is gehanteerd bij de berekening van de totale oestrogenenproductie.

leidt tot de in tabel 3 gepresenteerde schatting van de totale emissie van oestrogenen in Nederland door zeugen.

Tabel 3 Emissie van oestrogenen door zeugen in Nederland.

populatie	aantal dieren (maal 1000)	urineproductie (liter per dier/dag)	conc oestrogenen in urine (in mg/l)	totale emissie oestrogenen per dag (in kg) ^a
zeugen	1 605	5	0,5-1	4-8

^a In deze berekening is uitgegaan van 365 dagen dracht per jaar.

5.1.3 *Kippen*

Kippen scheiden behalve oestrogenen ook vrij grote hoeveelheden testosteron uit. In tabel 4 zijn de gehalten van beide hormonen in mest van kuikens, leghennen en hanen vermeld die door Shore zijn gepubliceerd (Sho93).

Tabel 4 Gehaltes van testosteron en oestrogenen in mest van kuikens, leghennen en hanen (Sho93).

	testosteron (µg/kg mest)	oestrogenen (µg/kg mest)
kuiken (K)	133	65
kuiken (J)	133	14
leghennen	254	533
hanen	670	93

Uitscheiding van oestrogenen vindt vooral plaats in de vorm van 17β-oestradiol, oestron en 17α-oestradiol (Bis91).

De commissie heeft de schatting van de totale hoeveelheden hormonen die in kippenmest worden uitgescheiden uitsluitend gemaakt voor leghennen (zie tabel 5) omdat deze dieren verreweg het grootste deel van de kippenpopulatie in Nederland uitmaken en bovendien — zoals uit tabel 4 blijkt — per dier verreweg de grootste hoeveelheden uitscheiden.

Tabel 5 Schatting van de emissie van oestrogenen en testosteron via kippenmest.

populatie	aantal dieren (maal 1000)	mestproductie (g/dier)	concentratie oestrogenen in mest (nanogram/gram mest)	totale uitscheiding oestrogenen (gram/dag)	concentratie testosteron in mest (µg/kg mest)	totale uitscheiding testosteron (gram/dag)
legghennen	41 000	50	533	1 090	254	520

5.1.4 Mens

Endogeen geproduceerde oestrogenen

Zwangere vrouwen scheiden in de laatste periode van de zwangerschap via urine ongeveer 30 mg oestrogenen per dag uit (Adl76, Fot87). Het gaat hier voornamelijk om geconjugeerd 17β-oestradiol, oestriol en oestron. Bij een geschat gemiddeld gehalte van 10 mg oestrogenen per dag gedurende de gehele zwangerschapsduur en bij ruim 180000 zwangeren (in 1998), is de totale uitscheiding ongeveer 2 kilogram per dag. Het aantal zwangere vrouwen in 1998 is hier gelijkgesteld aan het aantal geboortes in dat jaar.

De anticonceptiepil

De werkzame stof in de anticonceptiepil, meestal ethynyl-oestradiol, wordt uitgescheiden via urine en feces. In een onderzoek van Reed bleek dat na toediening van gelabeld ethynyl-oestradiol 22 tot 50% in de urine en 30% in de feces terecht komt (Ree72). In de feces betrof het voornamelijk de ongeconjugeerde vorm. In de urine werd 16% van de totale dosis in de ongeconjugeerde vorm gevonden.

Naar schatting zijn er in ons land 1,4 miljoen pilgebruiksters (CBS). De gemiddelde dagelijkse dosis ethynyl-oestradiol via de pil schat de commissie op 35 µg, de totale uitscheiding van ethynyl-oestradiol in ons land op 50 gram per dag. Deze waarde is een maximum omdat is uitgegaan van volledig excretie van (ongemetaboliseerd) ethynyl-oestradiol.

5.1.5 Conclusie

Volgens het voorgaande is de emissie van endogene oestrogenen door mens en dier in Nederland naar globale schatting ongeveer 10 kilogram per dag. Dit getal is wellicht een onderschatting omdat de bijdrage van rundvee aan de emissies aanmerkelijk hoger zou kunnen zijn dan de geschatte 1400 gram. De commissie heeft bovendien andere landbouwhuisdieren — zoals konijnen, eenden, schapen, geiten, paarden — en ook de huis-

dieren niet meegerekend omdat het hier om kleinere bronnen gaat. De schatting van de emissie van ethynyl-oestradiol ('de pil') is 50 gram per dag. Waarschijnlijk is dat een overschatting aangezien de uitscheiding gelijk is gesteld aan de inname. Hoe dan ook valt deze bijdrage in het niet bij de geschatte totale emissie van natuurlijke oestrogenen (10 kg per dag of meer). Opgemerkt zij dat de emissie vanuit de ons omringende landen buiten beschouwing is gelaten.

5.2 Lotgevallen van geëmitteerde natuurlijke en synthetische hormonen

De afbraak van de natuurlijke hormonen en de mobiliteit van deze stoffen bepalen uiteindelijk de concentratie in het oppervlaktewater. Afbraak vindt voornamelijk plaats door bacteriën. De mobiliteit is onder meer afhankelijk van de stoffeïenschappen en van de bindingseïenschappen van de substraten in de verschillende milieucompartimenten.

5.2.1 Emissiewijze

De lotgevallen van de in het milieu geëmitteerde hormonen zijn mede afhankelijk van de wijze waarop de emissie plaatsvindt. Zo komen de hormonen die door de mens worden uitgescheiden vooral via de rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) in het water terecht. Het rioolwaterbehandelingssysteem in Nederland is echter zodanig ingericht dat bij zware regenval de inhoud van het riool direct op het oppervlaktewater wordt geloosd. Afbraak door bacteriën in de zuiveringsinstallatie blijft dan achterwege.

Ook bij landbouwhuisdieren is de route waarlangs de hormonen in het milieu terechtkomen bepalend voor het lot van de stof. Drachtige koeien staan een groot deel van het jaar in de wei. De natuurlijke hormonen komen dan direct op het land terecht via de feces, en vervolgens door uitspoeling in het oppervlaktewater. Drachtige zeugen staan, in tegenstelling tot zwangere koeien, bijna altijd op stal. De emissie in het milieu zal dus mede afhangen van de afbraak door bacteriën tijdens de mestopslag. De mest van de zeugen wordt van het voorjaar tot oktober regelmatig op het land verspreid. Omdat dit tussen september en het voorjaar niet is toegestaan, zal de mest in die periode in opslag blijven. De mest van kippen is niet geschikt voor gebruik op grasland en wordt dan ook vooral in de akkerbouw benut. Voor een deel wordt kippenmest — al dan niet na drogen en pelleteren — gebruikt in de tuinbouw in binnen- en buitenland. De export van gepelleteerde kippenmest is echter door milieueisen in het buitenland betrekkelijk beperkt.

Ook de wijze van opbrenging van de mest op het land kan bepalend zijn voor het lot van de hormonen. De mest van landbouwhuisdieren wordt tegenwoordig meestal geïnjecteerd of ondergewerkt. De natuurlijke hormonen komen dan — afgeschermd van zonlicht — een aantal centimeters onder de grond terecht, zodat afbraak door zonlicht geen rol speelt.

5.2.2 *Afbraak*

De afbraaksnelheid van hormonen is in verschillende matrices en milieucompartimenten gemeten. Zo vond Tabak in bacteriecultures afbraakpercentages voor oestradiol, oestriol en oestron van 70 tot 94% na één week (Tab70). Min of meer vergelijkbare afbraaksnelheden zijn gevonden in RWZI's. Stumpf vond na vijf dagen een vermindering van 75% voor oestradiol en 89% voor ethynyl-oestradiol (Stu96). In een moderne RWZI in Israël zijn voor oestrogenen lagere afbraaksnelheden gevonden, namelijk 20% tot 88% na vijf dagen (Sho93). Aangezien de afbraak voornamelijk langs bacteriële weg plaatsvindt, lijkt het aannemelijk dat de afbraaksnelheid in oppervlaktewater geringer is dan in bacteriecultures of RWZI's. Blijkens nog niet gepubliceerde resultaten wordt onder aërobe condities oestradiol in rivierwater in enkele dagen omgezet in oestron (Jur99). De verdere afbraak van oestron zou eveneens enkele dagen beslaan. James vond eveneens een omzetting van oestradiol naar oestron in rivierwater (Jam98). Het duurde in dat onderzoek 20 dagen voordat oestradiol en oestron en 17 α -ethynyl-oestadiol grotendeels was afgebroken. Onder anaërobe omstandigheden in sediment is de omzetting aanzienlijk langzamer (Jur99). Bovendien bleek dat de omzetting van oestradiol naar oestron reversibel was. Ethynyl-oestradiol was onder beide omstandigheden aanzienlijk persistenter dan oestradiol (Jur99).

In kippenmest blijkt afbraak van oestrogenen en testosteron ook na enkele maanden niet of nauwelijks plaats te vinden. Ook industriële verwerking van kippenmest of verhitte tot 100 °C gedurende 24 uur bleek de hormoonconcentratie nauwelijks te beïnvloeden (Sho93). Nicols onderzocht de uitspoeling van oestrogenen in kippenmest op een weiland naar de sloot (Nic97). Na beregening van het weiland na een week hield die uitspoeling nog steeds aan.

Hoewel de literatuur beperkt is, lijkt de afbraak van hormonen in het milieu in het gunstigste geval enige dagen te vergen. Onder minder gunstige omstandigheden — zoals zuurstofloosheid en onvoldoende aanwezigheid van voldoende micro-organismen — zal de afbraak echter aanzienlijk trager gaan. In een substraat zoals kippenmest vindt — zoals gezegd — zelfs na maanden nauwelijks afbraak plaats. Het is onbekend in hoeverre dit ook geldt voor varkens- en koeienmest.

5.2.3 *Mobiliteit*

Jurgens vond voor de verdelingscoëfficiënten van oestradiol tussen water en verschillende sedimenten waarden van 20-67 l/kg (Jur99). Shore vond voor (gelabeld) oestradiol en oestron, respectievelijk 56% en 59% binding aan de bodem (alleen met organische oplosmiddelen te verwijderen). Testosteron bleek echter zeer makkelijk uitspoelbaar (Sho93).

Blijkens eerder genoemd onderzoek van Nicols is oestradiol — gezien de gevonden concentraties in de sloot — mobiel in de bodem (Nic97)

Uit de zojuist vermelde bevindingen blijkt dat oestrogenen niet sterk binden aan bodem of sedimenten. In het onderzoek van Nicols gaat het mogelijk deels om oestradiol in geconjugeerde vorm. De geconjugeerde vorm is aanmerkelijk beter oplosbaar in water dan de 'vrije' vorm, en is naar verwachting dan ook zeer mobiel.

5.3 Milieuconcentraties in Nederland

Voor zover de commissie bekend is, zijn tot dusver concentraties van hormonen in het Nederlandse milieu nog slechts in één onderzoek gemeten (Bel99). Het betreft concentraties in grote rivieren, estuaria en in het influent en effluent van RWZI's en industriële zuiveringsinstallaties. Tabel 6 geeft een overzicht van de verkregen uitkomsten voor stedelijke gebieden.

Tabel 6 Gemeten concentratieranges in ng/l van hormonen in diverse matrices (bron: Bel99).

milieumatrices	17 β -oestradiol	17 α -oestradiol	17 α -ethinyloestradiol	oestron
oppervlaktewater	<d.l. - 5.5	<d.l.-1.1	<d.l.-4.3	<d.l.-5.3
<i>stedelijk afvalwater:</i>				
influent/rioolwater	10-48	<d.l.-9	<d.l.10	10-140
rioolslib	<d.l.-98	<d.l.	<d.l.	<d.l.
effluent	<d.l.-12	<d.l.-5	<d.l.-8	<d.l.-47
<i>industrieel afvalwater:</i>				
influent/rioolwater	1-25	<d.l.-8	<d.l.-8	3-92
rioolslib	<d.l.	<d.l.	<d.l.	<d.l.

Zowel in influent als effluent van RWZI's en industriële zuiveringsinstallaties vonden de onderzoekers uitsluitend hormonen in ongeconjugeerde vorm. Deconjugatie van stoffen door bacteriën in zuiveringsinstallaties is een bekend fenomeen, en dient zelfs als maat voor het functioneren van een zuiveringsinstallatie. Kennelijk vindt deze deconjugatie ook al plaats voordat de hormonen in de RWZI terecht komen. De zojuist gepresenteerde gegevens geven een beeld van de hormoonconcentraties in grote rivieren en estuaria in de nabijheid van stedelijke gebieden. De gehalten liggen in de orde van nanogrammen per liter. Zoals uit 5.1 blijkt, is de emissie van hormonen door de mens slechts een fractie van die door landbouwhuisdieren.

Het is volgens de commissie niet mogelijk om op basis van de huidige kennis van de lotgevallen van deze hormonen, uit emissiegegevens gehalten in het oppervlaktewater

te schatten. Wel wijst de commissie erop dat in het algemeen door landbouwhuisdieren geëmitteerde natuurlijke hormonen niet in RWZI's terecht komen. Daarbij komen de eerder besproken aanwijzingen dat hormonen in het milieu niet zeer snel worden afgebroken en in bodem mobiel kunnen zijn. Het is daarom aannemelijk dat gehalten in het oppervlaktewater in gebieden met intensieve veeteelt, of in gebieden waar veel mest wordt uitgereden, aanzienlijk hoger kunnen zijn dan nabij stedelijke gebieden.

5.4 Effecten van natuurlijke en synthetische hormonen op aquatische organismen

Gebleken is dat een 17α -ethynyl-oestradiolconcentratie van 0,1 nanogram per liter bij mannelijke regenboogforellen leidt tot productie van vitellogenine (Pur94).

De drempelwaarde voor inductie van vitellogenine bij mannetjesregenboogforellen — na blootstelling gedurende drie weken aan 17β -oestradiol — ligt tussen de 1 en 10 nanogram per liter (Rou98). Concentraties hoger dan 100 ng/l leiden bij fathead minnows (*Pimephales promelas*) tot een afname van de testisgroei (Pan98). Blootstelling aan oestron leidt pas bij concentraties hoger dan 25 ng/l tot vitellogenine-inductie (Tyl98). Bekend is dat bij vissen oestron de werking van oestradiol kan versterken (Boh82). Dit roept de vraag op of dit ook het geval is bij gecombineerde blootstelling aan oestron en milieuvreemde stoffen die ook een oestrogene werking bezitten. Indien dit zo is, zouden de risico's van deze stoffen voor vissen aanmerkelijk groter kunnen zijn.

Ook de geconjugeerde vormen van oestradiol vertonen bij vissen een oestrogene activiteit. Oestradiolglucuronide heeft 10% van de activiteit van oestradiol, oestransulfaat 100% (Pel93).

5.5 Fyto-oestrogenen

Van nature blijken veel planten fyto-oestrogenen te bevatten, stoffen die de hormoonhuishouding van mensen en dieren kunnen verstoren. Vooral de plantensoorten die met behulp van bacteriën stikstof uit de lucht op kunnen nemen, zoals klavers en lucerne, bevatten hoge concentraties van deze stoffen. Zij produceren deze stoffen om de gewenste bacteriën aan te trekken en om het kiemen van bepaalde mycorrhizaschimmels te stimuleren (Bak95, Fri98). In hoeverre ze deze stoffen ook produceren als verdediging tegen herbivoren is niet duidelijk. In ten minste één geval lijken planten een isoflavonoïde te gebruiken als geboorteregulatiemiddel voor een herbivoor. De plant in kwestie wordt door kwartels gegeten en produceert in jaren van overvloedige regenval (en daardoor uitbundige groei) nauwelijks isoflavonoïden, in tegenstelling tot jaren met weinig regenval. In het laatste geval treedt bij de kwartels een oestrogene effect op, waardoor de legselgrootte bijna halveert (Bak95).

De fyto-oestrogenen zijn in te delen in een viertal stofgroepen; de isoflavonoiden (genisteïne, daidzeïne, formononetine, Biochanin A, glyciteïne), de coumestranen (coumestrol), de resorcyclusche zure lactonen en de lignanen (enterolacton, enterodiol, matairenisol). Om globaal na te gaan of fyto-oestrogenen — als component van diervoeders die op grote schaal in de intensieve veehouderij wordt gebruikt — problemen veroorzaken in ecosystemen beschouwt de commissie nu de emissies, afbraak, mobiliteit en effecten van deze stoffen.

5.5.1 *Bronnen en hoeveelheden*

In Australië zijn bij schapen effecten van ondergrondse klaver (*Trifolium subterraneum*) op de voortplanting geconstateerd. In Nederland voorkomende planten die hoge gehalten fyto-oestrogenen kunnen bevatten, zijn rode klaver en luzerne. Aangezien de hoeveelheid klaver en luzerne die in Nederland wordt verbouwd vrij gering is, acht de commissie deze bron voor ecosystemen van minder betekenis dan een andere bron, namelijk de consumptie van soja door landbouwhuisdieren. De commissie sluit echter niet uit dat lokaal klavers toch een bron van betekenis kunnen vormen. In 1997 is in Nederland 1,7 miljoen ton sojabonen, sojaschroot en -schilfers in diervoeders verwerkt (PD98). De belangrijkste fyto-oestrogenen in soja zijn daidzin, daidzeïne, genisteïne, formononetine en coumestrol. De eerste vier stoffen komen in bijvoorbeeld sojameel voor in concentraties van enkele honderden mg tot 1 g/kg meel. Coumestrol komt in verse zaailingen in tientallen mg/kg voor, in gedroogde bonen in enkele mg/kg (Ald97, Pri85). In rode klaver zijn de belangrijkste fyto-oestrogenen biochanine A en formononetine, in luzerne is dat coumestrol.

De oestrogenenconcentratie in soja hangt sterk af van het deel van de plant en de wijze waarop de soja is bewerkt. De zaailingen en het zaad van de sojaplant bevatten de hoogste concentraties. De olie die uit de zaden wordt geperst, bevat nauwelijks fyto-oestrogenen. In de eiwitrijke fractie die voor veevoeders wordt gebruikt, zijn de concentraties hoog.

5.5.2 *Metabolisme van isoflavonoïden bij landbouwhuisdieren.*

Bij herkauwers wordt genisteïne grotendeels omgezet en vervolgens uitgescheiden als p-ethylfenol dat, voor zover bekend, geen oestrogene activiteit bezit. Van het genisteïne wordt slechts enkele procenten in de urine terug gevonden.

In monogastrische zoogdieren (dieren met één maag) en in herkauwers worden formononetine, daidzeïne en daidzin gedeeltelijk omgezet in equol. Andere omzettingen zijn wel mogelijk, maar kwantitatief onbelangrijk. Zowel de uitgangsstoffen als het omzettingproduct equol bezitten oestrogene activiteit. De uitscheiding van equol in urine vari-

eert bij verschillende diersoorten tussen 20 en 70% (Lun95, Shu70) van de toegediende hoeveelheden. De rest bestaat uit de genoemde uitgangsstoffen.

5.5.3 *Emissie en lotgevallen*

Bij een jaarlijks gebruik van ongeveer twee miljoen ton soja in diervoeders is de dagelijkse emissie van fyto-oestrogenen ongeveer 5000 kilogram (zie 5.5.1). De consumptie van sojaproducten door de mens, die ook aanzienlijk kan zijn, is daarbij niet inbegrepen. Over de afbraak van deze stoffen in het milieu is nauwelijks iets bekend. Dat de metabooliet equol in zoogdieren niet verder wordt gemetaboliseerd, zou er op kunnen wijzen dat deze stof vrij persistent is. Na toevoeging van formononetine aan een niet steriele bodem bleek na één week nog 60% aanwezig te zijn (Oza97). Welke omzettingen plaatsvonden, is niet vastgesteld. Gezien de chemische structuur van equol is te verwachten dat de stof mobiel is in de bodem. Het is mogelijk dat binding aan humuszuren de mobiliteit beperkt. De gegevens over de lotgevallen van de genoemde stoffen zijn echter te beperkt om uit de geschatte emissiewaarden concentraties in oppervlaktewater af te leiden.

5.5.4 *Effecten*

De fyto-oestrogenen genisteïne, formononetine en daidzeïne en de metabooliet equol bezitten *in vitro* een affiniteit met de oestrogeenreceptor die een factor 1000 tot 100 000 kleiner is dan die van 17 β -oestradiol. Een bindingsaffiniteit op zichzelf zegt niet zoveel over effecten die *in vivo* optreden. Van de genoemde fyto-oestrogenen is bekend dat de werking bij zoogdieren vooral berust op een verstoring van het hormoonmetabolisme (Ald97, Bak95). Er is aanmerkelijk minder bekend over de gevolgen van blootstelling aan fyto-oestrogenen voor aquatische organismen. Injectie van genisteïne, equol of coumestrol, leidde bij de steur (*Acipenser baeri*) tot de productie van vitellogenine (Pel91). Bij injectie van formononetine was dit niet het geval. Bij de poliep *Hydra vulgaris* leidde blootstelling aan 3 microgram genisteïne per liter tot afwijkingen in de ontwikkeling (Per94). Of hormoonontregeling daaraan ten grondslag ligt, is onduidelijk.

5.6 **Conclusies**

Concentraties van natuurlijke en synthetische hormonen gemeten in de Rijn, de Maas en de Schelde liggen in een orde van grootte waarbij — zij het subtiele — effecten op vissen zijn te verwachten. Het is daarom aannemelijk dat genoemde stoffen mede verantwoordelijk zijn voor de bij vissen in de grote rivieren en in de kustgebieden en in-vitrotests geconstateerde effecten. Het is ook aannemelijk dat de concentraties in sloten in gebieden met intensieve veeteelt aanzienlijk hoger zijn dan de voornamelijk in de nabijheid van ste-

delijke gebieden gemeten concentraties in het oppervlaktewater. De geschatte emissies van oestrogenen door landbouwhuisdieren zijn daar een veelvoud van de door de mens uitgescheiden hoeveelheden. Er is echter veel onzekerheid over de lotgevallen van de oestrogenen die door landbouwhuisdieren in het milieu worden gebracht. Omdat er blijkens de — beperkte — literatuurgegevens aanwijzingen zijn dat natuurlijke oestrogenen vrij persistent kunnen zijn (enkele dagen of aanzienlijk langer) en bovendien mobiel, vindt de commissie het aannemelijk dat in sloten concentraties van natuurlijke hormonen voor kunnen komen die hoog genoeg zijn voor effecten op aquatische organismen.

Hoewel de emissie van fyto-oestrogenen vrij groot is, is er te weinig bekend over hun lotgevallen in het milieu om concentraties in oppervlaktewater te kunnen schatten. Bovendien zijn er ook voor een risicoschatting te weinig gegevens over de effecten van deze stoffen. Omdat waterplanten — voor zover de commissie bekend — geen fyto-oestrogenen produceren, is het denkbaar dat aquatische organismen relatief gevoelig zijn voor deze stoffen.

Beantwoording van de vragen

Er zijn vier (deel)vragen aan de commissie ter beantwoording voorgelegd. Twee van deze vragen hebben betrekking op de huidige wetenschappelijke kennis, de beide andere veel-
eer op de wijze waarop die kennis zou kunnen worden vergroot. Mede terwille van de
overzichtelijkheid en de conceptuele samenhang in het voorliggende advies heeft de com-
missie zich in de voorgaande hoofdstukken uitsluitend gericht op de huidige wetenschap-
pelijke kennis. Dit betekent dat de in dit hoofdstuk te formuleren antwoorden op de beide
eerstbedoelde vragen aanmerkelijk beknopter kunnen zijn dan die op de twee andere.

Vraag 1

Is de Gezondheidsraad van mening dat milieuverontreiniging met stoffen die het endo-
criene systeem beïnvloeden een ernstig gevaar vertegenwoordigt voor populaties en als
gevolg daarvan mogelijk voor ecosystemen?

Antwoord

Volgens de commissie zijn er voldoende redenen voor bezorgdheid over de aanwezigheid
van stoffen in vooral het aquatische milieu die de geslachtshormoonhuishouding van or-
ganismen kunnen ontregelen en daardoor het voortbestaan van soorten in ecosystemen in
gevaar kunnen brengen. Bij sommige soorten zijn effecten op individuen en populaties
daadwerkelijk aangetoond of aannemelijk. De gevolgen voor gehele ecosystemen zijn on-
bekend. Aangezien er maar zeer beperkt gericht onderzoek is verricht naar de gevolgen

van de in het milieu aanwezige hormoonontregelaars, is het goed mogelijk dat de hormoonverstoring wijd verspreid voorkomt bij gewervelden en vooral ongewervelden.

Onder de mogelijk met de aanwezigheid van dergelijke stoffen in het milieu geassocieerde schadelijke effecten neemt interseksualiteit een prominente plaats in (waargenomen bij sommige vissen en slakkensoorten in de Noordzee). Het is methodologisch echter zeer moeilijk om een geconstateerde teruggang in een populatie te relateren aan een bepaalde stof (of stoffen), aangezien ook andere factoren hieraan debet kunnen zijn. Voor bepaalde slakkensoorten is duidelijk dat populaties in de kustgebieden van de Noordzee in mindere of meerdere mate door één enkele stof (tributyltin) zijn aangetast. Het is aannemelijk dat ook andere soorten die zich in die voedselketen bevinden daar de gevolgen van ondervinden.

De ontregeling van de reproductie van vogels en zeehonden die in de afgelopen decennia is geconstateerd, lijkt landelijk gezien grotendeels tot het verleden te behoren. In sterk vervuilde gebieden zoals de sedimentatiegebieden van de Rijn en de Maas zijn echter nog steeds effecten te constateren. De commissie wijst erop dat de herintroductie van soorten die mede ten gevolge van de aanwezigheid van deze stoffen uit Nederland zijn verdwenen — zoals de otter — in deze gebieden problemen zal kennen vanwege de heersende concentraties van hormoonontregelende stoffen.

Vraag 2

Zo ja, is reeds aan te geven welke stoffen, c.q. bronnen, in dit opzicht primair de aandacht verdienen?

Antwoord

Van de 77 in de wetenschappelijke literatuur in dit opzicht genoemde pesticiden en industriële stoffen waarop de commissie zich gericht heeft, bestempelt zij er 13 met hoge mate van waarschijnlijkheid als hormoonontregelaar. Van nog eens 21 stoffen acht zij aanwijzingen in deze richting aanwezig, maar er is onvoldoende kennis over de effecten of over de milieuconcentraties. Voor de resterende 43 stoffen — waarvan sommige overigens niet in het milieu in Nederland zijn aangetoond — kan zij geen uitspraken doen. Bij de 34 stoffen die de commissie als (potentiële) hormoonontregelaars heeft geclassificeerd, gaat het om alkylfenolen, organochloor-, organobroom- en organotinverbindingen, ftalaten en triazines. De commissie beveelt aan om in eerste instantie de aandacht op deze stoffen te richten, behoudens een aantal van de organochloorverbindingen waarvoor al succesvol beleid in uitvoering is. Zij wijst erop dat door de snel voortschrijdende kennis het zojuist gestelde slechts een momentopname is. Juist doordat de laatste jaren een aantal stoffen is onderzocht op hormoonontregelende werking is de lijst al sterk gegroeid.

Gezien de grote hoeveelheid stoffen die de komende jaren nog onderzocht gaan worden, ligt het in de rede dat het aantal stoffen dat als (potentiële) hormoonontregelaar is aan te merken nog sterk zal toenemen.

Naast de pesticiden en industriële stoffen heeft de commissie natuurlijke en synthetische hormonen in beschouwing genomen. Zij bestempelt natuurlijke oestrogenen (bijvoorbeeld 17β -oestradiol), orale anticonceptiva (bijvoorbeeld 17α -ethinyl- oestradiol) en fyto-oestrogenen (bijvoorbeeld genisteïne) als waarschijnlijke hormoonontregelaars in Nederland.

De commissie wijst industriële productie, RWZI's, landbouw, grensoverschrijdende rivieren en atmosferische depositie aan als belangrijkste bronnen van industriële hormoonontregelaars. Voor de natuurlijke hormonen zijn de belangrijkste bronnen de veehouderij (het gaat hier vooral om emissie van de door vee endogeen geproduceerde stoffen), landbouw (plantaardige oestrogenen — vooral via het gebruik van soja in diervoeders) en het gebruik van anticonceptiva. Bij de fyto-oestrogenen is nog onduidelijk hoe het gesteld is met de persistentie en de mobiliteit in het milieu.

Gezien de mogelijke bronnen beveelt de commissie aan om de monitoringsprogramma's vooral te richten op de zoute, brakke en zoete wateren (vooral kleine sloten) en mest. Ten aanzien van natuurlijke hormonen verdienen vooral kleine sloten en mest de hoogste prioriteit.

Vraag 3

Is het mogelijk om via een programma van metingen (monitoring) na te gaan of effecten op de geslachtshormoonhuishouding van dieren optreden?

Antwoord

Er is nog geen beproefde aanpak voor het systematisch meten van effecten van stoffen die de geslachtshormoonhuishouding van dieren in het veld verstoren. Het is volgens de commissie het meest effectief om monitoringsprogramma's die op dit moment in Nederland worden uitgevoerd uit te breiden met een aantal 'tools' gericht op het opsporen van deze effecten. Een eerste aanzet voor het uitvoeren van effectmonitoring voor oestrogen-actieve stoffen in het Nederlandse watermilieu is onder auspiciën van Rijkswaterstaat in uitvoering. Begin 1999 is het Landelijke Onderzoek Oestrogene Stoffen (LOES) van start gegaan. Daarnaast zijn er onderzoekprogramma's die zich richten op de effecten van bekende hormoonontregelende stoffen op natuurlijke zoogdierpopulaties en op oestrogen effecten in vissenpopulaties.

Populaties en individuen

Een eerste aanwijzing voor een verstoring van de reproductie van populaties is een afwijkende leeftijdsopbouw en geslachtsverdeling. Voor individuen is de grootte van de geslachtsorganen bepalend. Bij individuen kunnen ook de secundaire geslachtskenmerken, de groei en de ontwikkeling worden beschouwd, met behulp van anatomisch, uitwendig en histologisch onderzoek. Histologisch onderzoek aan de lever en de schildklier is aan te raden. Bij individuen kunnen ook diverse klinisch-chemische bepalingen plaatsvinden. In recent onderzoek is het nut aangetoond van het vaststellen van de volgende biochemische parameters die verband houden met reproductiestoornissen: vitellogenineproductie, steroidhormoonconcentraties, schildklierhormoonconcentraties en vitamine A-gehaltes.

Effecten bij populaties zijn het makkelijkst op te sporen indien er een gradiënt in de concentraties van stoffen in het milieu bestaat. Kennis over de natuurlijke achtergrondniveaus van diverse variabelen is daarbij noodzakelijk. Behalve onder meer historisch onderzoek naar sekseratio's, kan ook een nieuwe beoordeling van gearchiveerde monsters op nieuwe toxicologische eindpunten zinvol zijn.

Verplaatsing van individuen

Een van de tot op heden meest succesvolle methoden voor het monitoren van effecten van hormoonontregelende stoffen berust op het verplaatsen van dieren; dieren (slakken, oesters, vissen) uit schone gebieden worden in kooien uitgezet op eventueel gecontamineerde plaatsen. In Nederland worden onder gecontroleerde omstandigheden unieke karper-in-teeltlijnen gekweekt waarvan de nakomelingen naar keuze 100% mannelijk of 100% vrouwelijk kunnen zijn (Bon98, Bon99). Doordat het geslacht vooraf bekend is zijn deze dieren geschikt voor het monitoren van geslachtshormoonversturende effecten (Gim96). Het gebruik van verplaatste dieren heeft een aantal voordelen ten opzichte van het onderzoek van ter plaatse in het wild levende dieren. Ze kunnen worden ingezet dichtbij de verontreinigingsbron, het geslacht kan vooraf worden bepaald, en de ernst en progressie van de afwijking zijn goed te volgen. Hierdoor kan de omvang van het probleem goed in beeld worden gebracht. Ook biedt deze werkwijze mogelijkheden om genomen maatregelen op hun effectiviteit te toetsen.

In-vitrotests en transgene vissen

De commissie wijst erop dat in-vitrotests geen ondubbelzinnig uitsluitel geven over de te verwachten effecten op de reproductie. Hiervoor zijn in-vivotests nodig. De beschikbare in-vitrotests zijn vooral ontwikkeld voor het opsporen van oestrogene en soms ook anti-oestrogene effecten. Elk van deze tests is toegesneden op bepaalde aspecten van de ef-

fectketen die tot oestrogene effecten leidt. Zo zijn er receptortests met cellen die via een reporter-gen eenvoudig laten zien of de oestrogeenreceptor door een stof wordt geactiveerd of (bij sommige systemen) geremd. Een voorbeeld hiervan is een gistcel-systeem (de zogenoemde YES-assay (Rou96)) uitgerust met zowel een humane oestrogeen-receptor als een bijbehorend reporter-gen. Nadeel van deze test is dat zij geen informatie geeft over anti-oestrogene werking en geen mogelijkheid heeft tot bioactivatie van verdachte stoffen. Ook kunnen grote en vrij hydrofobe stoffen de gistcelwand niet passeren waardoor deze stoffen geen respons kunnen geven (Leg99a). Een ander voorbeeld is de ER-CALUX-assay waarbij gebruik wordt gemaakt van een humane cellijn waarin zowel de natuurlijke oestrogeenreceptor aanwezig is als enige biotransformatiecapaciteit. Als reporter wordt luciferase gebruikt. Met dit testsysteem kan men zowel de antioestrogen- als de oestrogene werking van stoffen indiceren, zonder en met biotransformatie. Vanwege de andere structuur van zoogdiercellen kunnen zowel hydrofobe als hydrofiele stoffen de celwand passeren (Leg99a).

In-vitrotests met primaire celcultures van endometriumcellen houden (gedeeltelijk) rekening met mogelijke actieve biotransformatieproducten in de te meten monsters. De zogeheten E-screen (MCF7-assay (Sot92)) is gebaseerd op de oestrogeenafhankelijke vermeerdering (proliferatie) van borstkankercellen. Deze tests zijn echter niet zeer specifiek omdat ook andere dan hormoonactieve stoffen celdeling kunnen stimuleren of juist remmen.

Bij tests op het vermogen van een stof tot de inductie van dooieriwitsynthese (vitellogenine-synthese) worden vooral primaire celcultures van vissenlevers gebruikt. De tests zijn niet makkelijk uitvoerbaar, maar de specificiteit is hoog.

Zeer onlangs is in Nederland een transgene (genetisch gemanipuleerde) zebra vis ontwikkeld die goed bruikbaar lijkt voor het monitoren van effecten van oestrogene stoffen in het milieu. Bij deze vissen is een oestrogeen-reportergen ingebouwd (luciferase). Op een snelle manier kan een oestrogene respons gemeten worden in fysiologisch relevante oestrogeen-doelwit-organen zoals de mannelijke en vrouwelijke gonaden. De respons wordt mede bepaald door alle in het dier aanwezige metabole stappen en kan daardoor een goede voorspellende waarde hebben voor de hormoonontregelende werking van stoffen in het milieu (Leg99b).

Chemische monitoring

Om in het veld waargenomen effecten te kunnen verklaren, is het nodig gebiedsafhankelijke relevante verontreinigingen te analyseren. Karakterisering van de verdachte chemicaliën kan dan plaatsvinden door middel van 'toxiciteit, identificatie en evaluatie (TIE)' procedures. Behulpzaam daarbij is de scheiding van een milieumonster in een aantal polaire tot apolaire fracties met behulp van *high pressure liquid chromatography* (HPLC).

Alleen de fracties die vervolgens in in-vitrotests positief scoren, worden nader geanalyseerd. Deze procedure is succesvol toegepast in Engeland (Des98).

Naar de mening van de commissie is het beschikbare instrumentarium voor monitoring niet ruim maar wel voldoende. Het is van belang om te meten bij soorten die de verschillende trofische niveaus vertegenwoordigen, zoals zoogdieren, vogels, reptielen, amfibieën, vissen en ongewervelden. De indicatorsoorten die volgens de commissie het meest geschikt zijn voor Nederland staan vermeld in bijlage D. Voorwaarde bij de keuze van soorten is dat de populatiedynamiek, de leefwijze, het gedrag en de fysiologie (endocrinologie) van de soorten goed bekend moeten zijn en dat men via bruikbare referentiepopulaties en achtergrondgegevens een goed beeld kan krijgen van het 'normale functioneren'. Een deel van deze informatie ontbreekt nog. Vooral over de hormoonhuishouding bij ongewervelden is onvoldoende bekend.

Monitoringstrategie

Ontrefeling van complexe multicausale verbanden en het zichtbaar maken van monocausale verbanden ten aanzien van geslachtshormoonontregelende stoffen vereist een *weight of evidence* analyse van de bewijskracht van de onderzoeksresultaten. De specifieke causaliteitscriteria voor zo'n analyse zijn afkomstig van Hill en Fox, en zijn voor hormoonontregelende stoffen aangepast door onder anderen Vethaak (Fox91, Hil65, Vet97). Door het verzamelen van bewijzen voor correlaties met een veelheid aan verschillende technieken wordt de causaliteit steeds waarschijnlijker gemaakt. Het gaat hier niet alleen om onderzoek in het veld, maar ook om laboratorium- en semiveldonderzoek.

Vaak is een deel van de kennis al aanwezig en is het niet nodig om de gehele batterij van monitoringsmogelijkheden in te zetten. De commissie benadrukt dat monitoring een iteratief proces vereist waarbij door samenwerking tussen diverse disciplines steeds wordt onderzocht welke strategie de meest effectieve is. Zo kan bijvoorbeeld met een beperkte monitoring worden volstaan als hormonale ontregeling wordt vermoed, of als men wil nagaan of er sprake is van specifieke hormonale verstoring in een verdacht milieu of een gevoelig ecosysteem. Deze beperkte monitoring zou bijvoorbeeld een evaluatie van het reproductievermogen en van uitwendige karakteristieken van belangrijke soorten kunnen omvatten. Indien een hormonale verstoring is vastgesteld, ligt een meer uitgebreide monitoring voor de hand, waarbij op individu- en populatieniveau een groot aantal karakteristieken wordt gemeten, of een monitoring gericht op specifieke eindpunten in geschikte en gevoelige sentinelloorten.

Ten slotte zou een validatie van de veldwaarnemingen moeten plaatsvinden door bijvoorbeeld toepassing van in situ bioassays met gehele organismen of blootstelling in experimentele situaties.

Vraag 4

Kan worden aangegeven welke parameters meegenomen moeten worden bij de afleiding van toxicologische advieswaarden voor hormoonontregelende stoffen en is er iets te zeggen over de gevoeligheid van deze parameters voor hormoonbeïnvloeding ten opzichte van de klassieke parameters voor de risicobeoordeling?

Antwoord

De klassieke parameters en bijbehorende tests die gebruikt worden voor de afleiding van toxicologische advieswaarden zijn niet toegesneden op de risicobeoordeling voor hormoonontregelende stoffen. Binnen diverse internationale gremia (OECD, EPA en EC) wordt momenteel onderzocht of bestaande testprotocollen in die zin aan te passen zijn voor de evaluatie gericht op hormoonontregelende stoffen. Velen (OECD-EDTA; US-EPA-EDSTAC; EU-CSTEE) staan een *weight of evidence* benadering voor, waarbij een getrapte wijze van beoordeling van de mogelijk hormoonontregelende werking van een stof wordt nagestreefd, gaande van in-vitrotests (receptorbinding, gentranscriptie, metabole enzymen) via kortdurende in-vivotests (uterotrope werking, hormoonhuishouding, vitellogenine-inductie) naar langdurige tweegeratieproeven, waarin de effecten tijdens embryonale/foetale ontwikkeling en de doorwerking hiervan met betrekking tot het voortplantingsvermogen van nakomelingen worden onderzocht. Dergelijke uitgebreide testprotocollen met ratten zijn al geruime tijd in gebruik voor de beoordeling van gezondheidsrisico's voor de mens in relatie tot de toelating van nieuwe stoffen. Een belangrijke tekortkoming van deze standaard aanpak is de korte periode waarin blootstelling plaatsvindt. Men zal effecten van een stof missen indien het meest gevoelige levensstadium buiten die blootstellingsperiode ligt.

Voor de afleiding van ecotoxicologische advieswaarden worden over het algemeen minder subtiele parameters als eindpunten gebruikt, zoals invloed op groei, sterfte en reproductievermogen. De reden hiervoor is, dat voor de mens een bescherming op individueel niveau wordt nagestreefd, terwijl in de ecotoxicologie een bescherming op populatieniveau als afdoende geldt.

De commissie meent dat de huidige eindpunten de hormoonontregelende werking van stoffen vaak wel aan het licht kunnen brengen als de tests voor stoffen plaatsvinden met representatieve en gevoelige organismen waarbij de blootstelling enkele generaties beslaat. De huidige tests die voor de afleiding van ecotoxicologische advieswaarden in gebruik zijn, voldoen hier niet aan. Tests die wel aan genoemde voorwaarden voldoen, zullen zeer kostbaar zijn. Steeds is het noodzakelijk om de in het veld gevonden effecten te kunnen relateren aan bepaalde stoffen. Derhalve is er volgens de commissie een grote be-

hoeft aan de ontwikkeling van testprotocollen die enerzijds voorzien in een langere blootstellingsduur, en waarin blootstelling vooral ook in de kritische fase plaatsvindt, terwijl anderzijds ook eindpunten worden beschouwd die voldoende discriminerend zijn voor een hormoonontregelende werking.

Voor onderzoek met vissen zijn de bestaande testprotocollen vaak te kortdurend en de eindpunten nog te beperkt, terwijl de blootstelling veelal niet plaatsvindt tijdens de levensstadia die geacht worden het meest gevoelig te zijn voor geslachtshormoonontregelende stoffen. Voor amfibieën zijn er, behalve voor de hormoon-gemedieerde metamorfose-effecten, geen testprotocollen voor geslachtshormoonontregelende werking.

Het grootste hiaat is het gebrek aan testprotocollen voor onderzoek aan ongewervelde dieren. Dit komt vooral door het ontbreken van inzicht in de normale werking van geslachtshormoonsystemen bij ongewervelden. De vraag is in hoeverre de watervlo (*Daphnia magna*) die in de huidige tests wordt gebruikt voldoende representatief is voor andere ongewervelden. Onder laboratoriumcondities vindt bij dit dier namelijk de voortplanting meestal asexueel plaats (parthogenese), terwijl juist de seksuele fase waarschijnlijk gevoeliger is voor hormoonontregelende stoffen. Goede protocollen voor ongewervelden zijn van groot belang aangezien het hier gaat om — zoals de commissie al eerder opmerkte — 95% van de diersoorten in een doorsnee ecosysteem. Zij vormen dan ook een belangrijk deel van de basis van de voedselketen. Bovendien zijn juist veel bestrijdingsmiddelen gericht op het ontregelen van de hormoonhuishouding van deze dieren. De commissie verwijst voor een uitgebreide bespreking van mogelijke eindpunten en de aanpassing van huidige testprotocollen naar de resultaten van een tweetal internationale workshops van experts van de OECD, EC en de SETAC (EMW97, EDI99).

Voor de gevoeligheid voor hormoonbeïnvloeding geldt in het algemeen dat parameters die indicatief zijn voor hormoongemedieerde moleculaire of biochemische veranderingen het meest gevoelig zijn, gevolgd door cellulaire en weefselveranderingen en uiteindelijk functionele fysiologische veranderingen. Ook zijn kenmerken die gemeten worden in de embryonale/foetale levensstadia gevoeliger dan variabelen in volwassen levensfasen. Dit heeft onder meer te maken met het relatief geringe vermogen van een organisme in de vroege levensfase om verstoringen via homeostase tot op zekere hoogte op te kunnen vangen. Ook zijn foetale weefsels vaak gevoeliger voor verstoringen vanwege de buitengewone differentiatie- en proliferatiesnelheden waardoor verstoringen tijdens de embryonale/foetale ontwikkeling onherstelbare schade veroorzaken.

Omdat de meeste testprotocollen voor hormoonontregelende stoffen zich nog in een experimenteel stadium bevinden, is het momenteel niet mogelijk om een enigszins definitieve opsomming van variabelen en hun gevoeligheden te geven.

Den Haag, 22 juli 1999,
voor de commissie

drs JW Dogger,
secretaris

dr AD Vethaak,
voorzitter

Literatuur

-
- Adl76 Adlercreutz H, Martin F. Oestrogen in human pregnancy faeces. *Acta Endocrinologia* 1976; 83: 410-9.
- Adl97 Adlercreutz H en Mazur W. Phyto-oestrogens and western diseases. *Annals of Medicine* 1997; 29: 95-120.
- Agu95 Aguilar A en Borrell A. Pollution and harbour porpoises in the eastern North Atlantic. In: A. Björge & G.P. Donovan (eds), *Biology of the Phocoenids*. Rep Int Whal Commn 1995; Special Issue 16, 231-42.
- All91 Allan RJ, Ball AJ, Cairns VW, e.a. Toxic chemicals in the Great Lakes and associated effects. Environment Canada, Department of Fisheries and Oceans and Health and Welfare Canada, Ottawa 1991; 2. Environment Canada, Department of Fisheries and Oceans and Health and Welfare Canada, Ottawa.
- All97 Allen Y, Thain J, Matthiessen P, Scott AP, Haworth S en Feist SW. A survey of oestrogenic activity in UK estuaries and its effects on gonadal development of the flounder (*Platichthys flesus*) ICES CM 1997/U:01: 13 pp + figs.
- And96 Anderson MJ, Miller MR and Hinton DE. In vitro modulation of 17 β -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquat Toxicol* 1996; 34: 327-50.
- Ash95 Ashfield LA, Pottinger TG en Sumpter JP. Exposure of Rainbow Trout to Alkylphenolic Compounds: Effects on Growth and Reproductive Status. Presented at the SETAC-UK meeting on Environmental Endocrine Disruptors and Oestrogen Mimics, Liverpool, 6th December 1995.
- Atk87 Atkinson S en Williamson P. Measurement of urinary and plasma estrone sulphate concentrations from pregnant sows. In: Australia; University Murdoch. *Domestic animal endocrinology* 1987; 4(2): 133-8.
- Bak95 Baker ME Endocrine activity of plant derived compounds: an evolutionary perspective. *Proceedings Society Experimental Biology and Medicine* 1995; 208: 131-8.
-

- Bam84 Bamberg E, Choi HS, Möstl E, e.a. Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares (short communications). *Equine vet J* 1984; 16(6): 537-9.
- Bau97 Bauer B, Fioroni P, Schulte-Oehlmann U, e.a. The use of *littorina littorea* for tributulin (TBT) effect monitoring-Results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. *Environmental Pollution* 1997; in press.
- Bél87 Béland PR, Michaud R en Martineau D. Recensements de la population de belugas du Saint-Laurent en 1985 par embarcations. *Rapp Techn Can Sci Halieut Aquat* 1987; No 1545.
- Bel90 Bellward GD, Norstorm RJ, Whitehead PE, e.a. Correlation of polychlorinated dibenzodioxin levels with hepatic mixed function oxidase induction in great blue herons. *Chemosphere* 1990; 20: 1087-90.
- Bel99 Belfroid AC, van der Horst A, Vethaak AD, e.a. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci Total Environ* 1999; 225: 101-8.
- Ber85 Bergman A en Olsson M. Pathology of Baltic ringed seal and grey seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finn Game Res* 1985; 44: 47-62.
- Ber94a Berg M van den, Craane LHJ, Sinnige T, e.a. Biochemical and toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in the cormorant (*Phalacrocorax carbo*) after in ovo exposure. *Environ Toxicol Chem* 1994; 13: 803-16.
- Ber94b Berg M van den, de Jongh J, Poiger H, Olson JR. The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs), and their relevance for toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicology* 1994; 24: 1-74.
- Bis91 Bishop CM en Hall MR. Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis; AFRC Research group on photoperiodism an reproduction, department of Zoology, universiteit van Bristol, Bristol BS8 1UG; accepted 16 july 1990. *J Zool Lond* 1991; 224: 649-68.
- Bit68 Bitman J, Helen C, Cecil Susan J. Harris en Fries GF. Estrogenic Activity of o,p'-DDT on the Mammalian Uterus and Avian Oviduct.. *Science* 1968; 162: 161-2.
- Bit70 Bitman J en Cecil HC. Estrogenic Activity of DDT Analogs and Polychlorinated Biphenyls. *J Agr Food Chem* 1970; 18(6): 1108-12.
- Boe84 Boer de MH. Reproduction decline of harbour seals: PCB's in food and their effect on mink. Annual report. Rijksinstituut voor Natuurbeheer, Leersum, The Netherlands 1984; pp 7786.
- Boe93 Boer de J and Wester PG. Determination of toxaphenene in human milk from Nicaragua and in fish and marine mammals from the north-eastern Atlantic and the North Sea. *Chemosphere* 1993; 27: 1879-90.
- Boe98 Boer deJ, Wester PG, Klamer HJC, Lewis WE, Boon JP. Do flame retardants threaten ocean life. *Nature* 1998; 394: 28-9.
- Boh82 Bohemen van ChG, Lambert JGC, Goos HJTh, van Oordt PGWJ. Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinology* 1982; 46: 81-92.
- Bon98 Bongers ABJ, Sukkel M, Gort G, e.a. Clones of common carp in experimental animal research. *Laboratory Animals* 1998; 32: 1-15.
-

- Bon99 Bongers ABI, Zandieh Doulabi B, Richter CJJ, e.a. Viable androgenetic YY genotypes of common carp, *Cyprinus carpio*. 1999; 90(1): 195-8.
- Boo98 Boon JP, Schanke Av, Roex E, Sleiderink HM, e.a. In vitro biotransformation of chlorobornanes (Toxaphene) in marine mammals and birds. Possible consequences for bioaccumulation and genotoxicity. *Compara Bio Physiology C* 1998; 121: 385-403.
- Bos92 Bosveld ATC, van den Berg M, Theelen RMC. Assessment of the EROD inducing potency of eleven 2,3,7,8- substituted PCDD/Fs and three coplanar PCB's in the chick embryo. *Chemosphere* 1992; 25: 911-6.
- Bos95 Bosveld ATC, Gradenr J, Murk AJ, e.a. Effects of PCDDs, PCDFs and PCBs in Common tern (*Sterna hirundo*) breeding in estuarine and coastal colonies in the Netherlands and Belgium. *Environ Toxicol Chem* 1995; 14: 99-115.
- Bri97 Brink van den P J, Vethaak AD. Multivariate analysis of the workshop. Presented at the workshop on the use and validation of biomarkers for the estuarine and marine environments (1996/1997), 9-11 November 1997 Middelburg, The Netherlands. DLO-Staring Centrum, Wageningen, Interne Mededelingen 474.
- Bro89 Brouwer, A., Reijnders, P.J.H. & Koeman, J.H. Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid hormone deficiency in the common seal (*Phoca vitulina*). *Aq Toxicol* 1989; 15: 99-106.
- Cam92 Cameron P, Berg J, Dethlefsen V, van Westernhagen H. Developmental defects in pelagic embryos of several flatfish species in the southern North sea Neth. *J Sea Res* 1992; 29(1-3): 239-256.
- Car62 Carson R. Silent Spring. Houghton Mifflin, Boston 1962.
- Con97 Connor K, Ramamoorthy K, Moore M, Mustain M, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A and Balaguer P. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCB's) as estrogens and antiestrogens: structure - activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 145: 111-23.
- CST99 Vos JG, Dybing E, Greim HA, e.a. CSTE Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicity Test Methods. Report of the Working Group on Endocrine Disrupters of the Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) of DG XXIV, Consumers Policy and Consumer Health Protection 1999; 1-96.
- Dal97 Dalsenter PR, Fagi AS, Webb J, Merker HJ en Chahoud I. Reproductive Toxicity and Toxicokinetics of Lindane in the Male Offspring of Rats Exposed during Lactation. *Hum Exp Toxicol* 199; 7 16: 146-53.
- Del73 Deling RL, Gilmartin WG and Simpson JG. Premature births in Californian sealions: association with high organochlorine pollutant residue levels. *Science* 1973; 181: 1168-70.
- Des89 Desaulniers DM en Goff AK. Reproductive hormone concentrations in faeces during the oestrous cycle and pregnancy in cattle (*Bos taurus*) and muskoxen (*Ovibos moschatus*). *Can J Zool* 1989; 67: 1148-54.
- Des98 Desbrow C, Routledge E, Brighty GC, e.a. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 1998; 32: 1549-58.
- Des98 Desbrow C, Routledge E, Brighty GC, Sumpter J.P, Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 1998; 32: 1549-58.
-

- Dir95 Dirksen S, Boudewijn TJ, Slager LK, Mes RG, van Schaick MJ en de Voogt P. Reduced breeding success of cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) in relation to persistent organochlorine pollution of aquatic habitats in The Netherlands. *Environ Pollut* 1995; 88(2): 119-32.
- Edg71 Edgerton LA, Erb RE, Harington RB. Metabolites of progesterone and estrogen in domestic sow urine. *J anima sci* 1971; 32: 936-942.
- EDI99 Matthiessen P, Reynoldson T, Billingham Z, e.a. Field monitoring for endocrine disruption in invertebrates. In: the International SETAC Workshop on Endocrine Disruption in Invertebrates: Chapter 4. Endocrinology, Testing and Assessment (EDIETA) P. De Fuhr, et al., (eds) (in press).
- Ell90 Ellis DV, Pattisina LA. Widespread neogastropod imposex; a biological indicator of global TBT contamination? *Mar Pollut Bull* 1990; 21: 248-53.
- EMW97 SETAC-Europe, OECD, EC expert workshop om endocriene modulators and wildlife: Assessment and testing. Veldhoven, The Netherlands, 10-13 april 1997. SETAC-Europe, Brussels.
- Fer87 Feral C, Gall M, Martin C, Lengronne C. The neuroendocrine mechanism responsible for sexual inversion of the gonad in the protandrous hermaphroditic mollusc, *Crepidula fornicata* L. *Gen. Comp. Endocrinol* 1987, 65: 432-8.
- Fio91 Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E. The pseudohermaphroditism of prosobranchs: morphological aspects. *Zool Anz* 1991; 226: 1-26.
- Foa93 Foal S. An evaluation of the potential of gastropod imposex as a bioindicator of tributyltin pollution in Port Philip Bay, Victoria. *Mar Pollut Bull* 1993; 26: 546-52.
- Fot87 Fotsis T. The Multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS-II. Gractionation and quantitation of the main groups of estrogen conjugates. *J Steroid Biochem* 1987; 28: 215-26.
- Fox91 Fox GA. Practical Causal Inference for Ecoepidemiologists. *J Toxicol Environ Health* 1991; 33: 359-73.
- Fri98 Fries LLM, Pacovsky RS, Safir GR. Influence of phosphorus and formononetin on isozyme expression in de the *Zea mays*-*Glomus intraradices* symbiosis. *Physiologia plantarum* 1998; 103: 172-80
- Fry81 Fry DM en Kuehler Toone C. DDT-Induced Feminization of Gull Embryos. *Science* 1981; 213: 922-4.
- Fry95 Fry DM. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 165-71.
- Gag95 Gagnon MM, Bussieres D, Dodson JJ, Hodson PV. White sucker (*Catostomus commersoni*) growth and sexual maturation in pulp mill-contaminated and reference rivers. *Environ Toxicol Chem* 1995; 14: 317-27.
- Gib87 Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL en Burt GR. The use of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J Mar Biol Ass* 1987; 67: 507-23.
- Gil74 Gilbertson M. Pollutants in breeding herring gulls in the lower Great Lakes. *Canadian Field Naturalist* 1974; 88: 273.
- GR97a Gezondheidsraad: Commissie Hormoonontregelaars en de humane voortplanting en ontwikkeling. Hormoonontregelaars in de mens. Rijswijk: Gezondheidsraad, 1997: publicatie nr 1997/08.
- GR97b Gezondheidsraad: Beraadsgroep Ecotoxicologie. De voedselweb-benadering in de ecotoxicologische risicobeoordeling. Rijswijk: Gezondheidsraad, 1997: publicatie nr 1997/14.
-

- Gra97 Gray MA en Metcalfe CD. Induction of Testis-Ova in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to p-Nonylphenol. *Environ Toxicol Chem* 1997; 16(5): 1082-6.
- Gre96 Green N, van Raat P, Jones KC, de Voogt P. PCBs and their methylsulphonyl metabolites in the maternal blubber, milk, pup blubber and faeces of Grey seals. *Organohalogen Compounds* 1996; 29: 453-7.
- Gre97 Green N. A study of polychlorobiphenyls in the lactating Grey seal. Ph.D. thesis, University of Lancaster, Lancaster, UK 1997.
- Gui94 De Guise S, Lagace A en Béland P. True hermaphroditism in a St. Lawrence beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *J Wildl Dis* 1994; 30: 287-90.
- Hal93 Hallers-Tjabbes ten CC, Boon JP, Lindeboom HJ, e.a. Ecoprofile of the whelk, *Buccinum undatum* L. Rijkswaterstaat, Ministry of Transport, Public Works and the Environment, the Hague, 1993; 28.
- Hal94 ten Hallers-Tjabbes CC, Kemp JF en Boon JP. Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea; relation to shipping traffic intensities. *Mar Pollut Bull* 1994; 28: 311-3.
- Har96 Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Sumpter JP, Tylor T, Zaman N. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *J Environm Toxicol Chem* 1996; 15: 1993-2002.
- Har97 Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Routledge E, Rycroft R, Sumpter JP, Tylor T. Survey of Estrogenic activity in UK inland waters. *Environ Toxicol Chem* 1997; 16: 534-42.
- Hel80 Helle E. Lowered reproductive capacity in female ringed seals (*Phoca hispida*) in the Bothnian Bay, northern Baltic Sea, with special reference to uterine occlusions. *Ann Zool Fenn* 1980; 17: 147-58.
- Hil65 Hill AB. The environment and disease: association or Causation. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1965; 58: 295.
- Hir75 Hirose K. Reproduction in Medaka (*Oryzias latipes*). Exposed to Sublethal Concentrations of l-Benzenhexachloride (BHC). *Bull. Tokai Reg. Fish Res* 1975; Lab. 81: 139-49.
- Hof87 Hoffman DF, Rattner BA, Sileo L, Docherty D and Kubiak TJ. Embryotoxicity, teratogenicity, and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in forster's terns on Green Bay, Lade Michigan. *Environ Res* 1987; 42: 176-84.
- Hof97 Hoffmann B, Pinho-de TG en Schuler G. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105: 296-303.
- Hor94 Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M and Morita M. Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bron* in Japan; *J Mar Biol Ass UK* 1994; 74: 651-69.
- Hui95 Huisman M, Koopman-Esseboom C, Lanting CI, e.a. Neurological condition in 18-month-old children perinatally exposed to polychlorinated biphenyls and dioxins. *Early Hum Dev* 1995; 43: 165-76.
- Jac93 Jacobson JL and Jacobson SW. A 4-Year Followup Study of Children Born to Consumers of Lake Michigan Fish. *J Grea Lakes Res* 1993; 19: 776-83.
- Jam98 James HA, Waldock MJ, Kelly C, e.a. Unifying analytical Methods for the determination of oestrone, oestradiol and ethinyl oestradiol in water. WRc plc, Henley Road, Medmenham, Marlow, Buckinghamshire SL 7 2HD.

- Jan97 Janssen PAH, Lambert JGD, Vethaak AD, Goos HJT. Environmental pollution causes elevated concentrations of estrogens and vitellogenin in the female flounder (*Platichthys flesus*). *Aquat Toxicol* 1997; 39: 195-214.
- Jen77 Jensen S. Effects of PCB and DDT on mink (*Mustela vison*) during the reproductive season *Ambio* 1977; 6: 239.
- Job96 Jobling, Susan, David Sheahan, Julia A. Osborne, Peter Matthiessen and John P. Sumpter. Inhibition of Testicular Growth in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic Alkylphenolic Chemicals. *Environ Toxicol Chem* 1996; 15(2): 194-202.
- Job97 Jobling S, Nolan M, Brighty G, Tyler CR, Sumpter JP. British rivers contain a high proportion of intersex roach. Prospects of the European Environment beyond 2000. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Seventh Annual Meeting, Amsterdam, The Netherlands, April 6-10. Abstract book. Abstract 1997; T2-1.3: p 38 .
- Job98 Jobling S, Tyler CR, Nolan M, Sumpter JP. The identification of oestrogenic effects in wild fish. R&D Technical Report W119, Environment Agency, Bristol, UK 1998.
- Jur99 Jurgens M, Johnson AC, Williams RJ. Potential fate and behaviour of steroid estrogens in UK 1999. in press.
- Ken96 Kennedy SW, Lorenzen A and Norstrom RJ. Chicken embryo hepatocyte bioassay for measuring cytochrome P4501A-based 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalent concentrations in environmental samples. *Environ Science Technol* 1996; 30: 706-15.
- Kih92 Kihlstrom JE, Olsson M, Jemsen S, Johansson A, Ahlbom J, Bergman A. Effects of PCB and different fractions of PCB on the reproduction of the mink (*Mustel vison*.) *Ambio* 1992; 21: 563-69.
- Kim95 Kime David E. The Effects of Pollution on Reproduction in Fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1995; 5: 52-96.
- Koe69 Koeman JH, Ten Oever den Brauw MC and De Vos RH. Chlorinated Biphenyls in fish, mussels and birds from the river Rhine and the Netherlands Coastal area. *Nature* 1969; 221: 1126-8.
- Koe72 Koeman JH, Peters WHM, Smit CJ, Tjioe PS and de Goeij JJM. Persistent chemicals in marine mammals. *TNO Nieuws* 1972; 17: 570-8.
- Kra97 Kramer VJ, W.G. Helderich, A. Bergman, E. Klasson-Wehler and J.P. Giesy. Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 363-376 (1997).
- Lan95 Lang T, Damm U, Dethlefsen V. Changes in the sex ratio of North Sea dab (*Limanda limanda*) in the period 1981–1995 *ICES CM* 1995/G: 25 Ref E.
- Leb97 Leblanc J, Couillard CM, Brethes JCF. Modifications of the reproductive period in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached kraft pulp mill in the Miramichi estuary, New Brunswick, Canada. *Can J Fish Aquat Sci* 1997; 54: 2564–73.
- Lec96 Lech JJ, Lewis S K en Ren L. In Vivo Estrogenic Activity of Nonylphenol in Rainbow Trout. *Fundamental and Applied Toxicology* 1996; 30: 229-32.
-

- LeG83 LeGall S, Gall PL, Feral C. The neuroendocrine mechanism responsible for penis differentiation in *Crepidula fornicata*. In: Lever J, Boer HH (Eds) Molluscan neuro endocrinology. North-Holland, Amsterdam/Oxford/New York 1983: 169-73
- Leg97 Legler J, Murk AJ, Vethaak AD, Brouwer A. Determination of estrogen-like activity in sediment extracts using chemical activated luciferase gene expression (CALUX) assays (abstract). Presented at Seventh Annual Meeting of SETAC-Europe, Amsterdam, The Netherlands, April 6-10, 1997. P12.11, p. 257.
- Leg98 Legler J, den Brink C, Brouwer A, e.a. Assessment of (anti-)estrogenic compounds using a stably transfected luciferase reporter gene assay in the human T47-D breast cancer cell line. Short paper presented at 18th Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants (Dioxin 98), Stockholm, Sweden, August 17-21, 1998.
- Leg99a Legler J, van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, Saag van der PT, Vethaak AD, Burg B. Development of a stably transfected estrogen-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47-D breast cancer cell line *Toxicological Sciences* 199; 48: 55-66.
- Leg99b Legler J, e.a. Male reproductive organs are the main target for estrogens in transgenic zebrafish. submitted.
- Leo97 Leonards PEG. PCB's in mustelids: Analysis, food chain transfer and critical levels. Dissertation. Free University of Amsterdam 1997.
- Loe84 Loeber JG and van Velsen FL. Uterotropic effect of β -HCH, a Food Chain Contaminant. *Food Additives and Contaminants* 1984; 1: 63-6.
- Lye97 Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, McCormick D. Abnormalities in the reproductive health of flounder (*Platichthys flesus*) exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar Pollut Bull* 1997; 34: 34-41.
- Mas89 Mason CF. Water pollution and otter distribution: a review. *Lutra* 32: 97-113.
- Mat98 Matthiessen P, Allen Y, Allchin CR, e.a. Oestrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus*) from United Kingdom estuarine and marine waters. *Sci SerTech Rep CEFAS Lowestoft* 1998; 107: 48 pp.
- Men96 Mensink BP, Ten Hallers-Tjabbes CC, Kralt J, e.a. Assessment of imposex in the common whelk (*Buccinum undatum*) from the Eastern Scheldt, the Netherlands. *Mar Environ Res* 1996; 41: 315-25.
- Men97 Mensink BP, Van Hattum, Ten Hallers-Tjabbes, e.a. Tributyltin causes imposex in the common whelk (*Buccinum undatum*), Mechanism and occurrence. *Nioz internal report* 1997-6.
- Mer88 Mertens O en Van Zwol C. Purperslakken en organotin; een onderzoek naar effecten in de Oosterschelde en de Grevelingen. Nota GWAO-88.039 of the Tidal Waters Division, Rijkswaterstaat, Ministry of Transport and Public Works: (in Dutch) 1988; 25.
- Moo97 Moore MM, Daniel K, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A and Balaguer P. Antiestrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners identified in human serum. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142: 160-8.
- Mun91 Munkittrick KR, Port CB en Van Der Kraak GJ. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a lake superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can J Fish Aquat Sci* 1991; 48: 1371-80.
-

- Mur94 Murk AJ, Bosveld ATC, Barua A, Van den Berg M and Brouwer A. Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs) on biochemical parameters in chicks of the Common tern (*Sterna hirundo*). *Aquat Toxicol* 1994; 30: 91-115.
- Mur96 Murk AJ, Boudewijn TJ, Meininger PL, Bosveld ATC, Rossaert G, Ysebaert T, Meire P and Dirksen S. Effects of polyhalogenated hydrocarbons and related contaminants on Common tern reproduction: Integration of (bio)chemical and ecological responses. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996; 31: 128-40.
- Nic97 Nichols DJ, Daniel TC, Moore PA, e.a. Runoff of estrogen hormon 17 β -estradiol from poultry litter applied to pasture. *J Environ Qual* 1997; 26: 1002-6.
- NST93 North Sea Task Force. North Sea Quality Status Report 1993. Oslo and Paris Commissions, London Olsen & O, Fredensborg Denmark.
- Oeh93 Oehlmann J, Stroben E, Bettin C en Fioroni P. Hormonal disorders and tributyltin-induced imposex in marine snails. In: Quantified phenotypic responses in morphology and physiology. Proc. 27th Eur Mar Biol Symp. Dublin, Ireland, 7th-11th September 1992. Ed. Aldrich JC, Japaga, Aschford: 1993; 301-5.
- Ols83 Olsson M en Sandegren F. Is PCB partly responsible for the decline of the otter in Europe? In: Proceeding 3th Internat. Otter Symposium, Strasbourg, November 24-27, 1983.
- Ols94 Olsson M, Karlsson B en Ahnland E. Diseases and environmental contaminants in seals from the Baltic and the Swedish westcoast. *Sci tot Environ* 1994; 154: 217-27.
- Oza97 Ozan A, Safir GR en Nair MG. Persistence of isoflavones formononetin and biochanin a in soil and their effects on soil microbe populations. *J Chemical Ecology* 1997; 23(2): 247-58.
- PD98 Productschap Diervoeder. Informatiebulletin Diervoeder. Den Haag; Productschap Diervoeder. 1998; 10: 1-30.
- Pea75 Peakall DB, Cade TJ, White CM en Haugh JR. Organochlorine residues in Alaskan peregrines. *Pesticide Monitoring Journal* 1975; 8: 255-60.
- Pea88 Peakall DB. Known effects of pollutants in fish-eating birds in the Great Lakes of North America. In: N.W. Schmidtke (ed). *Toxic Contamination in Large Lakes 1998; Vol I- Chronic Effects of Contaminants in Large Lakes*. Lewis, Chelsea, MI; 39-54.
- Pel91 Pelissero C, Bennetau B, Babin P, e.a. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian sturgeon (*acipenser baeri*). *J Steroid Biochem Molec Biol* 1991; 38(3): 293-9.
- Pel93 Pelissero C, Flouriot G, Foucher JL, e.a. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an in vitro test for the oestrogenic potency of chemicals. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 44: 263-72.
- Pér94 Pérez F en Berking S. Protein kinase modulators interfere with bud formation in *Hydra vulgaris*. *Roux's Arch Dev Biol* 1994; 203: 284-9.
- Pet93 Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *CRC Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 283-335.
- Pol82 Poland A en Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanisms of toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 517-54.
- Pri85 Price KR en Fenwick GR. Naturally occurring oestrogens in foods-a review. *Food Addit Contam* 1985; 2(2): 73-106.
-

- Pur94 Purdom CE, Hardiman PA en Bye VJ. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 1994; 8: 275-85.
- Rae63 Raeside JI. Urinary oestrogen excretion in the pig during pregnancy and parturition. *J Reprod Fertil* 1963; 6: 427-31.
- Ram97 Ramamoorthy K, Vyhldal C, Chen IC, Safe S, McDonell DP, Leonard LS and Gaido KW. Additive estrogenic activities of a binary mixture of 2',4',6'-trichloro and 2',3',4',5'-tetrachloro-4-biphenylol. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 147: 93-100.
- Rat67 Ratcliffe DA. Decreased eggshell weight in certain birds of prey. *Nature* 1967; 215: 208-10.
- Ree72 Reed MJ, Fotherby K en Steele SJ. Metabolism of ethynylloestradiol in man. *J Endocr* 1972; 55: 351-61.
- Reij80 Reijnders PJH. Organochlorine and heavy metal residues in harbour seals from the Wadden Sea and their possible effects on reproduction. *Neth J Sea Res* 1980; 14: 30-65.
- Reij86 Reijnders PJH. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* 1986; 324: 456-7.
- Reij96a Reijnders PJH. Organohalogen and heavy metal contamination in cetaceans: observed effects, potential impact and future prospects. In: M.P. Simmonds & J.D. Hutchinson (eds), *The conservation of whales and dolphins*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK 1996a; 205-17.
- Reij96b Reijnders PJH. Reproductie- en ontwikkelingsstoornissen bij mariene zoogdieren als gevolg van hormonale beïnvloeding door milieuvreemde stoffen. In: P.E.G. Leonards, A.D. Vethaak & P. de Voogt (red.), *Oestrogeen-actieve stoffen in het milieu*. RIKZ/SENSE, The Netherlands, ISBN 90-369-0415-3, 1996b; 38-42.
- Reij97 Reijnders, P.J.H., Ries, E.H., Tougaard, S., Norgaard, N., Heidemann, G., Schwarz, J., Vareschi, E., & Traut, I.M. 1997. Populationdevelopment of harbour seals *Phoca vitulina* in the Wadden Sea after the 1988 virus epizootic. *J. Sea Res.* 38: 161-8
- Ren96 Ren, Lifen, Steven K. Lewis and John E. Lech. Effects of Estrogen and Nonylphenol on the Post-Transcriptional Regulation of Vitellogenine Gene Expression. *Chemo-Biological Interactions* 1996; 100: 67-76.
- Ris89 Risebrough RW. Toxic chemicals and birds of prey: discussions at Eilat in 1987. In: B-U Meyburg & RD Chancellor (eds) *Raptors in the Modern World*. Proceedings of the Third World Conference on Birds of Prey and Owls, Eilat, Israel 22-27 March 1987. World Working Group on Birds of Prey and Owls, Berlin etc. 1989; 515-25.
- Rou96 Routledge EJ, Sumpter JP. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 1996; 15: 214-49.
- Rou98 Routledge EJ, Sheenan D, Desbrow C, Brighty G, Waldock M, Sumpter JP. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: In vivo responses in Trout and Roach. *Env Sci Technol* 1998; 32: 1559-65.
- Saa90 Saavedra Alvarez MM, Ellis DV. Widespread neogastropod imposex in the Northern Pacific: implications for TBT contaminations surveys. *Mar Pollut Bull* 1990; 21: 244-7.
- Saf86 Safe S. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1986; 26: 371-99.
-

- Saf90 Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCB's), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology* 1990; 21: 51-88.
- Saf94 Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCB's): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 1994; 24: 87-149.
- San94a Sanderson JT, Norstrom RJ, Elliott JE, e.a. Biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in double-crested cormorant chicks (*Phalacrocorax auritus*). *J Toxicol Env Health* 1994; 41: 247-65.
- San94b Sanderson JT, Norstrom RJ, Elliott JE, e.a. Monitoring biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in great blue herons chicks (*Ardea herodias*). *J Toxicol Env Health* 1994; 41: 435-50.
- Sau94 Sauer PJJ, Huisman M, Koopmanesseboom C, e.a. Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins on growth and development. *Hum Exp Toxicol* 1994; 13: 900-6.
- Sho93 Shore LS, Harel-Markowitz E, Gurevich M en Shemesh M. Factors affecting the concentration of testosterone in poultry litter; department of hormone research, kimron veterinary institute Israel. *J Environ Sci Health* 1993; A28(8): 1737-49.
- Shu70 Shutt DA, Weston RH en Hogan JP. Quantitative aspects of phyto-oestrogen metabolism in sheep fed on subterranean clover (*trifolium cultivar clareo*) or red clover (*trifolium pratense*). *Aust J Agric res* 1970; 21: 713-22.
- Smi96 Smit MD, Leonards PEG, Murk AJ, De Jongh AWJJ and Van Hattum B. Development of otter-based quality objectives for PCBs. Report nr. E96/11 Institute for Environmental Studies, Vrije Universiteit, Amsterdam, 1996; 129pp.
- Sot92 Soto AM, Lin TM, Jusicia H, e.a. An 'in culture' bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-Screen). *Modern Environmental Toxicology* 1992; 21: 295-309.
- Spe90 Spence SK, Bryan GW, Gibbs PE, Masters D, Morris L, Hawkins SJ. Effects of TBT contamination on *Nucella* populations. *Func Ecol* 1990; 425-32.
- Stä95 Stäb J. Organotin compounds in the aquatic environment. Determination, occurrence and fate. PhD thesis, Vrije universiteit Amsterdam, the Netherlands: 1995; 206 pp+ 1 appendix.
- Stu96 Stumpf M, Ternes TA, Haberer K en Baumann W. Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* 1996; 87: 251-61.
- Sub87 Subramanian AN, Tanabe S, Tatsukawa R, Saito S en Myazaki N. Reductions in the testosterone levels by PCB's and DDE in Dall's porpoises of Northwestern North Pacific. *Mar Poll Bull* 1987; 18: 643-6.
- Sum95 Sumpter JP, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for oestrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 1995; 103(Suppl. 7): 173-8.
- Swe72 Swennen C. Chlorinated hydrocarbons attacked the eider population in the Netherlands. *TNO nieuws* 1972; 27: 556-60.
- Tab70 Tabak HH en Bunch RL. Steroid hormones as water pollutants; 1970; 367-76.
- Tyl98 Tyler CR, Routledge EJ. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and applied Chemistry* 1998; 70(9): 1793-1804.
-

- Vel76 Velle W. Endogenous Anabolic Agents in Farm Animals. In: Coulston F, Korte F (eds.). Anabolic agents in animal production. Stuttgart; Georg Thieme Publishers 1976; 159-70.
- Ver95 Verhoef HA. Soil Ecosystems. In: Nierenberg WA, red. Encyclopedia of environmental biology. Amsterdam: Academic Press Inc, 1995.
- Vet97 Vethaak D, Jobling S, Waldock M, e.a. Approaches for the conduct of field surveys and toxicity identification and evaluation in identifying the hazards of endocrine modulating chemicals to wildlife. In: Tattersfield L, Mathhiesen P, Campbell P, Grandy N en Länge R. (eds.) SETAC-Europe / OECD, EC Expert Workshop on Endocrine Modulators and Wildlife: Assessment and Testing. Veldhoven, The Netherlands, 10.-1.4.1997.
- VM93 van Hattum B, Leonards P, Burgers I en van der Horst B. Microverontreinigingen in Organismen uit de Nieuwe Merwede en de Dordtse Biesbosch (Nader Onderzoek Waterbodem Nieuwe Merwede). Instituut voor Milieuvraagstukken-rapport E-92/22 1993.
- Von96 Vonier, Peter M., Crain DA, McLachlan JA and Arnold SF. Interaction of Environmental Chemicals with the Estrogen and Progesterone Receptors from the oviduct of the American Alligator. Environ Health Perspect 1996; 104(12): 1318-22.
- Voo94 De Voogt P, van Velzen MJM en Leonards PEG. Patterns and toxic potency of persistent PCDD and PCDF congeners in liver of mustelids from the Netherlands. Organohal Compds 1994; 21: 465-8.
- Wag84 Wagemann, R. & Muir, D.G.C. Concentrations of heavy metals and organochlorines in marine mammals of northern waters: overview and evaluation. Can Techn Rep Fish Aquat Sci 1984; 1297: 1-97.
- Wal91 Walker MK, Peterson RE. Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat Toxicol 1991; 21: 219-38.
- War96 Waring CP, Stagg RM, Fretwell K, McLay HA en Costella MJ. The impact of sludge exposure on the reproduction of the sandy goby, *Pomatoschistus minutus*. Environ Pollut 1996; 93: 17-25.
- Wel71 Welch RM, Levin W, Kuntzman R, Jacobson M and Conney AH. Effect of Halogenated Hydrocarbon Insecticides on the Metabolism and Uterotropic Action of Estrogens in Rats and Mice. Toxicol Appl Pharmacol 1971; 19: 234-46.
- Wes83 Weseloh DW, SM Teeple and Gilbertson M. double-crested cormorants of the Great Lakes: egg-laying parameters, reproductive failure, and contaminant residues in eggs, Lake Huron 1927-1973. Can J Zoology 1983; 61: 427-36.
- Wes85 Wester PW, Canton JH, Bisschop A. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after longterm β -hexachlorocyclohexane exposure. Aquat Toxicol 1985; 6: 271-96.
-

-
- A De adviesaanvraag
 - B De commissie
 - C Overzichtstabel van het classificatieresultaat voor 77 stoffen
 - D Indicatorsoorten

Bijlagen

De adviesaanvraag

De voorzitter van de Gezondheidsraad ontving de volgende brief, gedateerd 29 september 1998, van de Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.

Hierbij verzoek ik de Gezondheidsraad mij te adviseren over stoffen in het milieu die het endocriene systeem kunnen beïnvloeden en effecten daarvan op ecosystemen.

In de afgelopen jaren is een stroom van wetenschappelijke publicaties verschenen die de aandacht vestigen op in het milieu aanwezige stoffen die het endocriene systeem kunnen beïnvloeden. Hierbij staan stoffen met een werking op de geslachtshormonen centraal. Verstoring van de hormoonbalans, met als gevolg reproductieproblemen, wordt gezien als een belangrijke oorzaak voor de teruggang in populaties van dieren op diverse verontreinigde lokaties.

Eieren van vogels, vissen en amfibieën in verontreinigde gebieden vertonen een lager broedsucces. Daarnaast worden in de mannelijke nakomelingen feminisatieverschijnselen waargenomen, bijvoorbeeld verhoogde estradiol/testosteron- verhouding, verkleining van de penis en productie van vitellogenine. Deze veldbevindingen zijn in een aantal gevallen bevestigd door laboratoriumonderzoek met stoffen. Minder informatie is er nog beschikbaar over zoogdieren, waar de teruggang doorgaans wordt geweten aan vermindering van de immunologische afweer. Aantasting van het zich ontwikkelende immuunsysteem, onder invloed van endocriene verstoring, zou daarvoor een verklaring kunnen zijn.

Een groot aantal stoffen is reeds als verdacht aangemerkt in dit opzicht, met name persistente organochloorverbindingen zoals DDT, dicofol, PCB's en dioxines, maar ook stoffen als kwik, alkylfenolen, natuurlijke en synthetische oestrogenen en fyto-oestrogenen. Omdat er sterke twijfel bestaat of het in de huidige beoordelingssystematiek van stoffen, met behulp van de voorgeschreven testen, mogelijk is om endocriene effecten op te sporen is in internationale kaders (EU, OESO) een actie begonnen om de testrichtlijnen aan te passen.

Blootstelling aan deze stoffen is ook voor de mens relevant. Daarom heeft de Gezondheidsraad, op eigen initiatief, in april 1997 reeds een advies uitgebracht over de humane aspecten van hormoonontregelaars. In aansluiting daarop wil ik de Gezondheidsraad vragen mij te adviseren over de stand van de wetenschap t.a.v. de ecotoxicologische aspecten.

Graag zou ik een antwoord willen krijgen op de volgende vragen:

- Is de Gezondheidsraad van mening dat milieuverontreiniging met stoffen die het endocriene systeem beïnvloeden een ernstig gevaar vertegenwoordigt voor populaties en als gevolg daarvan mogelijk voor ecosystemen?
- Zo ja, is reeds aan te geven welke stoffen, c.q. bronnen, in dit opzicht primair de aandacht verdienen?
- Is het mogelijk om via een programma van metingen (monitoring) na te gaan of effecten op de geslachtshormoonhuishouding van dieren optreden?
- Kan worden aangegeven welke parameters meegenomen moeten worden bij de afleiding van toxicologische advieswaarden voor hormoonontregelende stoffen en is er iets te zeggen over de gevoeligheid van deze parameters voor hormoonbeïnvloeding ten opzichte van de klassieke parameters voor de risicobeoordeling?

Vanwege de grote maatschappelijke aandacht voor dit onderwerp en het feit dat aan de Tweede Kamer hierover voor eind dit jaar een notitie is toegezegd, verzoek ik de Gezondheidsraad deze adviesaanvraag prioriteit te geven. Graag ontvang ik dit advies uiterlijk in het voorjaar van 1999.

de Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer,

w.g. JP Pronk

De commissie

-
- dr AD Vethaak, *voorzitter*
ecotoxicoloog; Rijksinstituut voor Kust en Zee, Middelburg
 - dr M van den Berg
hoogleraar toxicologie; Research Institute of Toxicology, Universiteit Utrecht
 - dr JP Boon
biochemicus; Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee, Den Burg
 - dr A Brouwer
toxicoloog; Landbouwniversiteit Wageningen
 - dr HJTh Goos
hoogleraar endocrinologie; Universiteit Utrecht
 - dr P Hagel
chemicus; Rijksinstituut voor Visserij Onderzoek, IJmuiden
 - dr ir PJH Reijnders
populatie-ecoloog, ecotoxicoloog;
Instituut voor Bos en Natuur onderzoek, Den Burg
 - Ir MA Vaal, *adviseur* (tot 1 januari 1997)
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
 - dr P de Voogt
milieuchemicus; Universiteit van Amsterdam
 - dr SE Wendelaar Bonga
hoogleraar endocrinologie; Katholieke Universiteit Nijmegen
-

- dr PW Wester, *adviseur* (vanaf 1 januari 1997)
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven
- dr J van Zorge, *adviseur*
Ministerie voor Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer,
Den Haag
- drs JW Dogger, *secretaris*
Gezondheidsraad, Den Haag

Geraadpleegde deskundigen:

- dr AJ Murk
toxicoloog; Landbouwniversiteit Wageningen
- dr WHO Ernst
hoogleraar oecologie en oecotoxicologie; Vrije Universiteit Amsterdam

Overzichtstabel van het classificatieresultaat voor 77 stoffen

Tabel C1 geeft een overzicht van de classificatie van 77 industrieel geproduceerde stoffen en pesticiden die in hoofdstuk 4 zijn besproken. In de tabel is per stof het resultaat weergegeven van de toetsing van de gevonden gegevens aan een aantal criteria, en de daaruit voortvloeiende indeling in een bepaalde klasse (zie 4.1). De gebruikte criteria zoals weergegeven in de kolommen van tabel 7 zijn:

- Productie, gebruik en emissies in Nederland. Nagegaan is of de stof in Nederland is toegestaan en hoe groot de jaarlijkse productie, het gebruik en de emissie van de stof in Nederland is. Een positieve score houdt in dat de productie, het gebruik of de emissie in Nederland groter is dan 10 ton per jaar. Dit criterium is overigens alleen van belang als gegevens over de concentraties in het milieu ontbreken
 - Concentraties in water, sediment, zwevend stof, en in organismen. Een positieve score houdt in dat de stof in één of meer milieucompartimenten is aangetroffen.
 - Fysisch: hydrofobiciteit van de stof (Kow-waarde), accumulatievermogen in organismen (BCF- of BSAF-waarden), persistentie in het milieu. Voor stoffen met een log Kow- of log BCF-waarde groter dan 3, is de blootstelling van topredatoren via voedsel van belang, hetgeen leidt tot een positieve score
 - PEC/N(O)EC verhouding >0,01 (zie 4.1.2)
 - Potentie Score voor in-vitrotests voor binding aan de oestrogenreceptor (ER), de androgeenreceptor (AR) of de schildklierhormoonreceptor (T4)(voor criteria zie 4.1.2)
-

- Reproductietoxiciteit. Bij het ontbreken van gegevens over de hormoonontregelende effecten van een stof, geeft het optreden van reproductietoxiciteit een aanwijzing dat de stof een hormoonontregelaar zou kunnen zijn.

De volledige collectie gegevens over productie, gebruik, emissie, concentraties in het milieu en de fysische eigenschappen van stoffen is te vinden in twee achtergrondstudies die in opdracht van de commissie zijn verricht. De eerste is uitgevoerd door drs MJ Greve onder begeleiding van de commissieleden dr J Boon en dr P de Voogt. In een vervolgstudie zijn deze gegevens verder aangevuld door drs R Franse onder begeleiding van het commissielid dr P de Voogt.

De inventarisatie van de effecten van deze stoffen, die zijn gebruikt voor de criteria PEC/N(O)EC, potentie en reproductietoxiciteit is uitgevoerd door ir A Bulder onder begeleiding van dr AJ Murk en drs JW Dogger .

Tabel C1 Overzichtstabel van het classificatieresultaat voor 77 stoffen. Betekenis van de symbolen: + voldoet aan het betreffende criterium; - voldoet niet aan het betreffende criterium; ? onvoldoende gegevens.

stof	productie, concen gebruik, tratie emissie		fysisch	PEC/NEC	potentie		repro- ductie- toxiciteit	opmerkingen	klasse
	ER/AR	T4							
<i>A Alkylfenolen</i>									
4-nonylfenol	+	+	+	+	+	?		milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
4-octylfenol	+	?	+	+	+	?		milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
<i>B Aniliden</i>									
Alachlor	?	-	-	?	-	+	+	geen overtuigende hor- moonontregelaar, alleen schildkliereffecten	4
Pronamide	+	?	+	?	?	?	?	niet te beoordelen, wel persistent	4
<i>C Bisfenol A</i>									
Bisfenol A	?	+	+	+?	+	?	-	potentiële hormoon- ontregelaar	2
Tetrachloro							+	potentiële hormoon- ontregelaar	2
Tetrabromo							+		
<i>D Carbamaten</i>									

stof	productie, concen gebruik, tratie emissie		fysisch	PEC/NEC	potentie		repro- ductie- toxiciteit	opmerkingen	klasse
					ER/AR	T4			
Aldicarb	+	-	-	?	?	?	?	niet te beoordelen, niet persistent	4
Benomyl (+ Carbendazim)	+	+	-	+	?	?	+	reprotoxisch, hormoon- verstoring onbekend	3
Carbaryl	+	-	-	+	?	?	+	reprotoxisch, hormoon- verstoring onbekend	3
Carbofuran	?	?	?	?	+?	?		geen gehalten in Neder- land bekend, wel endo- criene effecten	3
Chlorprofam	+	+	+/-	?	?	?	?	geen reproductie/endo- criene effecten gevonden	4
Fenoxycarb	-	?	+	?	?	?	?	geen gehalten/endocri- ne effecten bekend	4
Methomyl	-	-	-	?	?	?	-	geen reproductie/endo- criene effecten gevonden	4
<i>E Chloorfenoxycarbonzuren</i>									
2,4,5-T	?	+/-	+	-	?	+	+	te weinig bekend over endocriene effecten	3
2,4-D	+	+	-	-	-	+	?	waarschijnlijke geen hormoonontregelaar	4
<i>F Dicarboximiden</i>									
Iprodion	+	+	+	?	?	?	-	geen endocriene effecten	4
Procymidon	+	?	+	?	?	?	?	geen gehalten en endo- criene effecten gevonden	4
Vinclozolin	+	+	+	?	+	?	+	potentiële hormoon- ontregelaar	2
<i>G (Di)thiocarbamaten</i>									
Mancozeb	+	?	-	-	-	+	+	via ETU schildklierhor- moonverstoring	3
Maneb	+	?	-	-	-	+	?	“	3
Metiram	+	?	-	?	?	+	+	”	3
Molinate	?	?	?	?	?	+	?	“	3

stof	productie, concen- gebruik, tratie emissie		fysisch	PEC/NEC	potentie		repro- ductie- toxiciteit	opmerkingen	klasse
					ER/AR	T4			
Zineb	+	?	-	?	-	+	-	reproductie effecten bij dosis systemische toxiciteit	4
Ziram	+	?	-	?	-	+	-	reproductie effecten bij dosis systemische toxiciteit	4
<i>H Fenylureumherbiciden</i>									
Diflubenzuron	+	?	+	?	?	?	+	geen gehalten/endocriene effecten	4
Ethylene thiourea	?	?	-	?	?	+	?	schildklierhormoon disruptor	4
Linuron	+	+-	+	-	-	?	+	geen hormoonontregelaar	4
<i>I Ftalaten</i>									
Butylbenzylftalaat (BBP)	+	+	+	+	+	+-		PEC/NEC waarschijnlijk kleiner dan 0,01	3
Di-butylftalaat (DBP)	+	+	+	+?	+	+-		potentieel hormoonontregelaar	3
Di-ethylhexyftalaat (DEHP)	?	+	+	?	?	+-		NL risico niet beoordeelbaar	3
<i>J Nitroanilinen</i>									
Oryzalin	+	?	+	?	?	?	-	geen gehalten in NL en endocriene effecten gevonden	4
Pendimethalin	+	?	+	?	?	?	-	geen gehalten in NL en effecten gevonden. Zeer toxisch voor vissen en aq. evertibraten.	4
Quintozeen	?	-	+	?	?	?	?	geen endocriene effecten gevonden	4
Trifluralin	-	-	+	?	?	+	-	geen endocriene effecten gevonden	4

stof	productie, concen- gebruik, tratie emissie		fysisch	PEC/NEC	potentie		repro- ductie- toxiciteit	opmerkingen	klasse
					ER/AR	T4			
<i>K Organobroomverbindingen</i>									
PBB	+	+	+	+?	?	+	+?	potentiële hormoon- ontregelaar	2
PBDE	+	+	+	+?	?	+	?	potentiële hormoon- ontregelaar	2
<i>L Organochloorverbindingen</i>									
Aldrin								wordt grotendeels omge- zet in Dieldrin	
Dieldrin (+ Aldrin)	?	+	+	+	+	+		milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
Chlordane	-	+	+	+	-	+		milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
Heptachlor	?	+	+	?	+	+		geen gehalten in NL, on- der detectiegrens	3
Chloordecone (Kepone)	?	?	+	?	+	?		potentiele hormoon- ontregelaar	2
p,p'-DDT	-	+	+	-	-	+	+	endocriene risico via metaboliët p,p'-DDE	1
o,p'-DDT	-	+	+	+	+	+	+	milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
p,p'-DDE	-	+	+	+	+	+	+	milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
p,p'-DDD	-	-	+	-	-	+	+	geen endocriene effecten te verwachten	4
Methoxychlor	-	?	+	+?	+	?	?	geen gebruik en gehal- ten in NL	4
Dicofol	-	?	+	?	+-	?	-	geen gehalten in NL	4
Endosulfan	-	+	+	+	+	?		milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
HCB	?	+	+	-	-	+	?	geen potentieel risico, effecten op T4 via PCP	4
PCP	+	+	+	-	-	+	-	schildklierhormoonver- stoorder	3
HCH ($\gamma + \beta$)	+	+	+	+	+	?		milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1

stof	productie, concen- gebruik, tratie emissie		fysisch	PEC/NEC	potentie		repro- ductie- toxiciteit	opmerkingen	klasse
					ER/AR	T4			
Mirex	?	?	+	?	?	?	?	geen gehalten in NL, geen endocriene effecten	4
PCB's, PCDD's, PCDF's	-	+	+	+	+	+	+	milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
Toxafeen	-	+	+	+?	+	+	-	milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
<i>M Organofosforverbindingen</i>									
Malathion	-	?	-	?	-	?	?	geen verwachte endo- criene activiteit	4
Parathion (-ethyl)	+		+	?	-	?	?	geen verwachte endo- criene activiteit	4
<i>N Organotinverbindingen</i>									
Tributyltin	+	+	+	+	+	?	?	milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
Trifenylnin	+	+	+	+	+	?	?	milieuconcentraties mo- gelijk binnen effectrange	1
<i>O Polycar- bonaten</i>	?	?	?	?	?	?	?	geen effecten/gehalten, bisfenol A ingrediënt	4
<i>P Aromatische koolwaterstoffen</i>									
Styrenen	+	?	-	?	?	?	?	geen gehalten/effecten, alkylfenolen toegevoegd aan polymeer, afvoeren van lijst	4
Dibenzantha- ceen	?	+	+	?	?	+	?	moet nog verder onder- zocht.	3
<i>Q Synthetische pyrethroiden</i>									
Bifenthrin	-	?	+	?	?	?	?	geen gehalten in NL en effecten	4
Cyfluthrin	-	?	+	?	?	?	?	geen gehalten in NL en effecten	4
Cypermethrin	-	+	+	?	?	?	+	geen endocriene effecten	4

stof	productie, concen gebruik, tratie emissie		fysisch	PEC/NEC	potentie		repro- ductie- toxiciteit	opmerkingen	klasse
					ER/AR	T4			
Deltamethrin	-	+	+	?	?	?	?	geen endocriene effecten	4
Esfenvaleraat	+	?	+	?	?	?	?	geen endocriene effecten	4
Fenpropathrin	-	+	+	?	?	?	?	geen endocriene effecten	4
Permethrin	-	+	+	?	?	?	>	geen endocriene effecten	4
<i>R Triazinen</i>									
Amitrole	+	?	-	?	?	+	-	geen gehalten in NL, en- docriene effecten onbe- kend	4
Atrazine	+	+	-	+?	+	?	+	potentiëlehormoonontre- gelaar	2
Clofentezine	+	?	?	?	?	?	?	niets bekend	4
Ethiozine	?	?	?	?	?	?	?	”	4
Metribuzin	+	-	-	?	?	?	-	geen gehalten/effectge- gevens	4
Simazine	+	+	-	?	-	?	?	te weinig gegevens	4
<i>S Overige bestrijdingsmiddelen</i>									
Azadirachtin	?	?	?	?	?	?	?	geen gegevens	4
Hexaconazole	?	?	?	?	?	?	?	geen gegevens	4
Imidazole	?	?	?	?	?	?	?	geen gegevens	4
Nitrofen	?	?	?	?	?	+	-	te weinig gegevens, me- taboliet is T4-verstoorder	4

Indicatorsoorten

Tabel D.1 Soorten die geschikt zijn voor gebruik in monitoring in situaties waar mogelijk sprake is van hormoonverstorende stoffen.

zoogdieren	roze woelmuizen, spits/aardmuizen/vleermuizen, mollen, konijn, otter, gewone zeehond
vogels	steenuil, torenvalk, spreeuw, wilde eend, kokmeeuw, visdief, alscholver
reptielen	ringslang, hazelworm
amfibieën	bruine/groene kikker, gewone pad
vis	driedoornige stekelbaars, blankvoorn, brasem, karper, grondel, bot, schar, puitaal
ongewervelden	mollusken, kreeftachtigen etc. ^a

^a ongewervelden vertegenwoordigen een kennislacune. Mollusca vertonen imposex/intersex geassocieerd met TBT blootstelling en een aantal studies heeft Daphnia (Gerritsen, 1997) en pissenbedden (Donker e.a. 1997) gebruikt om risico's op reproductiesucces van bepaalde hormoonontregelaars te schatten