



**inbo**



Instituut voor  
Natuur- en Bosonderzoek

## Hormoonverstoring in vis

Impact op het behalen van de doelstellingen van de Habitatrictlijn en de Kaderrichtlijn Water

*Claude Belpaire*

**Auteurs:**

Claude Belpaire  
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) is het Vlaams onderzoeks- en kenniscentrum voor natuur en het duurzame beheer en gebruik ervan. Het INBO verricht onderzoek en levert kennis aan al wie het beleid voorbereidt, uitvoert of erin geïnteresseerd is.

**Vestiging:**

INBO Groenendaal  
Duboislaan 14, 1560 Groenendaal  
www.inbo.be

**e-mail:**

claude.belpaire@inbo.be

**Wijze van citeren:**

Belpaire, C. (2013). Hormoonverstoring in vis. Impact op het behalen van de doelstellingen van de Habitatrictlijn en de Kaderrichtlijn Water. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2013 (INBO.R.2013.34). 58 blz. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

**D/2013/3241/211**

**INBO.R.2013.34**

**ISSN: 1782-9054**

**Verantwoordelijke uitgever:**

Jurgen Tack

**Druk:**

Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

**Foto cover:**

Blankvoorn (R. Verlinde/Vildaphoto) en structuurformule van oestradiol

## **Hormoonverstoring in vis**

Impact op het behalen van de doelstellingen van de  
Habitatrichtlijn en de Kaderrichtlijn Water

**Claude Belpaire**

**INBO.R.2013.34**

## **Dankwoord**

Graag wil ik hierbij Adinda De Bruyn, Linde Galle, Isabel Lambeens, Tessa Van Santen en Nicole De Groof bedanken voor de technische medewerking. Mijn erkentelijkheid gaat ook uit naar de INBO bibliotheekdienst voor de uitstekende ondersteuning en naar Caroline Geeraerts, Marc Pollet en Maurice Hoffmann voor het kritisch nazicht.

## English abstract

Given the impact of endocrine disrupting compounds (EDCs) on fish, both at individual and population level, it may be expected that these substances impede the achievement of international objectives aiming at restoring and securing the quality of the environment, nature and biodiversity. More specifically, the quality objectives for natural habitats and species as defined under the Habitats Directive (HD), and the targets of ecological and chemical quality of our water ecosystems as defined in the Water Framework Directive (WFD) are at stake. This report analyses through a study of literature, how endocrine disruption in fish can impact the achievement of these international targets.

The first chapter includes a brief summary on hormonal disruption in fish, while Chapter 2 provides an overview of the research thus far conducted in Belgium. Chapters 3 and 4 deal with the potential impact of the occurrence of endocrine disruptors on reaching the targets of the Habitats Directive and the Water Framework Directive respectively.

Many field studies focusing on a broad variety of species demonstrate the presence of feminized fish as a result of the release of EDC's in the aquatic environment, and suggest that in hormonally disturbed fish, reproductive capacity is reduced.

In Flanders (northern Belgium) measurements of estrogenic effects in surface water were positive in all assessed sites. Despite the rather poor state of the Flemish water quality, and the clear impact of EDCs on fish stocks and the ecological quality of surface water, only very limited studies on endocrine disruption in Flandrian freshwater fishes have been undertaken. Preliminary studies have shown that substances with estrogenic activity also cause certain effects on fish populations, e.g. male roach shows signs of feminization (presence of oocytes - increased vitellogenin (VTG) concentrations) in 50% of the cases.

Studies aiming at predicting the potential impact of endocrine disruptors on species selected under the HD lack for Flanders. However, some international papers document EDC impact on a limited number of HD species. Species-related differences in distribution, reproduction, migration, and trophic ecology are supposed to greatly influence sensitivity of HD species to endocrine disruptors. The reports showed for some of the HD species an adverse impact of EDCs on individual or population level. It may be expected that these compounds will have a major impact on the status and possibilities for restoration of the Flemish HD species, given the high concentrations of substances with estrogenic activity in Flanders compared with other European countries.

Exploratory research on a broad set of sites has shown significant inverse correlation between the levels of certain substances, some of which known as EDCs, and the indices used in reporting the ecological status of the WFD. Another study on a more limited set of sites showed a significant negative correlation between biomarkers for estrogenicity (measured as estrogenicity of the water and VTG levels in male roach) and indicators for the integrity of aquatic communities (BBI *Belgian Biotic Index* and IBI *Index of Biotic Integrity*). The higher the estrogenic activity, the lower the environmental quality seems to be. Given these findings and other research showing that EDCs (and by extension, other toxic substances) generate negative effects on fish population and community level, we can conclude that hormonal disturbance is one of the many anthropogenic pressures with a significant impact on achieving the objectives of the WFD.

The report concludes with recommendations for further research to better understand the impact of endocrine disruptors on the achievement of the objectives of the HD and the WFD in Flanders.

## Samenvatting

Gelet op de impact van hormoonverstorende stoffen (EDC's, *endocrine disrupting compounds*) op vissen, zowel op individueel als op populatieniveau, valt te verwachten dat deze stoffen ook een invloed zullen hebben op het bereiken van verschillende internationale doelstellingen inzake de kwaliteit van milieu en natuur, meer specifiek de streefbeelden voor natuurlijke habitatten en soorten zoals gedefinieerd onder de Habitatrictlijn (HRL), en de doelstellingen van ecologische en chemische kwaliteit van onze waterecosystemen zoals bepaald in de Kaderrichtlijn Water (KRW). Dit rapport wil via literatuuronderzoek aangeven in hoeverre hormoonverstoring bij vissen een impact kan hebben op het behalen van deze internationale doelstellingen.

Een eerste hoofdstuk omvat een bondige samenvatting van het hoe en waarom van hormonale verstoring in vis, terwijl hoofdstuk 2 een overzicht biedt van het onderzoek uitgevoerd in België. Hoofdstukken 3 en 4 behandelen de mogelijke impact van het voorkomen van hormoonverstoorders op het bereiken van de streefbeelden van respectievelijk de Habitatrictlijn en de Kaderrichtlijn Water.

In Vlaanderen zijn stoffen met oestrogene werking zeer nadrukkelijk aanwezig in oppervlaktewater. Ondanks de algemeen slechte toestand van de waterkwaliteit in Vlaanderen, en de duidelijke impact van EDC's op de visbestanden en de ecologische kwaliteit van ons oppervlaktewater, heeft Vlaanderen hierrond nog maar weinig gerichte studies uitgevoerd. Verkennend onderzoek heeft aangetoond dat stoffen met oestrogene werking ook effecten op bepaalde vispopulaties veroorzaken: bij blankvoorn bv. blijkt in Vlaanderen ongeveer de helft van het aantal onderzochte mannelijke dieren tekenen van vervrouwelijking te vertonen (aanwezigheid van oöcyten – verhoogde vitellogenine (VTG) concentraties).

Specifieke studies naar de impact van hormoonverstorende stoffen op Habitatrictlijnsoorten in Vlaanderen ontbreken; wel zijn er in de internationale literatuur beschrijvingen van de impact van deze stoffen op een beperkt aantal soorten. Soortgebonden verschillen in verspreiding, voortplantings-, migratie-, en trofische ecologie zijn verondersteld een grote impact te hebben op de graad van gevoeligheid van de HRL-soorten aan hormoonverstoorders. Maar alle studies toonden de nefaste invloed van EDC's op individu- of populatieniveau. Gelet op de hoge concentraties aan stoffen met oestrogene werking in Vlaanderen vergeleken met het buitenland, mag verwacht worden dat hormoonverstorende stoffen een grote impact hebben op de toestand en het herstel van de Vlaamse HRL-soorten.

Verkennend onderzoek op een brede set van meetplaatsen heeft aangetoond dat er een omgekeerd verband bestaat tussen de gehalten van bepaalde stoffen waarvan sommige als EDC bekend staan, en de indices gebruikt bij de rapportage van de ecologische toestand van de KRW. Op een beperktere set van meetplaatsen werd ook een significante negatieve relatie gevonden tussen biomerkers voor oestrogeniciteit (gemeten als oestrogeniciteit van de waterkolom en VTG gehalten in mannelijke blankvoorn) en indicatoren voor de integriteit van aquatische levensgemeenschappen (BBI *Belgische Biotische Index* en IBI *Index voor Biotische Integriteit*). Hoe hoger de oestrogene activiteit, des te lager de ecologische kwaliteit bleek te zijn. Gelet op deze bevindingen en ander wetenschappelijk onderzoek waarbij aangetoond werd dat EDC's (en bij uitbreiding ook andere toxische stoffen) negatieve effecten genereren op populatie- en gemeenschapsniveau, mag besloten worden dat hormonale verstoring één van de vele antropogene drukken is die een significante negatieve impact heeft op het behalen van de doelstellingen van de Kaderrichtlijn Water.

Het rapport besluit met aanbevelingen voor nader onderzoek om de impact van hormoonverstoorders op het behalen van de doelstellingen van de Habitatrichtlijn en de Kaderrichtlijn Water in Vlaanderen beter te begrijpen.

# Inhoud

<b>Dankwoord .....</b>	<b>4</b>
<b>English abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>Samenvatting.....</b>	<b>6</b>
<b>Inleiding .....</b>	<b>9</b>
<b>1           Hormoonverstoring bij vissen.....</b>	<b>10</b>
1.1        Endocriene verstoring: definities en trends wereldwijd, bij mens en dier.....	10
1.2        Kenmerken van endocriene verstoring bij vissen .....	11
1.3        Welke vervuilende stoffen zijn geassocieerd met interseksualiteit bij vissen? ..	15
1.4        Bij welke vissoorten werd er hormonale verstoring waargenomen? .....	17
1.5        Effecten op populatieniveau .....	18
<b>2           Veldstudies omtrent endocriene verstoring bij vissen in België.....</b>	<b>22</b>
2.1        Endocriene verstoring bij paling in Vlaanderen .....	22
2.2        Endocriene verstoring bij blankvoorn in Vlaanderen .....	23
2.3        Hormoonverstoring in grondel en biermpje in Wallonië.....	28
<b>3           Impact van hormoonverstoring op het behalen van de doelstellingen           van de Habitatrictlijn.....</b>	<b>30</b>
3.1 <i>Cottus gobio</i> , rivierdonderpad .....	32
3.2 <i>Barbus barbus</i> , barbeel .....	33
3.3 <i>Lampetra planeri</i> , beekprik .....	34
3.4 <i>Rhodeus amarus</i> , bittervoorn .....	34
3.5 <i>Misgurnus fossilis</i> , grote modderkruiper .....	35
3.6 <i>Cobitis taenia</i> , kleine modderkruiper .....	36
3.7 <i>Thymallus thymallus</i> , vlagzalm.....	36
3.8 <i>Lampetra fluviatilis</i> , rivierprik.....	36
3.9 <i>Alosa fallax</i> , fint .....	37
3.10 <i>Salmo salar</i> , zalm.....	37
3.11 <i>Petromyzon marinus</i> , zeeprik.....	38
<b>4           Impact van hormoonverstoring op het behalen van de doelstellingen           van de Kaderrichtlijn Water.....</b>	<b>40</b>
<b>5           Conclusies .....</b>	<b>45</b>
<b>Lijst van afkortingen.....</b>	<b>47</b>
<b>Referenties .....</b>	<b>48</b>



## Inleiding

De aanhoudend groeiende bezorgdheid over de aanwezigheid en de effecten van hormoonontregelende stoffen (Endocrine Disrupting Compounds, kortweg EDC's) in mens en milieu is aanleiding tot toenemende aandacht van maatschappij, beleid en wetenschap. Dagelijks worden door de wetenschappelijke wereld rapporten over deze problematiek gepubliceerd. Sedert de ontdekking dat in aquatische ecosystemen er bij vissen reproductieve verstoringen optreden als gevolg van de aanwezigheid van stoffen met oestrogene werking, is het aanbod van wetenschappelijke literatuur rond de hormoonverstoorders, ook bij vissen exponentieel toegenomen. Getuige hiervan zijn de vele reviews die de stand van zaken van wetenschappelijke kennis hierover in beeld brengen. Voorliggend rapport beoogt dus zeker niet om een volledig overzicht te bieden van de kennistoestand over aanwezigheid en effecten van EDC's op vissen. Hiervoor wordt verwezen naar de beschikbare recente overzichten onder andere gepubliceerd door Pait en Nelson (2002), Matthiessen (2003), Couillard *et al.* (2008), Rempel en Schlenk (2008), Sumpter en Johnson (2008), Crump en Trudeau (2009), Scholz en Kluver (2009), van den Heuvel (2010), Le Page *et al.* (2011), Waye en Trudeau (2011), Soffker en Tyler (2012), McNair *et al.* (2012). Daarnaast geeft het UNEP rapport "State of the science of endocrine disrupting chemicals" (UNEP/WHO, 2013) een breder overzicht over de kennis van de toestand en effecten van hormoonverstoorders zowel in de mens als op dieren.

Gelet op de aangetoonde impact van EDC's op vissen, zowel op individueel als op populatieniveau, valt te verwachten dat EDC's ook een invloed zullen hebben op het bereiken van verschillende internationale doelstellingen inzake de kwaliteit van milieu en natuur, meer specifiek de streefbeelden voor natuurlijke habitatten en soorten zoals gedefinieerd onder de Habitatrichtlijn, en de doelstellingen van ecologische en chemische kwaliteit van onze waterecosystemen zoals bepaald in de Kaderrichtlijn Water. Dit rapport wil via literatuuronderzoek aangeven in hoeverre hormoonverstoring bij vissen een impact kan hebben op het behalen van deze internationale doelstellingen.

Een eerste hoofdstuk omvat een bondige samenvatting van het hoe en waarom van hormonale verstoring in vis, terwijl Hoofdstuk 2 een overzicht biedt van het onderzoek uitgevoerd in België. Hoofdstukken 3 en 4 behandelen de mogelijke impact van het voorkomen van EDC's op het bereiken van de streefbeelden van respectievelijk de Habitatrichtlijn en de Kaderrichtlijn Water. In een laatste hoofdstuk worden de conclusies voorgesteld.

# 1 Hormoonverstoring bij vissen

## 1.1 Endocriene verstoring: definities en trends wereldwijd, bij mens en dier

De mens produceert en verbruikt in toenemende mate een grote diversiteit aan chemicaliën. Een ruime hoeveelheid komt in ons milieu terecht, en sommige van deze chemische stoffen kunnen het endocrien systeem van zowel mens als dier beïnvloeden en hormoongestuurde processen ontregelen.

Zeer recentelijk werd op vraag van de EC door EFSA (European Food Safety Authority) de beschikbare informatie rond het testen en het evalueren van de hormoonverstoorders en hormonaal actieve stoffen gereviewed (EFSA, 2013), en de volgende werkdefinities voor hormoonverstoring werden bevestigd:

Een hormoonverstoring wordt gedefinieerd door drie criteria i) *de aanwezigheid van een negatief effect op een intact organisme of (sub) populatie*, ii) *de aanwezigheid van een endocriene activiteit*, en iii) *een plausibel causaal verband tussen de endocriene activiteit en de nadelige gevolgen* (EFSA, 2013). Hierbij volgt EFSA de werkdefinities van WHO/IPCS (2002, 2009) over hormoonontregelaar en nadelige invloed.

*- "Hormoonontregelaars zijn exogene stoffen of mengsels die de werking van het endocriene systeem wijzigen en bijgevolg daardoor schadelijke gezondheidseffecten veroorzaken op een intact organisme, of zijn nageslacht, of op (sub)populaties."*(WHO/IPCS, 2002).

*- "Schadelijke effecten zijn een verandering in de morfologie, de fysiologie, de groei, de ontwikkeling, de reproductie, of, de levensduur van een organisme, systeem of (sub) populatie dewelke resulteert in een vermindering van de functionele capaciteit, de vermindering van het vermogen tot compensatie van extra stress, of een toename van gevoeligheid voor andere invloeden."*(WHO/IPCS, 2009).

In 2013 werd door UNEP (United Nations Environment Programme) en de WHO een overzicht gemaakt van de wereldwijde wetenschappelijke kennis over de blootstelling aan en effecten van EDC's (UNEP/WHO, 2013). Na een inleiding omtrent de mechanismen van hormoonverstoring bespreekt het rapport in detail hormoonverstoring in mens en dier.

Belangrijke aandachtspunten in de conclusies van dit rapport zijn de volgende:

- De gezondheidstoestand van mens en dier is afhankelijk van het vermogen om te reproduceren en normaal te ontwikkelen. Dit is niet mogelijk zonder gezond endocrien systeem.
- Volgende vaststellingen zijn redenen tot bezorgdheid:
  - de hoge incidentie en de toenemende trend van veel endocrien-gerelateerde aandoeningen bij de mens;
  - observaties van hormonaal-gerelateerde effecten in dierpopulaties;
  - de identificatie van chemische stoffen met endocriene hormoonontregelende eigenschappen gekoppeld aan de gezondheidsstoornissen via laboratoriumonderzoek.
- Van ca 800 chemische stoffen is bekend of wordt vermoed dat ze in staat zijn om hormoonreceptoren, hormonale synthese of hormoonconversie te verstoren. Echter, slechts een fractie van deze chemische stoffen werd in testen onderzocht.

- Mens en dierpopulaties over de hele wereld worden blootgesteld aan EDC's.
- De snelheid waarmee de toename in verstoringen/ziektes heeft plaatsgevonden in de afgelopen decennia sluit genetische factoren als verklaring uit. Ook andere factoren (milieufactoren, voeding, leeftijd van moeder, virale aandoeningen, chemische blootstellingen) kunnen een rol spelen in hormoonverstoring, maar deze impact is moeilijk te identificeren.
- Het rapport heeft belangrijke kennislacunes met betrekking tot het verband tussen blootstelling aan EDC's en endocriene verstoringen geïdentificeerd.
- Talrijke laboratoriumstudies wijzen op het verband tussen blootstelling aan chemische stoffen en endocriene aandoeningen bij mens en dier. De gevoeligste periode van blootstelling aan EDC's is tijdens kritieke fasen van de ontwikkeling, zoals tijdens foetale ontwikkeling en puberteit.
- Wereldwijd is er een gebrek aan het adequaat aanpakken van de onderliggende milieuoorzaken van endocriene ziekten en aandoeningen.
- Dierpopulaties zijn onderhevig aan endocriene verstoring, met negatieve gevolgen op groei en voortplanting. Deze effecten zijn wijdverbreid en werden voornamelijk in verband gebracht met POP's. Het verbod op deze stoffen heeft de blootstellingsgraad verlaagd en heeft bij sommige populaties geleid tot een herstel. Maar andere EDC's, die in toenemende mate in het milieu voorkomen, dragen momenteel bij tot achteruitgang in dierpopulaties. Populaties die bovendien ook door andere stressoren bedreigd worden, zijn bijzonder gevoelig aan EDC's.
- Internationaal overeengekomen en goedgekeurde testmethoden voor de identificatie van hormoonontregelaars bestuderen slechts een beperkt assortiment van de bekende verscheidenheid aan hormoonverstorende effecten. Dit verhoogt de waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten bij mens en dier over het hoofd worden gezien.
- Risico's op ziektes en verstoringen door EDC's wordt wellicht aanzienlijk onderschat (onder meer als gevolg van de simultane blootstelling door meerdere of mengsels van EDC's).
- Een belangrijke nadruk moet liggen op het verminderen van de blootstellingsgraad aan EDC's en dit via verschillende mechanismen. Overheidsmaatregelen om de blootstelling te verminderen, terwijl beperkt, hebben bewezen in specifieke gevallen effectief te zijn (bv. verboden en beperkingen op lood, chloorpyrifos, tributyltin, PCB's (polychloorbifenylen) en enkele andere POP's). Dit heeft bijgedragen tot afnames in de frequentie van aandoeningen zowel bij de mens als bij dieren.
- Ondanks de aanzienlijke vooruitgang in onze kennis over EDC's, blijven er veel onzekerheden en kennislacunes bestaan, dewelke de vooruitgang inzake betere bescherming van mens en dier bemoeilijken. Een geïntegreerde, gecoördineerde en internationale aanpak is nodig om de rol van EDC's in de huidige daling van de menselijke en dierlijke gezondheid en de achteruitgang van dierpopulaties te begrijpen.

## 1.2 Kenmerken van endocriene verstoring bij vissen

Het meest opvallende en waarneembare gevolg van endocriene verstoring bij vissen is het voorkomen van interseks. Interseks wordt gedefinieerd als de gelijktijdige aanwezigheid van

mannelijk en vrouwelijk gonadaal weefsel in een individu van een gonochoristische<sup>1</sup> (vaste-seks) soort (Tyler en Jobling, 2008). De graad van interseksualiteit kan variëren naargelang de blootstelling aan aquatische verontreiniging, en kan zowel een feminiseringsproces zijn (aanwezigheid van eicellen in de testes (Nolan *et al.*, 2001)) als een masculiniseringsproces (aanwezigheid van spermatozoa met previtellogene eicellen (Hinck *et al.*, 2007)). Het meest frequent gemelde kenmerk van interseksualiteit is de aanwezigheid van een of meerdere oöcyten binnen de testes van sub-volwassen of volwassen mannetjes. Echter, een aantal andere kenmerken, zoals de aanwezigheid van testisweefsel binnen eierstokken of de vervrouwelijking van de mannelijke gonadale kanalen, werden ook gedocumenteerd (Nolan *et al.*, 2001). Figuur 1 geeft een schematische weergave van de factoren die van invloed zijn op de prevalentie van interseksualiteit in vis.

Veld en laboratoriumstudies over de biologische effecten van milieu-oestrogenen hebben in het verleden grotendeels gebruik gemaakt van testen van vitellogenine (VTG) inductie bij mannelijke vissen, verminderde groei van de testes vorming, en incidentie van interseksualiteit.

VTG is bij haast alle ovipare soorten (vissen, amfibieën, reptielen, vogels) het eidooier precursor proteïne en de voorloper van de lipoproteïnen en fosfoproteïnen. Normaal gezien komt het enkel voor bij vrouwelijke dieren, maar door blootstelling aan EDC's kunnen ook mannelijke dieren op dosis afhankelijke wijze expressie geven aan het VTG-gen. Vitellogenine, is dan ook wellicht de meest algemeen gebruikte biochemische indicator voor de detectie van (anti) oestrogeen werkzame stoffen in vis. VTG kan op verschillende manieren bepaald worden. Voor een vergelijking van deze methodieken en voor vergelijkingen tussen vitellogenine resultaten en resultaten van andere biomerkers verwijzen we naar Wheeler *et al.* (2005).

Tevens beschouwen Rotchell en Ostrander (2003) de huidige en potentiële toepassing van moleculaire technieken bij de beoordeling van de negatieve biologische effecten van EDC's op het water levende organismen. Zij bespreken het gebruik van (oestrogeen, androgeen en progestageen) hormoonreceptoren en eiwitten gerelateerd aan eiproductie (VTG en chorion), enzymen betrokken bij de biosynthese van steroïden (aromatase, sulfotransferase en hydroxysteroiddehydrogenase), DNA-schade, en apoptose<sup>2</sup>, en hun ontwikkelingspotentieel als biomerkers.

Detectietesten voor endocriene verstoring richten zich op de interferentie met de werking van oestrogeen, androgeen, en schildklierhormoon in vissen. Scholz *et al.* (2013) beoordeelden voordelen en beperkingen van alternatieve testen (zoals in de volgende testsystemen: cellijnen, primaire cellen, vis/kikker embryo, gist en cel-vrije systemen). Deze detectiesystemen voor oestrogeen-, androgeen- en schildklier-actieve stoffen werden vergeleken onder andere met betrekking tot chemische specificiteit, gevoeligheid, en de correlatie met in vivo data. De studie concludeert dat er behoefte is aan een meer systematische studie van het voorspellend vermogen van alternatieve tests en manieren om inter- en intra-assay variabiliteit te verminderen.

Interseks evalueren in de gonaden is een zeer algemene techniek om de effecten van EDC's te meten in vissen. Interseks meten en kwantificeren gebeurt echter op zeer diverse wijzen, afhankelijk van de onderzoeker. Dit maakt een vergelijking van resultaten tussen verschillende studies vrij moeilijk. Misschien wel een van de meest complete interseks indices werd ontwikkeld door Jobling *et al.* (1998). De onderzoekers ontwikkelden een index van 0 tot en met 7 afhankelijk van de mate van feminisering in elk individu. Een score van 0 geeft histologisch mannelijke gonaden aan, een score van 1 of 2 wees op de aanwezigheid van ovariële holtes in de testis, bij indexscore 3 zijn er frequent clusters van primaire oöcyten in de testis en zaadleider, bij index 4 is er frequente aanwezigheid van eicellen (primaire en/of secundaire) maar nog steeds afgewisseld met testisweefsel, bij indexscore 5 zijn grote aaneengesloten delen van de histologische sectie

---

<sup>1</sup> Een gonochoristische vissoort is een soort waarbij elk individu hetzij enkel mannelijke, hetzij enkel vrouwelijke geslachtskenmerken vertoont.

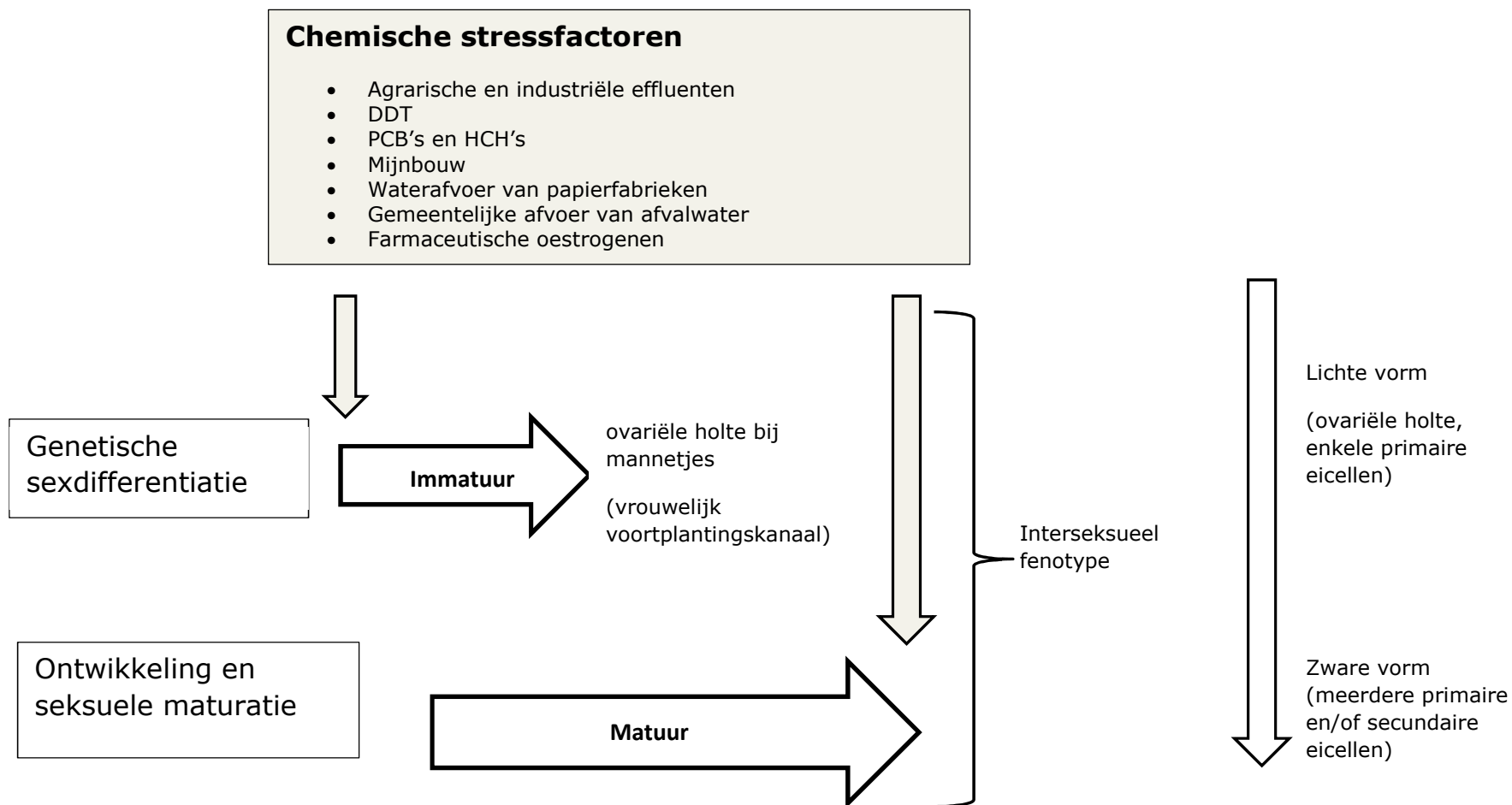
<sup>2</sup> Proces van geprogrammeerde celdood.

testiculair terwijl minder dan 50% als eierstokken met primaire en/of secundaire oöcyten, bij indexscore 6 is meer dan 50% van het gonadale weefsel ovarieel met primaire en/of secundaire oöcyten. Bij indexscore 7 betreft het histologisch vrouwelijke gonaden.

Barrett en Munkittrick (2010) voerden een uitgebreide evaluatie uit van meer dan 60 vissoorten die momenteel worden gebruikt in het Canadese "Environmental Effect Monitoring" (EEM)-programma om reproductieve effecten te evalueren. Zij raadden aan om de steekproefomvang en het bemonsteringsmoment te standaardiseren voor elke soort (onder andere op basis van de reproductieve strategie en de timing van het broedseizoen). Voor de meeste soorten blijkt dat twee tot drie weken voor de paaitijd de gevoeligheid het hoogst is. In veldstudies wordt er echter zelden rekening gehouden met de seizoensgebonden afhankelijkheid van interseks. Op basis van 44 veldstudies, waren er 21 studies uitgevoerd in de herfst, 12 studies in het voorjaar en 11 studies werden uitgevoerd in zomer of winter (Bahamonde *et al.*, 2013). Indien de bemonsteringen op het meest geschikte tijdstip uitgevoerd worden zal dit de detectie van interseks doen toenemen (bovendien met minder variabiliteit).

Maar zeker ook de moleculaire methoden gebaseerd op genexpressie en proteomics bieden interessante benaderingen voor de detectie van oestrogene effecten in vissen (zie bijvoorbeeld Maes *et al.* (2013), Pujolar *et al.* (2012, 2013) voor genexpressie en Roland *et al.* (2014) voor proteomics. Hier speelt seizoensafhankelijkheid minder een rol.

Naast de fysiologische effecten op reproductie hebben hormoonontregelaars ook een effect op het gedrag van vissen. In de afgelopen jaren, heeft onderzoek aangetoond dat het gedrag van vissen (onder andere verschillen in seksueel gedrag) ook kan worden beïnvloed door EDC's, hetgeen potentieel brede implicaties heeft voor fitness van individu en populatie. Deze gedragsstoornissen zijn meestal ook soortspecifiek. Voor een recente review verwijzen we naar Soffker en Tyler (2012). Het gebruik en de analyse van gedrag en gedragsstoornissen als indicatoren van blootstelling aan chemische stoffen en effecten gaat echter nog gepaard met veel technische uitdagingen.



**Figuur 1.** Modelmatige weergave van de factoren die van invloed zijn op de prevalentie van interseksualiteit in vis. Chemische factoren kunnen de gonadale ontwikkeling op verschillende plaatsen beïnvloeden. Er bestaat een dynamisch gamma van effecten waarbij EDC's kunnen interageren met de genetische en fenotypische plasticiteit tijdens de ontwikkeling en seksuele maturatie. De timing en omvang van deze interactie zal de geslachtsverhouding bepalen. Volwassen vissen zijn in het algemeen minder flexibel in gonadale ontwikkeling in vergelijking met jongere stadia. Het intersex fenotype is gekenmerkt door grote variatie (Bahamonde et al., 2013).

### 1.3 Welke vervuilende stoffen zijn geassocieerd met interseksualiteit bij vissen?

Tal van chemische stoffen werden geïdentificeerd als potentiële hormoonverstoorders. UNEP/WHO (2013) geeft een overzicht van bekende EDC's ingedeeld in 11 categorieën (Tabel 1).

**Tabel 1.** *Indeling van de hormonaal verstorende stoffen in 11 categorieën (UNEP/WHO, 2013).*

Classification	Specific Examples of EDCs
Persistent and bioaccumulative halogenated chemicals	
Persistent Organic Pollutants (POPs) (Stockholm Convention)	PCDDs/PCDFs, PCBs, HCB, PFOS, PBDEs, PBBs, Chlordane, Mirex, Toxaphene, DDT/DDE, Lindane, Endosulfan
Other Persistent and Bioaccumulative Chemicals	HBCDD, SCCP, PFCAs (e.g. PFOA), Octachlorostyrene, PCB methyl sulfones
Less persistent and less bioaccumulative chemicals	
Plasticizers and Other Additives in Materials and Goods	Phthalate esters (DEHP, BBP, DBP, DiNP), Triphenyl phosphate, Bis(2-ethylhexyl) adipate, n-Butylbenzene, Triclocarban, Butylated hydroxyanisole
Polycyclic Aromatic Chemicals (PACs) including PAHs	Benzo(a)pyrene, Benzo(a)anthracene, Pyrene, Anthracene
Halogenated Phenolic Chemicals (HPCs)	2,4-Dichlorophenol, Pentachlorophenol, Hydroxy-PCBs, HydroxyPBDEs, Tetrabromobisphenol A, 2,4,6-Tribromophenol, Triclosan
Non-halogenated Phenolic Chemicals (Non-HPCs)	Bisphenol A, Bisphenol F, Bisphenol S, Nonylphenol, Octylphenol, Resorcinol
Pesticides, pharmaceuticals and personal care product ingredients	
Current-use Pesticides	2,4-D, Atrazine, Carbaryl, Malathion, Mancozeb, Vinclozolin, Prochloraz, Procymidone, Chlorpyrifos, Fenitrothion, Linuron
Pharmaceuticals, Growth Promoters, and Personal Care Product Ingredients	Endocrine active (e.g. Diethylstilbestrol, Ethinylestradiol, Tamoxifen, Levonorgestrel), Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs; e.g. Fluoxetine), Flutamide, 4-Methylbenzylidene camphor, Octyl-methoxycinnamate, Parabens, Cyclic methyl siloxanes (D4, D5, D6), Galaxolide, 3-Benzylidene camphor
Other chemicals	
Metals and Organometallic Chemicals	Arsenic, Cadmium, Lead, Mercury,

	Methylmercury, Tributyltin, Triphenyltin
Natural Hormones	17 $\beta$ -Estradiol, Estrone, Testosterone
Phytoestrogens	Isoflavones (e.g. Genistein, Daidzein), Coumestans (e.g. Coumestrol), Mycotoxins (e.g. Zearalenone), Prenylflavonoids (e.g. 8-prenylnaringenin)

Deze stoffen zijn dus zeer verscheiden van aard. Biologische effecten kunnen variëren afhankelijk van de structuur en de werkingswijze van de contaminant, maar vaak betreft de chemische druk een amalgaam aan chemische stoffen. EDC's waaronder synthetische of natuurproducten (bisfenol A, polygechloroerde bifenylen, dioxines, ftalaten, pesticiden, zware metalen, alkylfenolen, polycyclische aromatische koolwaterstoffen, ethynylestradiol, estradiol, ...) worden vaak geassocieerd met lozingen van rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI) (Jobling *et al.*, 1998.; Sonnenschein en Soto, 1998; Pait en Nelson, 2002; Ying *et al.*, 2002.; Gomes *et al.*, 2003, Aguayo *et al.*, 2004; Nakada *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005).

Oestrogene stoffen en de complexe mengsels van oestrogene stoffen en andere EDC's aanwezig in de effluenten van RWZI's, hebben ook een rechtstreeks effect op reproductie. Thorpe *et al.* (2009) onderzochten de eiproductie van dikkopelrits (*Pimephales promelas*, een invasieve soort die ook in Vlaanderen occasioneel gerapporteerd wordt) blootgesteld aan effluenten van 3 RWZI's. In twee gevallen werd er een gereduceerde eiproductie vastgesteld (vermindering van 28% voor het effluent (50% verdund) van RWZI 1 en 44% voor het onverdunde effluent van RWZI 2). De studie toont bovendien ook aan dat het meestal onvoldoende is om slechts één biomarker voor endocriene verstoring (bv VTG gehaltes) te volgen, daar in dit geval de verminderde eiproductie veel hoger lag dan wat uit de VTG gehaltes kon afgeleid worden.

Verontreiniging door stedelijk afvalwater is een van de meest aangehaalde oorzaken van interseksualiteit bij vissen, en dit werd bij verschillende vissoorten als dusdanig gecorreleerd (Aravindakshan *et al.*, 2004.; Bjerregaard *et al.*, 2006.; Jobling *et al.*, 1998, 2006. Minier *et al.*, 2000.; Tetreault *et al.*, 2011.; Woodling *et al.*, 2006). Meer specifiek, werd op basis van veldonderzoek interseks bij vissen gerapporteerd in associatie met verscheidene milieuverontreinigingen, bv landbouw-en industrieel afvalwater (Prado *et al.*, 2011), stedelijke erosie (Schmitt *et al.*, 2005), DDT (dichloordifenyiltrichloorethaan) verontreiniging (Barnhoorn *et al.*, 2010; Maltret-Geraudie *et al.*, 2008), PCB's en HCH's (gehalogeneerde cyclische koolwaterstoffen) (Randak *et al.*, 2009), mijnbouw (Hinck *et al.*, 2007), en afvalwater van papierfabrieken (Pollock *et al.*, 2010).

In laboratoriumomstandigheden zijn er heel wat experimenten uitgevoerd waarbij interseksualiteit geïnduceerd werd door oestrogenen zoals 17 alpha-ethynylestradiol (EE2) bijvoorbeeld in driedoornige stekelbaars (*Gasterosteus aculeatus*) (Maunder *et al.*, 2007), en medaka (*Oryzias latipes*) (Balch *et al.*, 2004, Yalçin *et al.*, 2002, Hirakawa *et al.*, 2012).

Een experiment waarbij een volledig meer behandeld werd met EE2 bij lage concentraties (5-6 ng/l) resulteerde na twee jaar in een verhoogde prevalentie van interseksualiteit in dikkopelrits (Kidd *et al.*, 2007). Na het tweede jaar na toevoeging van EE2 stortte de populatie in elkaar en dit werd toegeschreven aan de afwezigheid van rekrutering. Het is moeilijk om de achteruitgang van de populatie eenduidig toe te schrijven aan interseksualiteit, maar er is aangetoond dat interseksuele mannelijke vissen een lager bevruchtigingspercentage vertonen (Jobling *et al.*, 2002). De studie bevat aanwijzingen dat vervuiling door farmaceutische oestrogenen kan resulteren in de ontwikkeling van interseksualiteit. Bovendien lijkt de spermakwaliteit en het bevruchtigingssucces te dalen. Van EDC's is bekend dat ze een daling van de kwaliteit van het sperma van mannelijke vissen veroorzaken, maar er zijn slechts weinig studies die een verband beschrijven tussen de spermakwaliteit en interseksualiteit (Marchand *et al.*, 2010). Mannelijke vissen met ernstige interseksualiteit produceren minder hom, hun spermadichtheid is lager, en de beweeglijkheid van



de spermatozoa is verminderd, vergeleken met schijnbaar normale mannelijke vissen van minder verontreinigde locaties (Jobling *et al.*, 2002).

#### 1.4 Bij welke vissoorten werd er hormonale verstoring waargenomen?

Niet elke gonochoristische vissoort blijkt even gevoelig voor endocriene verstoring. Daar waar op verontreinigde locaties sommige soorten duidelijke tekenen van endocriene verstoring en interseks vertoonden, was dat bij andere soorten veel minder of zelfs niet het geval.

Sinds de eerste beschrijving van interseks bij *Aphyosemion punctatum* in 1931 (Goldschmidt, 1931) zijn tijdens de laatste 15 jaar rapportages van endocriene verstoring bij vissen exponentieel toegenomen, vooral na 1998 toen Jobling *et al.* (1998), als een van de eerste interseksualiteit in voorn (*Rutilus rutilus*) beschreven en dat in verband brachten met lozingen van rioolwaterzuiveringsinstallaties.

In 2005 gaven Stentiford en Feist (2005) een overzicht van zoetwater en migrerende soorten waarin endocriene verstoring gerapporteerd was, waaronder blankvoorn (Jafri en Ensor, 1979, Purdom *et al.*, 1994, Jobling *et al.*, 1998), riviergrondel *Gobio gobio* (van Aerle *et al.*, 2001), barbeel *Barbus plebejus* (Vigano *et al.*, 2001), kopvoorn *Leuciscus cephalus* (Minier *et al.*, 2000), brasem *Abramis brama* (Slooff en Kloowijk-Vandijk, 1982), de Amerikaanse baarsachtige *Morone americana* (Kavanagh *et al.*, 2002), driedoornige stekelbaars (Stentiford en Feist, 2005), coregoniden (Mikaelian *et al.*, 2002), vlagzalm *Thymallus thymallus* (Blachuta *et al.*, 1991) en Atlantische zalm *Salmo salar* (Stentiford en Feist, 2005). Maar ook in estuariene en mariene soorten was interseks toen al gerapporteerd : bot *Platichthys flesus* (Allen *et al.*, 1999), de botten *Pleuronectes yokohamae* (Hashimoto *et al.*, 2000) en *Bothus pantherinus* (Amaoka *et al.*, 1974), Europese paling *Anguilla anguilla* (Peters *et al.*, 2001) en puitaal *Zoarces viviparus* (Matthiessen *et al.*, 2000, Stentiford *et al.*, 2003).

Intussen verschijnen meer dan duizend rapporten per jaar over dit onderwerp (referentiejaar 2010), en in 2013 publiceren Bahamonde *et al.* (2013) een lijst van zoetwatersoorten over verschillende landen waarin interseksualiteit gerapporteerd en in verband gebracht wordt met diverse antropogene bronnen van verontreinigende stoffen. Tabel 2 geeft een overzicht van resultaten van veldonderzoek waarbij interseksualiteit gemeld werd in 37 vissoorten uit 17 families (54 studies uit 24 landen) (Bahamonde *et al.*, 2013). Ook verder in hoofdstukken 2, 3 en 4 worden voorbeelden aangehaald van gedocumenteerde hormonale verstoring bij een aantal vissoorten.

Interseksualiteit werd niet waargenomen in goudvis (*Carassius auratus*), Amerikaanse fint (*Dorosoma cepedianum*), bruine Amerikaanse dwergmeerval (*Ictalurus ameurus* (sic)), en de zonnebaarzen *Lepomis gibbosus* en *Lepomis macrochirus* (Kavanagh *et al.*, 2004). Bij karper (*Cyprinus carpio*) zijn de rapporten minder consistent, terwijl sommige studies geen tekenen van endocriene verstoring vonden (Hinck *et al.*, 2008; Kavanagh *et al.*, 2004; Schmitt *et al.*, 2005; Viganò *et al.*, 2006), zijn er andere (zie Tabel 2) waar dit wel het geval was. Baldigo *et al.* (2006) rapporteerden interseks bij de baarsachtigen *Micropterus salmoides* en *M. dolomieu*, maar vonden op dezelfde meetplaatsen geen interseks bij mannelijke bruine Amerikaanse dwergmeerval (*Ameiurus nebulosus*). Hinck *et al.* (2009) tenslotte observeerden interseksualiteit bij vier van de 14 bestudeerde soorten uit negen rivierbekkens in de VS (wel bij de baarsachtigen *Micropterus salmoides* en *M. dolomieu*, bij karper en bij meerval (*Ictalurus punctatus*); maar niet bij *Micropterus punctulatus*, *Morone chrysops* en *Morone saxatilis*), platkopmeerval (*Pylodictus olivaris*), snoek (*Esox lucius*), kwabaal (*Lota lota*), forel (*Salmo trutta*), en de sucker-soorten (*Catostomus macrocheilus*, *C. catostomus* en *C. commersoni*).

Deze gegevens blijken te suggereren dat er bij vissen grote specifieke verschillen in gevoeligheid aan endocriene verstoring bestaan. Daar waar sommige soorten onder vervuilde condities duidelijke kenmerken van interseksualiteit vertonen, blijken andere soorten hier relatief ongevoelig aan te zijn.

Oestrogenen, androgenen en schildklierhormonen zijn identiek in alle vertebraten. Echter, de receptoren tussen verschillende klassen van vertebraten kunnen enigszins verschillen, waardoor de mogelijkheid van exogene chemicaliën om met hen te interageren ook kan verschillen. Screeningsmethoden voor EDC's in dieren werden ontwikkeld met behulp van oestrogeen- en androgeenreceptoren van verschillende soorten, waaronder vis, amfibieën en reptielen (Katsu *et al.*, 2007; 2010). Deze studies toonden verschillen in gevoeligheden van oestrogeenreceptoren aan chemicaliën tussen soorten. Daarom is het nodig om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan soortgebonden verschillen in hormoon-receptor gevoeligheid beter te begrijpen.

## 1.5 Effecten op populatieniveau

De feminisering van aquatische biota door hormoonontregelaars (EDC's) is duidelijk gedocumenteerd. Minstens 37 vissoorten uit 17 families zijn geïdentificeerd met tekenen van interseksualiteit in de gonaden in 54 veldstudies (Bahamonde *et al.*, 2013). Er is dan ook grote bezorgdheid dat de reproductiecapaciteit van hormonaal verstoorde, interseksuele vissen aangetast zou zijn. Het is echter niet altijd even duidelijk in welke mate EDC's negatieve effecten hebben op de duurzaamheid van natuurlijke populaties. Harris *et al.* (2011) onderzochten bij blankvoorn of en in welke mate hormonaal verstoorde vissen kunnen concurreren met gezonde vissen in een realistisch voortplantingsscenario. De afstamming van het broed werd nagegaan via DNA microsatellieten. De resultaten waren sterk verschillend afhankelijk van de mate van hormonale verstoring. Bij licht vervrouwelijkte mannelijke blankvoorns was er geen impact op de reproductiecapaciteit (daar was lichaamslengte de enige factor gecorreleerd met reproductief succes), maar bij mannelijke vissen met zwaardere vormen van hormonale verstoring waren er verminderde reproductieve prestaties (tot 76%). De studie concludeert dat feminisering van de mannelijke blankvoorn waarschijnlijk een belangrijke determinant is voor reproductiesucces in rivieren met een hoge prevalentie van matig tot ernstig gefeminiseerde mannetjes.

Mills en Chichester (2005) bestudeerden de beschikbare kennis over aanwijzingen van effecten van EDC's op de reproductieve gezondheid en duurzaamheid van de inheemse vispopulaties. Zij concludeerden toen dat er een kritieke behoefte bestaat aan een betrouwbare methode of indicator voor de in situ voortplanting van vissen. Het koppelen van endocriene verstoring en voortplantingsschade met een ecologisch relevante invloed op de duurzaamheid van vispopulaties blijft een uitdaging. Ook Cheek (2006) vat studies samen die de effecten van EDC's op populatieniveau nagaan. Er bestaat substantieel bewijs van aantasting van de vruchtbaarheid door endocriene verstoring, en in vis, is de mogelijkheid om effecten op populatieniveau te hebben, reëel. Cheek (2006) besluit dat het onwaarschijnlijk is dat een soort over zijn volledige verspreidingsgebied uitgeroeid wordt door hormoonverstoorders, maar in combinatie met andere stressfactoren zoals habitatverlies, overbevissing en klimaatverandering, kunnen EDC's bijdragen tot het lokaal uitsterven van populaties.

Zie ook hoofdstukken 2, 3 en 4 voor meer voorbeelden.

**Tabel 2.** Rapporten van interseksualiteit waargenomen in vis onder natuurlijke omstandigheden. Soort, locatie, referentie en betrokken EDC's zijn weergegeven (naar Bahamonde et al., 2013).

Order	Family	Species	Reference	Country	Location	Pollution	
Acipenseriformes	Acipenseridae	Pallid sturgeon	<i>Scaphirhynchus albus</i>	Harshbarger et al. (2000)	USA	Mississippi river	Organochlorines
		Shovelnose sturgeon	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	Amberg et al. (2009)	USA	Wabash River	Not stated
Cypriniformes	Catostomidae	White sucker	<i>Catostomus commersoni</i>	Sikstrom et al. (1975), Woodling et al. (2006)	USA & Canada	Colorado river; Athabasca River	Sewage effluents
	Cyprinidae	Bighead carp	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Papoulias et al. (2006)	USA	Missouri River	Not stated
		Bream	<i>Abramis brama</i>	Hecker et al. (2002), Sloof and Klootwijk-Vandijk (1982), Vethaak et al. (2002)	The Netherlands & Germany	River Rhine, River Waal, River Lek, Lake Brassem, Elbe River	Sewage effluents, heavy metals, organic and inorganic contaminants.
	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Baldigo et al. (2006), Hinck et al. (2009), Hinck et al. (2007), Solé et al. (2002), Solé et al. (2003)	USA & Spain	Colorado River, Hudston River, Anioia River and Calender	Mining, agricultural, sewage effluents, estrogen compounds, PCBs	
	Chub	<i>Squalius cephalus</i>	Minier et al. (2000), Randak et al. (2009)	Czech Republic, England & France	River Elbe, Rivers Ouse, Blesle, Bethune and Seine	Chemical plants (Hg, POPs), sewage effluents.	
	Barbel	<i>Barbus plebejus</i>	Viganò et al. (2001), Viganò et al. (2006)	Italy	Po River	EDCs	
	Roach	<i>Rutilus rutilus</i>	Bjerregaarda et al. (2006), Maltret-Geraudie et al. (2008), McGee et al. (2012), Minier et al. (2000), Nolan et al. (2001)	Ireland, France, Denmark, United Kingdom, Sweden and England.	River Brosna, River Inny, River Suck, River Deel, Seine River, lake Funbosjon, Rivers Ouse, Blesle, Bethune and Seine River	Sewage and industrial effluents	
	Silver carp	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Papoulias et al. (2006)	USA	Missouri River	Not stated	
	Spottail shiner	<i>Notropis hudsonius</i>	Aravindakshan et al. (2004)	Canada	St. Lawrence River	Sewage effluents	
		Balitoridae	Stone loach	<i>Barbatula barbatula</i>	Doux fils et al. (2007)	Belgium	River Vesdre
Characiformes	Characidae	Lambari	<i>Astyanax fasciatus</i>	Prado et al. (2011)	Brasil	Grande River	Agricultural, industrial and sewage effluents

Siluriformes	Clariidae	Sharptooth catfish	<i>Clarias gariepinus</i>	Barnhoorn <i>et al.</i> (2004), Yalçin <i>et al.</i> (2002)	South Africa & Turkey	Marais Dam and the Rietvlei Nature Reserve, River Asi	Agricultural, industrial and sewage effluents
	Ictaluridae	Channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	Hinck <i>et al.</i> (2009), Hinck <i>et al.</i> (2007)	USA	Colorado River	Mining, agricultural, sewage effluents
	Pangasiidae	Pangasiid catfish	<i>Pangasius nasutus</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2012)	Indonesia	Indragiri River	Not stated
Salmoniformes	Salmonidae	Brown trout	<i>Salmo trutta fario</i>	Körner <i>et al.</i> (2005)	Switzerland	Emme, Liechtensteiner Binnenkanal, Necker & Venoge River	Sewage effluents
		Chinook salmon	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Kinnison <i>et al.</i> (2000)	New Zealand	Glenariffe Hatchery	Not stated
		Coho salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Kinnison <i>et al.</i> (2000)	Chile	Fish farm near Puerto Montt	Not stated
		Grayling	<i>Thymallus thymallus</i>	Blachuta <i>et al.</i> (1991)	Poland	Nysa Klodzka river	Not stated
		Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ross <i>et al.</i> (1963)	USA	Not stated	Not stated
		Lake whitefish	<i>Coregonus clupeaformis</i>	Mikaelian <i>et al.</i> (2002)	Canada	St. Lawrence River	Sewage effluents
Esociformes	Esocidae	Northern pike	<i>Esox lucius</i>	Vine <i>et al.</i> (2005)	United Kingdom	River Hull, River Trent, River Colne, River Blackwater.	Sewage effluents
Gasterosteiformes	Gasterosteidae	Three-spined stickleback	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gercken and Sordyl (2002)	Germany	South Schwerin	Sewage effluents
Perciformes	Percidae	Eurasian perch	<i>Perca fluviatilis</i>	Gercken and Sordyl (2002)	Germany	Uecker and Randow rivers	Sewage effluents
		Rainbow darter	<i>Etheostoma caeruleum</i>	Tetreault <i>et al.</i> (2011)	Canada	Grand River	Sewage effluents
		Greenside darter	<i>Etheostoma blennioides</i>	Tetreault <i>et al.</i> (2011)	Canada	Grand River	Sewage effluents
	Walleye	<i>Sander vitreus vitreus</i>	Miller <i>et al.</i> (2012), Pollock <i>et al.</i> (2010)	USA & Canada	Mississippi River and Wabigoon River	Pulp mill effluents and EDCs	
	Gobiidae	Gudgeon	<i>Gobio gobio</i>	Douxfils <i>et al.</i> (2007), Faller <i>et al.</i> (2003), van Aerle <i>et al.</i> -2001	Switzerland, United Kingdom & Belgium	River Suhre, River Ron, Rivers Aire and Lea, and Longton Park Lake	Sewage effluents
		Round goby	<i>Neogobius melanostomus</i>	Marentette <i>et al.</i> (2009)	Canada	Hamilton harbour	Agricultural, sewage effluents, and steel mills
	Cichlidae	Java tilapia	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Barnhoorn <i>et al.</i> (2010), Marchand <i>et al.</i> (2010)	South Africa	Luvuvhu Catchment	DDT
		Tilapia	<i>Oreochromis spp.</i>	Lin Sun and Tsai (2009)	Taiwan	Era-Jiin River	EDCs

Centrarchidae	Largemouth bass	<i>Micropterus salmoides</i>	Baldigo <i>et al.</i> (2006), Hinck <i>et al.</i> (2009), Hinck <i>et al.</i> (2008), Hinck <i>et al.</i> (2007), James (1946), Schmitt <i>et al.</i> 2005	USA and Mexico	Savannah River, Pee Dee River, Mississippi River, Mobile River, Apalachicola River, Colorado River, Hudston River, Rio Grande, Ridge Lake	Mining, agricultural, sewage effluents, POPs
	Shoal bass	<i>Micropterus cataractae</i>	Ingram <i>et al.</i> (2011)	USA	Flint River	Sewage effluents
	Smallmouth bass	<i>Micropterus dolomieu</i>	Anderson <i>et al.</i> (2003), Baldigo <i>et al.</i> (2006), Blazer <i>et al.</i> (2007), Blazer <i>et al.</i> (2012), Hinck <i>et al.</i> (2007)	USA	Potomac River, Hudston River, Mobile River, Colorado River, Columbia River, Kalamazoo River, Michigan	Agricultural, pulp and paper mills, sewage effluents, POPs
Moronidae	White perch	<i>Morone americana</i>	Kavanagh <i>et al.</i> (2004)	Canada	Lake Ontario	EDCs

## 2 Veldstudies omtrent endocriene verstoring bij vissen in België.

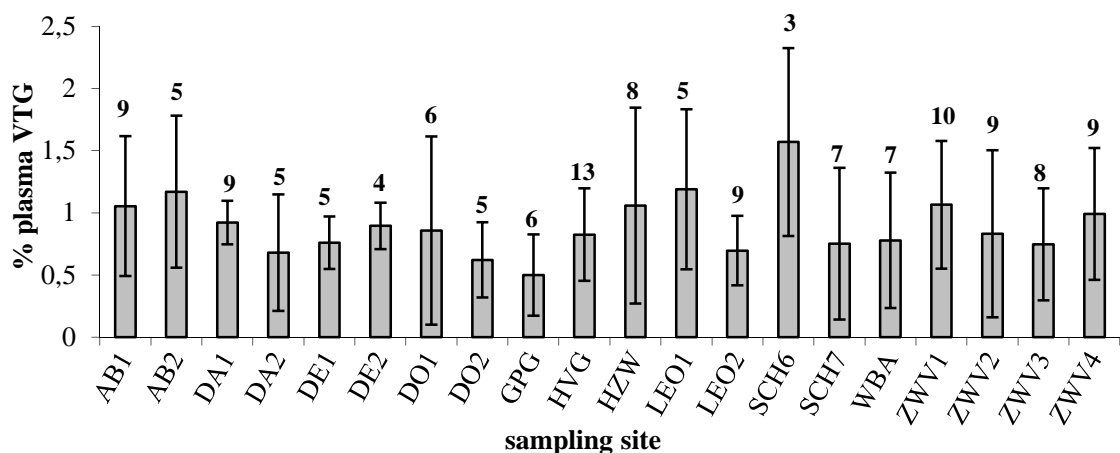
In tegenstelling tot het buitenland zijn er weinig Belgische studies waarbij veldonderzoek verricht werd naar de toestand en effecten van endocriene verstoring in zoetwater vispopulaties. Hieronder worden drie studies samengevat.

### 2.1 Endocriene verstoring bij paling in Vlaanderen

In een Vlaamse studie (Versonnen *et al.*, 2004) werd nagegaan of en in welke mate endocriene verstoring bij paling meetbaar is. Gelet op de kennis die beschikbaar was over opgestapelde contaminanten in het spierweefsel van gele paling (de immature sedentaire fase van *Anguilla anguilla*) (Vlaams palingpolluëntenmeetnet, Maes *et al.* 2008) was het mogelijk om sites te selecteren met een gradiënt aan palingvervuiling via opgestapelde stoffen. In een selectie van 142 palingen afkomstig uit 20 sites, werden plasma VTG gehalten gemeten.

Voorafgaandelijk werd onder laboratoriumcondities onderzocht hoe palingen reageren na een behandeling van ethinylestradiol (EE2). Hoewel de palingen blootgesteld werden aan een hoge concentratie van EE2 (10 µg/l in badvorm) gedurende 9 dagen, waren de relatieve VTG gehalten vrij laag ( $28.3 \pm 10.6\%$ , gemeten met proteïne-electroforese), en veel lager dan bij andere vissoorten in gelijkaardige experimenten. Dit gaf aan dat de paling in dit stadium weinig geschikt is voor het opsporen van endocriene verstoring via VTG inductie.

Dit werd bevestigd in de veldmetingen. De plasma VTG gehalten waren zeer laag, ondanks hoge concentraties aan opgestapelde stoffen (Fig. 2). De totale gemiddelde VTG concentratie was  $0.9 \pm 0.5\%$ . De hoogste relatieve plasma VTG concentratie was 2.45%. Er werden geen correlaties gevonden tussen VTG en gewicht, lengte, conditiefactor, vetgehalte, contaminanten (PCB's, organochloorpesticiden, metalen) of de datum van de monsterneming.



**Figuur 2.** Relatieve plasma vitellogenine gehalten van paling van 20 Vlaamse meetplaatsen (gemiddelden  $\pm$  standaard afwijking). Het aantal vissen is weergegeven per meetplaats (Versonnen *et al.*, 2004).

Uit dit onderzoek mag niet besloten worden dat paling ongevoelig is voor endocriene verstoring. Deze studie werd uitgevoerd op gele paling, dit is de opgroeiende immature vorm. In deze subadulten zijn de gonaden nog niet ontwikkeld, en kenmerken van endocriene verstoring zullen zich pas later manifesteren, tijdens de oceanische migratie van de zilverpalings naar de paaigronden waarbij de dieren tot geslachtsrijpheid komen. Mogelijk is endocriene verstoring en/of de effecten van reprotoxische contaminanten een oorzaak van de dramatische terugval van de drie palingpopulaties (Europese, Amerikaanse en Japanse paling) van het noordelijk halfrond.

Intussen werden in Vlaanderen wel andere effecten van contaminanten op de biologie van de paling aangetoond, onder andere op het vetgehalte, op de conditie, op genetische expressie en op proteïne expressie (zie o.a. Belpaire *et al.*, 2009; Hoff *et al.*, 2005; Geeraerts en Belpaire, 2010, Maes *et al.*, 2005; 2013, Pujolar *et al.*, 2012, 2013, Roland *et al.*, 2014).

## 2.2 Endocriene verstoring bij blankvoorn in Vlaanderen

Reeds in 2003 gaven Versonnen *et al.* (2003) indicaties aan dat er in blankvoorn een significante correlatie bestond tussen accumulatie van pollutanten en vitellogenine.

In 2006 werd er een verkennende veldstudie uitgevoerd naar de verspreiding van hormoonverstorende stoffen in Vlaanderen en hun invloed op vispopulaties (Berckmans *et al.*, 2007, 2012). Deze studie had als specifieke doelstellingen:

- (1) in hoeverre is de verspreiding van stoffen met oestrogeenachtige werking algemeen voor alle Vlaamse rivierbekkens,
- (2) is er een meetbaar schadelijk effect op natuurlijke vispopulaties,
- (3) en tenslotte, wat is de relatie tussen de aanwezigheid en de effecten van hormoonontregelaars op vis en de ecologische toestand van de Vlaamse oppervlaktewateren?

Hierbij werd een multidisciplinaire benadering in 3 fasen gevolgd:

In een eerste luik werd de oestrogene activiteit in oppervlaktewater gemeten met behulp van biotesten. In een tweede luik werden, op dezelfde plaatsen, vissen gevangen en onderzocht op biomerkers voor hormoonverstoring. Tenslotte werd een centrale databank met alle resultaten en beschikbare milieuv variabelen ontwikkeld en geanalyseerd.

Fase 1:

36 bemonsteringslocaties werden geselecteerd op basis van diverse criteria:

- de meetplaatsen werden verdeeld over verschillende stroomgebieden in Vlaanderen. Er werden zowel kanalen, als rivieren en polderwaters uitgekozen.
- op die meetplaatsen was de index van biotische integriteit van vispopulaties (IBI) beschikbaar en varieerde van 'goed' tot 'slecht'.
- bovendien waren er ook gegevens over de chemische kwaliteit (palingpolluentenmeetnet) en de ecologische toestand (BBI, Belgische Biotische Index) beschikbaar.
- de eerder gerapporteerde aanwezigheid van blankvoorn dat als testorganisme geselecteerd werd. Niet alleen is het een vissoort die een ruime verspreiding heeft over Vlaanderen, maar ook werd in internationaal onderzoek aangetoond dat deze soort geschikt is om hormoonverstoringen te meten.

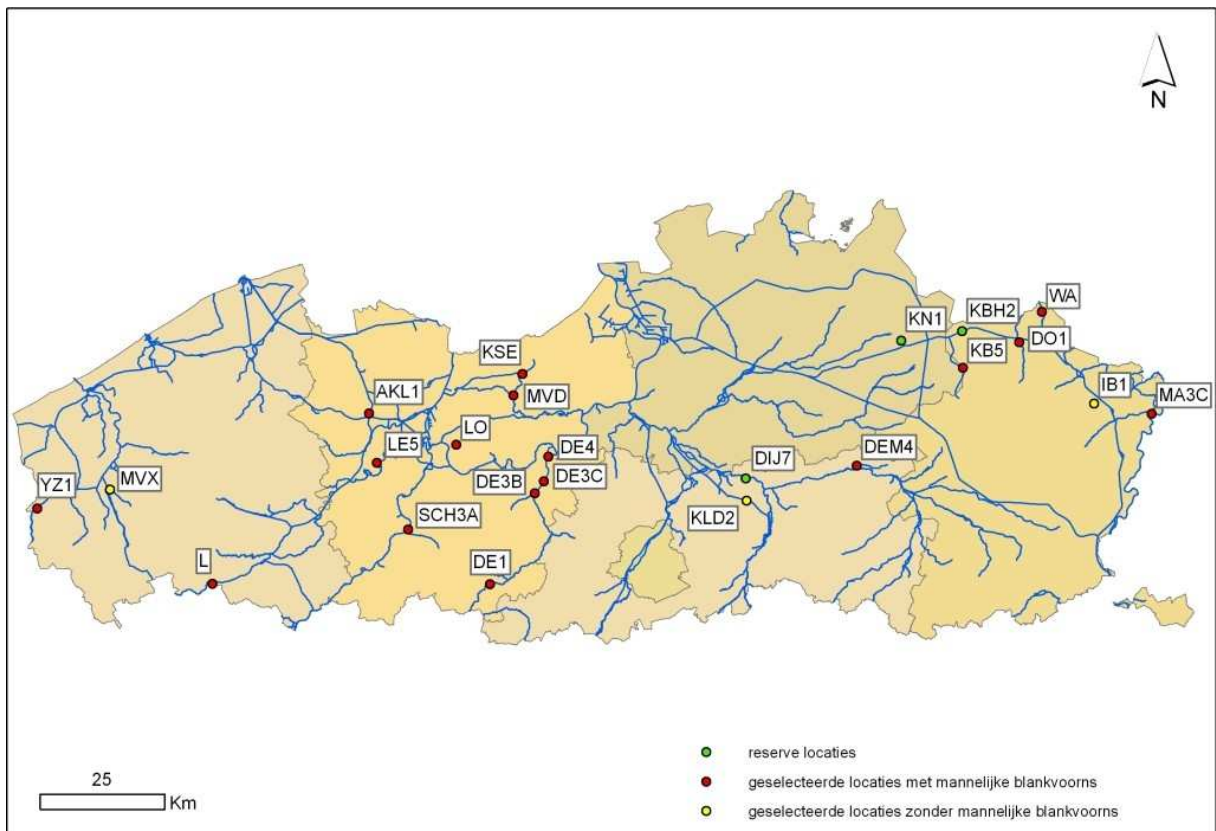
Op deze 36 locaties, werd het water tweemaal bemonsterd in 2 verschillende seizoenen en de oestrogene activiteit werd geanalyseerd met behulp van een gist bioassay (YES-assay).

Fase 2:

Op basis van de YES testen werden 23 van de 36 locaties geselecteerd voor verder onderzoek van de effecten op de lokale blankvoornpopulaties (Fig. 3).

Bemonstering leverde enkel mannelijke blankvoorn op in 18 van de 23 locaties. Als biomerkers voor oestrogene effecten in de mannelijke vis werden (1) vitellogenine bepaald en (2) de gonaden van mannelijke blankvoorns histologisch onderzocht.

Gelijktijdig met de visbemonstering, werden ook opnieuw watermonsters genomen en oestrogene activiteit gemeten met de YES-assay.



**Figuur 3.** *Verspreiding van de 23 onderzochte meetplaatsen in Vlaanderen (Berckmans et al., 2007)*

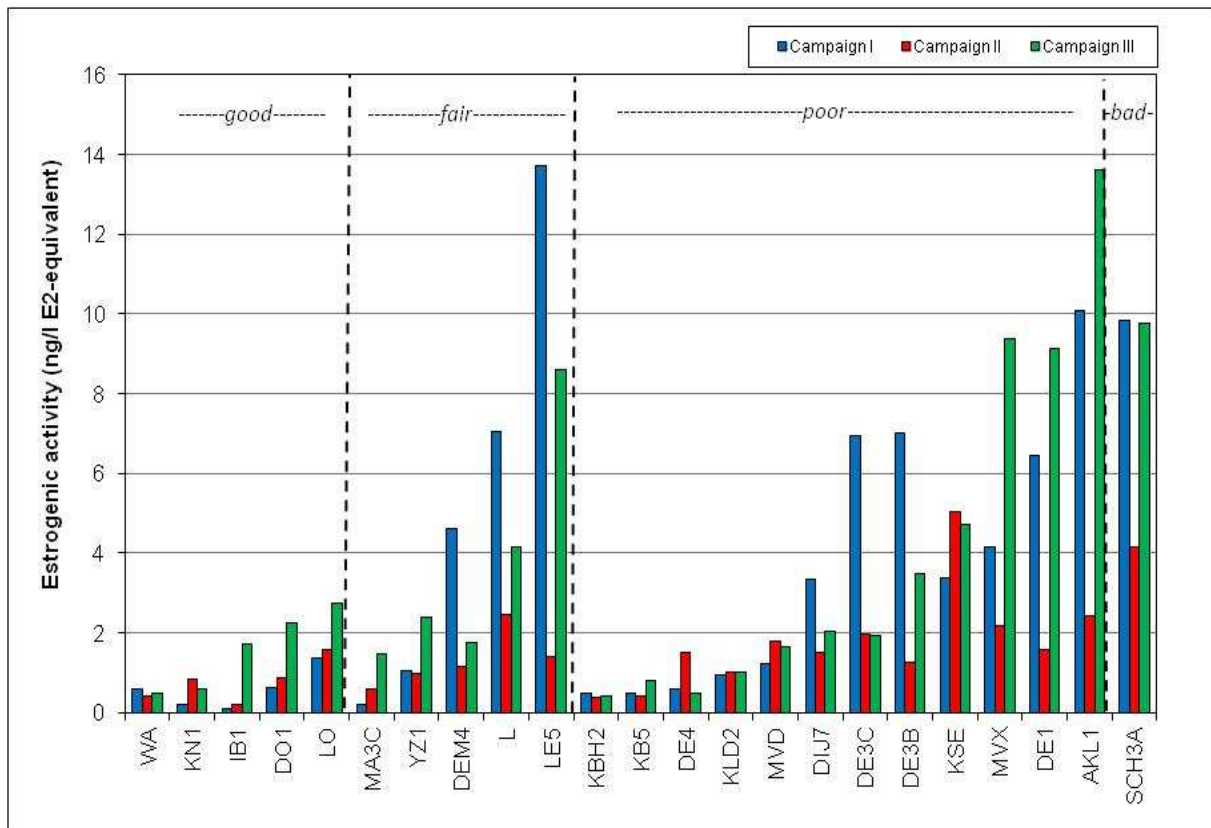
Fase 3:

De verkregen resultaten (fase 1 en 2) werden in een databank aangevuld met de beschikbare data omtrent ecologische kwaliteit (IBI, BBI), fysicochemie en de aanwezigheid van polluenten (palingpolluentenmeetnet), en geanalyseerd.

Conclusies

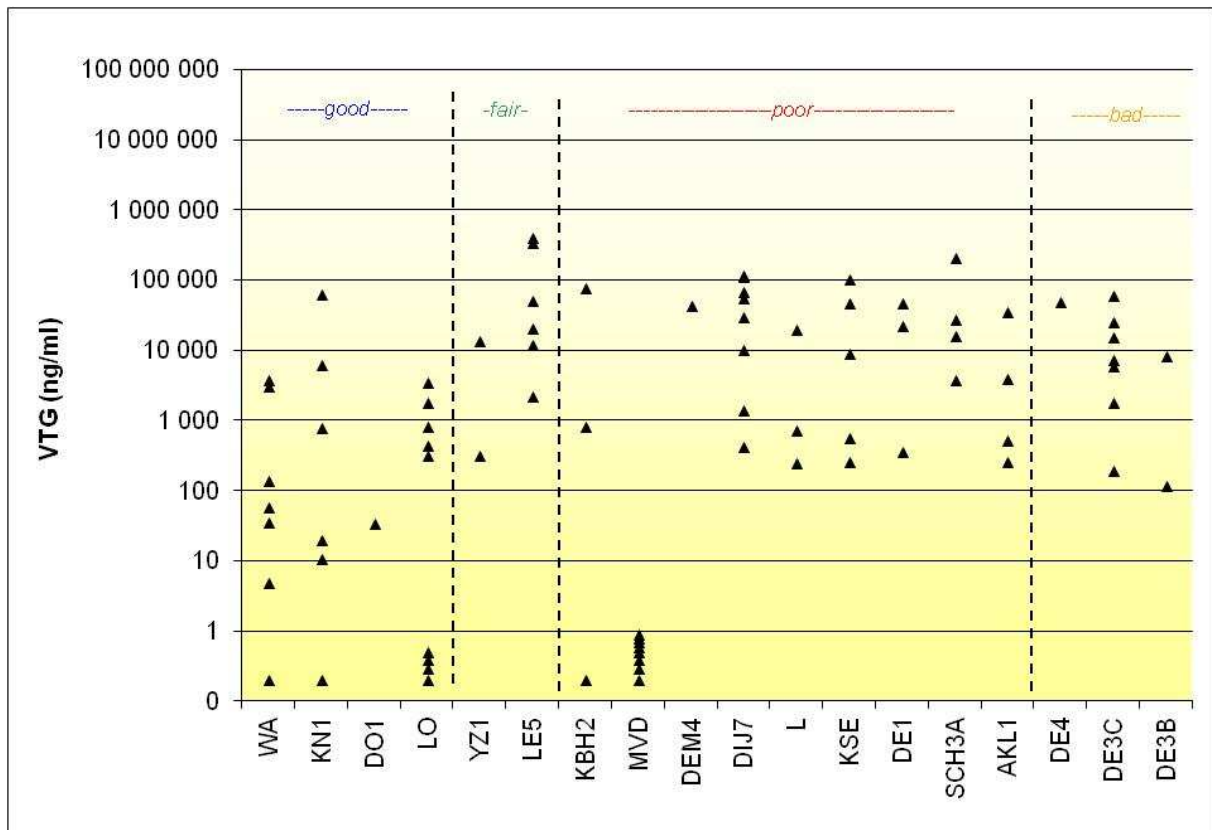


De oestrogene activiteit met de gisttest bleek voor alle meetplaatsen meetbaar (boven de detectielimiet, Fig. 4). De resultaten varieerden van 0.5 tot 8.7 ng/l E2-equivalent, zowel tussen verschillende meetcampagnes als tussen de verschillende plaatsen. Dit wijst duidelijk op het ontbreken van onverstoorte plaatsen die niet in aanraking komen met stoffen met oestrogeenverstorende activiteit. In vergelijking met eerder gerapporteerde waarden voor enkele (biologisch dode) rivieren in het bekken van de Boven-Schelde, zijn de metingen voor oestrogene activiteit in huidige studie lager, maar in vergelijking met enkele internationale studies (Nederland, Duitsland) scoren de Vlaamse oppervlaktewaters relatief hoog. Het fenomeen 'hormoonverstoring' blijkt dus ruim verspreid over Vlaanderen.



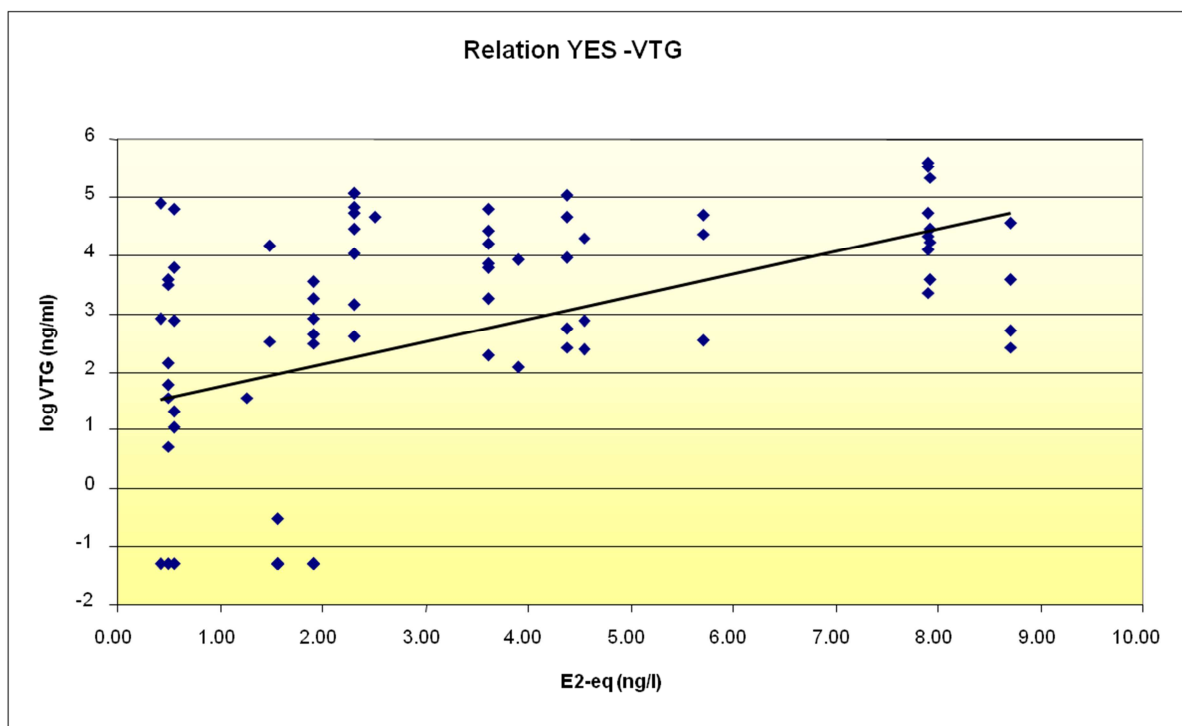
**Figuur 4.** Estrogene activiteit met de gisttest over 3 meetcampagnes op 23 Vlaamse meetplaatsen. Meetplaatsen zijn gerangschikt op basis van hun ecologische kwaliteit (IBI klasse) (Berckmans et al., 2007).

Op 11 van de 18 locaties waar mannelijke blankvoorns voor studie van biomerkers beschikbaar waren, werd **bij de meerderheid van de vissen een verhoogd vitellogenine gehalte gemeten** (Fig. 5). Dit is duidelijk een effect van blootstelling aan pseudo-oestrogene stoffen.



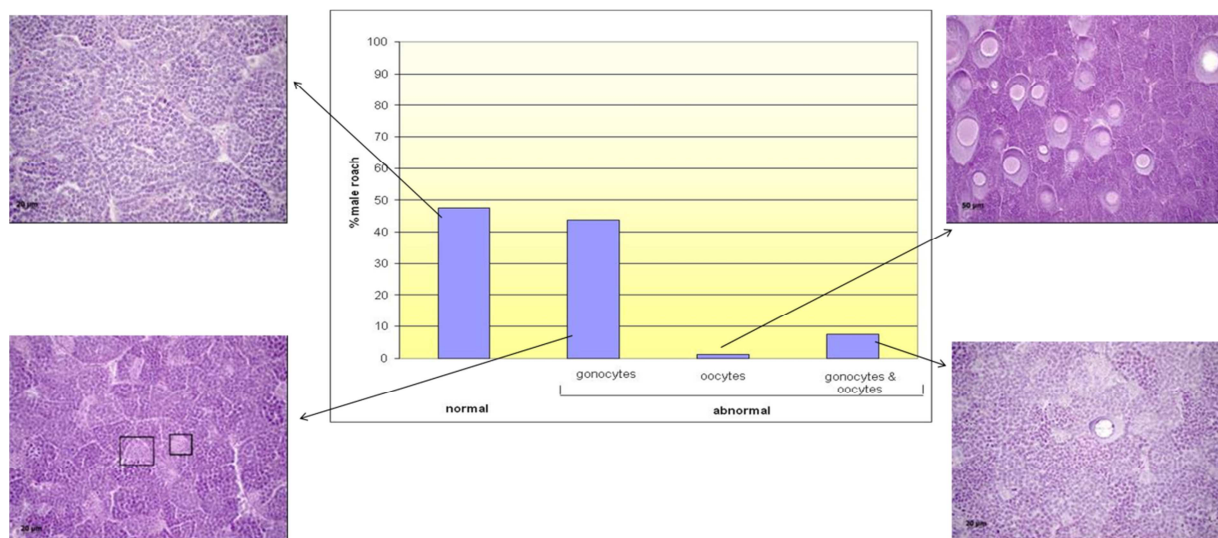
**Figuur 5.** *Individuele VTG concentraties in mannelijke blankvoorn van 18 meetplaatsen in Vlaanderen. VTG gehalten in vissen van meetplaatsen met een IBI score van matig tot slecht zijn hoog (> 100 ng/ml) vergeleken met die van plaatsen met een IBI klasse goed (Berckmans et al., 2007).*

Bovendien blijkt er een positief verband te bestaan tussen verhoogde oestrogene activiteit gemeten in het water (gisttest) en metingen van VTG in mannelijke blankvoorns (Fig.6).



**Figuur 6.** Positief verband tussen de gemiddelde oestrogene activiteit in het water en VTG gehalten in individuele mannelijke blankvoorn (Spearman  $R = 0.55$ , significante  $p = 0.0175$ ) (Berckmans et al., 2007).

Uit het weefselonderzoek van de geslachtsorganen van mannelijke blankvoorns, bleek dat vaak diverse stadia van eicellen aanwezig waren: **in de helft van de bemonsterde vissen waren er tekenen van interseks** (Fig. 7). Mannelijke blankvoorns blijken in een zekere mate vervrouwelijkt te zijn. Deze verstoring van de geslachtsorganen bleek algemeen verspreid over de bemonsterde Vlaamse waters. De aard en intensiteit van deze verstoring zijn gelijkaardig als de bevindingen in blankvoorn in de U.K.



**Figuur 7.** Frequentie van voorkomen van normale en abnormale testes bij mannelijke blankvoorn in Vlaanderen (histologie RIVM) (Berckmans *et al.*, 2007).

De metingen van hormoonverstoring (zowel in het water als in blankvoorn) waren het hoogst op de Schelde (Ringvaart), op het afleidingskanaal van de Leie en op het kanaal van Stekene. Voor geen enkele van de locaties waar er mannelijke blankvoorns gevangen werden bleek totale afwezigheid van oestrogene verstoring.

Samenvattend heeft deze studie aangetoond dat het voorkomen van stoffen met oestrogeen versturende activiteit een vrij algemeen fenomeen is voor Vlaamse waters, en dit zowel voor waters die volgens de huidige chemische en biologische kwaliteitsindices van 'goed' tot 'slecht' scores. Bovendien zijn de effecten van oestrogene verstoring duidelijk aanwezig en meetbaar in onze Vlaamse blankvoornpopulaties. Deze effecten op onze zoetwatervissen blijken bovendien ook ruim verspreid over Vlaanderen.

Dit onderzoek was een oriënterende studie en laat niet toe om statistisch verantwoorde causale verbanden te leggen tussen hormoonverstoring en verontreinigingsgegevens of andere indexen voor waterkwaliteit. Nochtans zijn er een aantal trends aangetoond, waarbij als belangrijkste de significante correlaties tussen parameters voor oestrogene verstoring (gisttest in waterstalen, VTG in mannelijke blankvoorn) en indices voor de evaluatie van levensgemeenschappen (IBI, BBI). In hoofdstuk 4 wordt hier verder op ingegaan.

De studie concludeert dat het onderzoek duidelijk heeft aangetoond dat natuurlijke vispopulaties, zoals blankvoorns, aan stoffen met oestrogene activiteit worden blootgesteld met ingrijpende veranderingen in bloed en geslachtsorganen tot gevolg. De studie besluit met een aanbeveling voor een gerichte aanpak in ons milieubeleid naar de aard en de bron van deze stoffen met pseudo-oestrogene activiteit en een lange termijn studie op reproductiesucces van natuurlijke vispopulaties (Berckmans *et al.*, 2007).

### 2.3 Hormoonverstoring in grondel en biermpje in Wallonië.

Douxfils *et al.* (2007) beschrijven de resultaten van een onderzoek naar hormoonverstoring in zoetwatervis in Wallonië (op de rivier Vesder).

Rioolwaterzuiveringsinstallaties worden vaak geassocieerd met het vrijkomen van xenobiotica<sup>3</sup> en hormonale verstoring bij vissen bemonsterd stroomafwaarts RWZI's werd veelvuldig gerapporteerd. Om de effecten van de behandeling van afvalwater (en de aanwezigheid van RWZI's) te beoordelen, werd eventuele hormoonverstoring nagegaan bij twee indicatorsoorten (de riviergrondel *Gobio gobio* en het biermpje *Barbatula barbatula*), waarbij op twee RWZI's individuen van beide soorten zowel stroomop- als stroomafwaarts onderzocht werden.

Gonadosomatische index, histologische (testiculaire en ovariële stadia, atretische follikels, interseksualiteit) en endocriene (geslachtshormonen, aromatase activiteit, alkali-labiele fosfor) parameters werden bepaald. Er werden geen *significante* verschillen aangetoond tussen stroomopwaartse en stroomafwaartse sites, ongeacht de RWZI, de soort of de bemonsteringsperiode. Echter, vrouwelijke biermpjes stroomafwaarts de RWZI's vertoonden bepaalde kenmerken van voortplantingsschade en endocriene verstoring (verminderde GSI, eicel diameter en ALP concentraties, verhoogd aandeel van atretische follikels, veranderingen in gonadale aromatase-activiteit en de plasmaspiegels van 11 KT-en T). Enkele significante veranderingen werden waargenomen voor zowel mannelijke als vrouwelijke riviergrondel, doch niet voor mannelijke biermpjes. Plasma E2 concentratie gemeten in mannelijke grondels op alle sites waren even hoog als bij vrouwelijke individuen. In één rivier was de spermatogenese bij riviergrondel uitgesteld (zowel stroomop- als stroomafwaarts de RWZI), vergeleken tot de andere rivier, wat op een verhoogde oestrogeniciteit wijst.

---

<sup>3</sup> *Xenobiotische stoffen zijn stoffen die in een organisme gevonden worden, maar onder gewone omstandigheden niet door dat organisme worden gemaakt of waarvan niet verwacht wordt dat ze aanwezig zijn in dat organisme.*

### 3 Impact van hormoonverstoring op het behalen van de doelstellingen van de Habitatrictlijn

De Habitatrictlijn heeft als doelstelling het behoud en herstel van de natuurlijke habitatten en de wilde dier- en plantensoorten die van Europees belang zijn. Afhankelijk van hun beschermingsstatus worden Habitatrictlijnsoorten in verschillende categorieën ingedeeld. Voor Bijlage II soorten moeten de lidstaten speciale beschermingszones aanwijzen. Voor Bijlage IV soorten zijn algemene beschermingsmaatregelen nodig, terwijl voor Bijlage V soorten de lidstaten, indien nodig, maatregelen moeten treffen om te zorgen dat het aan de natuur onttrekken en de exploitatie van deze soorten niet ten koste gaat van hun behoud.

De globale beoordeling van de soorten dient rekening te houden met volgende vier evaluatiecriteria: Aeraal - Populatiegrootte, -trend en -structuur - Leefgebied - Toekomstperspectieven.

Tabel 3 geeft een overzicht van de Habitatrictlijnsoorten waarvoor België moet rapporteren.

**Tabel 3.** Overzicht van de HRL vissoorten met hun habitatrictlijn categorie (HRL-cat) (bijlagen II, IV en V) van belang in Vlaanderen met hun huidige Rode Lijst status (RL) in Vlaanderen (Verreycken et al., 2013), en indicaties over migratie- (MIG) en reproductiegedrag (REP), en maximale leeftijd (Max Age in jaren) volgens Froese & Pauly, 2013. LC Least concern – Momenteel niet in gevaar; NT Near threatened – Bijna in gevaar; VU Vulnerable – Kwetsbaar; CR Critically endangered – Ernstig bedreigd; P Potamodroom, A Anadroom, S Semelpaar, I Iteropaar.

Soort	HRL-cat	RL	MIG	REP	Max Age
Beekprik, <i>Lampetra planeri</i>	II	VU	P	S	7
Bittervoorn, <i>Rhodeus amarus</i>	II	LC	P	I	5
Grote modderkruiper, <i>Misgurnus fossilis</i>	II	CR	P	I	?
Kleine modderkruiper, <i>Cobitis taenia</i>	II	NT	P	I	5
Rivierdonderpad, <i>Cottus gobio</i>	II	VU	P	I	10
Vlagzalm, <i>Thymallus thymallus</i>	V	CR	P	I	14
Barbeel, <i>Barbus barbus</i>	V	VU	P	I	25
Rivierprik, <i>Lampetra fluviatilis</i>	II, V	VU	A	S	Normaal 4-7 max 10
Fint, <i>Alosa fallax</i>	II, V	CR	A	I	25
Zalm, <i>Salmo salar</i>	II, V	CR	A	S	13
Zeeprik, <i>Petromyzon marinus</i>	II	CR	A	S	11

Door Louette et al. (2013) werd recentelijk gerapporteerd over de staat van instandhouding van habitattypen en soorten van de Habitatrictlijn voor de periode 2007-2012.

De staat van instandhouding van barbeel, beekprik, fint, grote modderkruiper en rivierprik wordt voor de periode 2007-2012 als *zeer ongunstig* beoordeeld. Kleine modderkruiper en rivierdonderpad krijgen de beoordeling *matig ongunstig* en bittervoorn *gunstig* (Tabel 4, Louette *et al.*, 2013).

**Tabel 4.** *Overzicht van de staat van instandhouding van de HRL-vissoorten periode 2007-2012 (FV = gunstig; U1 = matig ongunstig; U2 = zeer ongunstig) in Vlaanderen met een inschatting van de algemene trend ten opzichte van de periode 2001-2006 (+ toenemend; = stabiel; - afnemend). AR areaal, POP populaties, LGB leefgebied, TP toekomstperspectieven, TOT eindbeoordeling. Voor populaties, leefgebied, toekomstperspectieven en de eindbeoordeling wordt de trend weergegeven. Uit Louette *et al.* (2013).*

	<b>AR</b>	<b>POP</b>	<b>LGB</b>	<b>TP</b>	<b>TOT</b>	<b>TREND</b>
Barbeel	FV	U2 -	U1 =	U1 +	U2 -	-
Beekprik	FV	U2 -	U2 +	U1 +	U2 -	-
Bittervoorn	FV	FV	FV	FV	FV	=
Fint	U2 +	U2 +	U2 +	U2 +	U2 +	+
Grote modderkruiper	U2 =	U2 -	U2 -	U2 -	U2 -	-
Kleine modderkruiper	FV	U1 +	U1 +	U1 +	U1 +	+
Rivierdonderpad	FV	U1 +	U1 +	U1 +	U1 +	+
Rivierprik	U2 +	U2 +	U2 +	U2 +	U2 +	+

De toestand van de Habitatrichtlijnsoorten wordt beïnvloed door tal van antropogene stressoren zoals habitatfragmentatie en migratiebelemmeringen, urbanisering, recreatie, uitheemse soorten, opstuwing, indijking, slibruiming, kanalisatie, verdroging, verloederde waterkwaliteit en vervuiling door toxische stoffen. Uit het recente verleden is goed gedocumenteerd hoe de algemene achteruitgang van de waterkwaliteit de visstand op veel rivieren gedecimeerd heeft in de loop van de twintigste eeuw, en hoe in recentere jaren de waterkwaliteitsverbetering ertoe geleid heeft dat een aantal soorten zich herstelden (Vrielynck *et al.*, 2003).

Niet alle stressoren hebben een even grote impact afhankelijk van de soort. Momenteel is nog onvoldoende onderzoek gebeurd om eenduidig vast te stellen welke factoren in Vlaanderen de grootste rol spelen in de achteruitgang van een welbepaalde soort. Maar uit het aanbod aan wetenschappelijke evidentie wereldwijd staat vast dat de aanwezigheid van pollutanten in onze watersystemen, zeer nefaste effecten op vispopulaties kunnen induceren. Niet zelden (maar niet uitsluitend) uiten die effecten zich op het vlak van hormoonverstoring en komt de reproductiecapaciteit van blootgestelde soorten in het gedrang.

Uiteraard zijn de ecologische en fysiologische kenmerken van de soort van groot belang bij het begrijpen en voorspellen van het verband van hormoonverstoorders en de toestand van de soort. Zo zullen carnivore soorten via biomagnificatie<sup>4</sup> door hun voedingspatroon over het algemeen veel meer EDC's opnemen dan planteneters. Veel EDC's zijn lipofiele stoffen en vetrijke soorten zullen doorgaans meer EDC's opstapelen dan vetarme soorten. Anadrome soorten die een groot deel van hun tijd in zee opgroeien zullen doorgaans ook minder EDC's opgestapeld hebben ten opzichte van soorten die hun ganse leven in (door oestrogenen meer vervuild) zoetwater doorbrengen. Maar voor bloedzuigende soorten (zeeprik, rivierprik) die op zee (en in de rivier) op grotere roofvissen en zeezoogdieren parasiteren is deze voedingswijze wellicht ook een voorname bron van blootstelling aan EDC's. Ook leeftijd en reproductiewijze zijn van belang. Langlevende soorten kunnen gedurende langere tijd contaminanten opstapelen en de EDC gehalten kunnen dus na

<sup>4</sup> *Onder biomagnificatie wordt verstaan het ophopen van (giftige) stoffen in organismen door opname via het voedsel. Door biomagnificatie is er een stapsgewijze toename in de concentratie van persistente stoffen in het organisme naarmate men hogerop in de voedselketen meet.*

verloop van tijd hoger worden dan bij kortlevende vissoorten. Semelpare soorten hebben maar één kans om vruchtbare nakomelingen voort te brengen, terwijl iteropare vissen meerdere malen in hun leven tot voortplanting komen en via maternale transfer elke keer een deel van hun opgestapelde stoffen doorgeven. Gezien bij semelpare soorten (zoals de zalm) het energiemetabolisme buitengewoon belangrijk is voor een geslaagde reproductie, en contaminanten en chemische stress de energiefysiologie danig in de war kunnen sturen, zijn deze soorten ook via verstoring van het energiemetabolisme bijkomend onderhevig aan de effecten van contaminanten.

Verspreiding en habitatverschillen tussen deze Habitatrichtlijnsoorten zullen ook de aard en het niveau van de contaminanten waar ze aan blootgesteld zijn sterk beïnvloeden. Soorten uit kleinere beken in bovenstroomse gebieden (zoals kleine modderkruiper, rivierdonderpad, beekprik) leven meestal in agrarische omgeving en hun pollutiedruk wordt dus overheerst door pesticiden, ten opzichte van soorten zoals barbeel en bittervoorn, die meestal in lager gelegen grotere rivieren voorkomen (zoals de Maas voor de barbeel) waarbij hun belastingsdruk vooral gekenmerkt wordt door PCB's en metalen.

Bovendien is in Vlaanderen de verspreiding, de intensiteit en het profiel van in biota opgestapelde vervuiling door POP's en metalen zeer verschillend tussen bekkens, rivieren en mogelijk zelfs tussen verschillende meetplaatsen op eenzelfde rivier (Belpaire *et al.*, 2008).

Hierna geven we per Habitatrichtlijnsoorten een overzicht van relevante informatie.

### 3.1 *Cottus gobio*, rivierdonderpad

Volgens recent taxonomisch en genetisch onderzoek is rivierdonderpad *Cottus gobio* een complex van acht soorten met verschillende ecologische kenmerken. In Vlaanderen komen twee inheemse soorten voor: *Cottus rhenanus* (beekdonderpad) en *Cottus perifretum* (rivierdonderpad). Daarnaast is er nog een kleine populatie van niet-inheemse *Cottus gobio* (Europese rivierdonderpad) aanwezig (Geeraerts en Quataert, 2012a).

De soort(en) is (zijn) iteropaar. Rivierdonderpad leeft in natuurlijke, vrij meanderende waterlopen, van hoge waterkwaliteit, met aanwezigheid van hard substraat en afwezigheid van sedimentatie door leem of slib. De soort(en) vindt men meestal terug in boven- en benedenlopen in agrarische milieus, maar ook op de Maas is een populatie aanwezig. Daardoor valt het te verwachten dat zowel pesticiden, maar ook PCB's en metalen (voor de Maaspopulatie in het bijzonder) de rivierdonderpadpopulaties kunnen beïnvloeden.

Er zijn enkele gedocumenteerde gevallen van studies over de effecten van pesticiden op de populaties van rivierdonderpad of verwante soorten. De drie volgende voorbeelden illustreren duidelijk de potentiële chronische impact van pesticiden op rivierdonderpadpopulaties. De hier beschreven effecten zijn ruimer dan enkel hormonale verstoring van de reproductie.

Naar aanleiding van een toenemend aantal gevallen van vissterfte geassocieerd aan agrarisch landgebruik (en meer specifiek aardappelteelt) in Canada werden Canadese rivierdonderpadpopulaties *Cottus cognatus* (een verwante soort) bestudeerd in een aantal meetplaatsen gelegen in bos en landbouwzones (Gray en Munkittrick, 2005). In vergelijking met de bospopulaties vertoonden de rivierdonderpadden uit landbouwmilieus een reductie in het aantal jonge vissen, zij hadden kleinere eieren en een lagere fecunditeit en vertoonden een reductie in afmeting van de gonaden. Deze verschillen zijn rechtstreeks of onrechtstreeks gerelateerd aan reproductieve verstoring. Gereduceerde vruchtbaarheid in vissen uit agrarische milieus werd al eerder gerapporteerd (Fitzgerald *et al.*, 1999). Vruchtbaarheid wordt beschouwd als een gevoelige indicator voor de blootstelling aan xenobiotische stoffen, en reproductieve verstoringen worden als biomerker vrij algemeen gebruikt omwille van de hoge ecologische waarde en het aangetoond verband met anthropogene stress (Greeley, 2002).



In een Franse studie (Jolly *et al.*, 2012) op het rivierbekken van de Vesle werd via multi-biomerkers, met inbegrip van immunotoxiciteitsmerkers, het effect van stedelijke en agrarische druk op rivierdonderpadpopulaties *C. gobio* onderzocht. Een set van biochemische, immunologische, fysiologische en histologische parameters werd onderzocht op rivierdonderpaden van vijf meetplaatsen gekenmerkt door variërende milieudruk. De resultaten toonden een duidelijke impact van milieudruk op de gezondheid van deze rivierdonderpaden (verscheidene biologische effecten) en immunologische status.

Ook genotoxische<sup>5</sup> effecten zijn te verwachten. In Vlaanderen hebben Knaepkens *et al.* (2002) aangetoond dat de genetische diversiteit van rivierdonderpadpopulaties positief gecorreleerd is met hun conditie. Verlaagde genetische diversiteit werd in verband gebracht met extreme milieudruk door verontreiniging en verstoringen van het habitat. Bovendien was er in 6 van de 8 bestudeerde gevallen sprake van tekenen van 'population bottlenecks' (Knaepkens *et al.*, 2002). Ook dit zijn signalen die er op wijzen dat dergelijke populaties bij aangehouden milieudruk op termijn zullen verdwijnen.

Het is echter ook mogelijk dat individuen uit populaties onder druk ook fysiologische adaptaties vertonen als gevolg van de blootstelling. Zie Johnson (1968) voor voorbeelden van dergelijke resistentie. Voor de rivierdonderpad werd dat beschreven voor blootstelling aan fenol. Individuen uit populaties blootgesteld aan fenolvervuiling stroomafwaarts het effluent van papierfabrieken, vertoonden minder schadelijke effecten in vergelijking tot niet-blootgestelde populaties bij blootstelling aan sublethale concentraties onder gecontroleerde omstandigheden (Bucher en Hofer, 1993).

### 3.2 *Barbus barbus*, barbeel

Barbeel is een grote, langlevende iteropare soort, en een typische riviervis die wordt aangetroffen in de middenloop van de rivier, in zuurstofrijk, matig tot snelstromend water met een schone bodem van zand, grind en keien. Waterverontreiniging is een van de redenen voor de achteruitgang van de barbeelstand in het stroomgebied van de Maas (Geeraerts en Quataert, 2012a). De soort komt in Vlaanderen vooral in de Maas voor. De Maas is een van onze meest vervuilde waters qua PCB-belasting, maar ook de concentraties aan sommige metalen zijn er hoog (Maes *et al.*, 2008). Van de karperachtigen is barbeel een van de soorten die binnen de rivier het meest migreren. Een trekkende barbeel kan zelfs in 37 dagen een afstand van 300 km afleggen in stroomopwaartse richting (Dottrens (1952; in Banarescu & Bogutskaya, 2003)). In het voorjaar zoeken de vissen de hoger gelegen gedeelten in de rivier op die zij in het najaar door de grotere waterafvoer hebben moeten verlaten. In het najaar is er juist een tendens om rustiger en dieper water op te zoeken om te overwinteren. Deze migraties vinden plaats binnen de barbeelzone van de rivier. In mei en juni trekt een deel van de barbeelpopulatie de rivier op om te paaien op vlakke kiezelbeddingen met een flinke stroming (Geeraerts en Quataert, 2012a). De soort kan dus onderhevig zijn aan verschillende profielen en intensiteiten van chemische belasting afhankelijk van de plaats waar hij zich tijdens deze seizoensale migraties bevindt.

In een wilde populatie van barbeel van het Belgische deel van de Maas werden extreem hoge PCB-gehalten gemeten. De gehalten namen toe in functie van de leeftijd, maar er was geen significant verschil tussen mannelijke en vrouwelijke barbelen. Monoxygenase activiteit (ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) en ethoxycoumarine o-deethylase (ECOD) en het cytochroom P-450 waren nauw gecorreleerd met de PCB-concentratie in vislever. De studie besluit (op basis van vergelijking met andere studies) dat de chronische negatieve effecten van PCB's een rol gespeeld hebben in de achteruitgang van barbeelpopulaties in sterk vervuilde gebieden (Hugla *et al.*, 1995).

---

<sup>5</sup> Genotoxische stoffen zijn chemische stoffen die het DNA beschadigen en zo erfelijke veranderingen kunnen veroorzaken.

Volwassen barbelen uit Wallonië werden via voeding besmet met Aroclor 1260, een commercieel PCB-mengsel, aan milieurelevante concentraties. Een significante toename van cytochroom P450 werd waargenomen en de bijzonder gevoelige enzymen, EROD en ECOD, waren sterk geïnduceerd. Elektronenmicroscopie toonde veranderingen aan in de leverultrastructuur bij de besmette vis (toename in het aantal cisternae van de ruwe endoplasmatisch reticulum, drastische glycogeen-depletie, ontbinding van mitochondriale inhoud en het voorkomen van myeline figuren). Verontreiniging werd ook bestudeerd in relatie tot reproductief succes. PCB's veroorzaakten wijzigingen in vrouwelijke reproductieve parameters. De totale mortaliteit van eieren en larven verhoogde significant in relatie tot het PCB-gehalte in de eieren. De meest vervuilde vis kwam zelfs niet eens tot paaien. De waargenomen effecten bleken reversibel na beëindiging van de intoxicatie, soms al na een ontgiftingsperiode van 1 jaar (Hugla en Thomé, 1999).

Endocriene verstoring en vervrouwelijking van mannelijke barbelen werd onderzocht tijdens een 4-jaar durende studie in de rivier Jihlava (Donau-bekken, Tsjechië) (Penaz *et al.*, 2005). De geslachtsstatus van 993 gemerkte barbelen werd temporeel onderzocht, en histologische verificatie van het geslacht werd uitgevoerd in 149 specimens. Op 343 teruggevangen vissen, hadden zes exemplaren verstoorde (protandrische) gameet productie. Histologisch gonadaal onderzoek toonde interseksualiteit aan : sporadisch (2.0%) in rivierstroken met relatief lage organische belasting en vaker (14.8%) in stroken met hogere organische vervuiling. Vitellogenine gehalten in bloedplasma van mannetjes fluctueerden sterk, met mediaanwaarden van 0.190 µg/ml in de matig vervuilde zones, en 0.732 µg/ml in sterk verontreinigde stroken. Deze verstoringen lijken het gevolg van lokale belasting door xenoestrogenen.

Vigano *et al.* (2001) beschreven het voorkomen van interseks bij een nauw verwante barbeelsoort (*Barbus plebejus*) in de rivier Po, op twee sites stroomop- en stroomafwaarts de confluente met de vervuilde zijrivier Lambro. Enkel in de stroomafwaartse site werd interseks waargenomen (via histologie van de gonaden). 50% van de onderzochte barbelen (N = 16) vertoonden interseks gonaden. De zijrivier Lambro wordt beschouwd als een vervuiliingsbron van EDC's. In later onderzoek (Vigano *et al.* 2006) werd de hormonale verstoring van dezelfde barbeelsoort bevestigd, en in verband gebracht met oestrogene vervuiling in invertebraten en riviersediment (met metingen van o.a. estrone [E1], 17b-estradiol, estriol [E3], 17a-ethinylestradiol, 4-nonylphenol [NP], 4-tert-octylphenol [tOP], 4-n-octylphenol, en bisphenol A). Naast de adulten bleken ook al de juveniele barbelen verstoorde gonaden te vertonen.

### 3.3 *Lampetra planeri*, beekprik

Beekprik is een semelpare soort welke niet migreert en er geen parasitaire levenswijze op nahoudt. De beekprik leeft het grootste deel van zijn leven als larve (ammocoetes) in de bodem van beken met langzaam tot matig snelstromend water en een zandige bodem. In dit watertype zitten de larven ingegraven op plekken met slib dat rijk is aan organische stoffen. Uit het slib filteren de larven hun voedsel. Wanneer ze zes jaar oud zijn, vindt vanaf eind juni de metamorfose plaats. De dan volwassen geworden beekprik leeft nog maar een half jaar om te kunnen paaien; na het larvale stadium neemt hij geen voedsel meer op (Geeraerts en Quataert, 2012a). Zijn verspreiding is beperkt tot kleine en grotere beken van midden- en meestal bovenloop, en hierdoor is deze soort vooral blootgesteld aan pesticiden.

Er zijn geen gegevens bekend omtrent het al dan niet voorkomen van endocriene verstoring bij beekprik.

### 3.4 *Rhodeus amarus*, bittervoorn

Bittervoorn is een vissoort van traagstromende beken en rivieren met een hoge tot vrij hoge waterkwaliteit en van stilstaande wateren zoals vijvers, plassen, sloten en afgesloten

riviermeanders met een goed ontwikkelde waterplantenvegetatie. Bittervoorns worden vooral in de plantenrijke oeverzone aangetroffen (fytofiel) of in de zachte stroom voor rivierduikers. Voor de voortplanting is bittervoorn afhankelijk van de aanwezigheid van zoetwatermosselen (van het geslacht *Unio* of *Anodonta*) waarin de eieren afgelegd worden (Mills en Reynolds, 2004; Smith *et al.*, 2004). Bittervoorn is een zoetwatervissoort en kan vermoedelijk geen hoge concentratie zout verdragen; harde gegevens zijn hierover niet bekend (Adriaens *et al.*, 2008).

Bittervoorn is bijzonder gevoelig voor vervuiling. Dit geldt niet zozeer voor organische vervuiling of huishoudelijk afval, maar vooral voor industriële vervuiling (de Lange en Van Emmerik, 2006). Frequente ruiming van beken en rivieren is nadelig omdat hiermee waterplanten en zoetwatermosselen verwijderd worden (Decler, 2007; Geeraerts en Quataert, 2012a).

Er zijn geen gegevens bekend omtrent het al dan niet voorkomen van endocriene verstoring bij bittervoorn.

Gezien zijn voortplantingswijze is het mogelijk dat belasting door EDC's ook onrechtstreeks plaatsvindt via schade op zoetwatermosselen.

### 3.5 *Misgurnus fossilis*, grote modderkruiper

Grote modderkruiper is een iteropare soort van zowel traagstromend als stilstaand, ondiep en plantenrijk water met een goede waterkwaliteit, een dikke modderlaag en veel plantenresten. De diepte bedraagt meestal niet meer dan maximaal 1.5 m met een geleidelijk oplopende oeverzone (van Beek, 2003). Grote modderkruiper kan een veelheid van biotopen bewonen door ongunstige perioden te overbruggen via huid- en darmademhaling of een rustperiode (van Beek, 2003). Een belangrijk leefgebied van grote modderkruiper zijn de overstromingsvlakten van rivieren. Oude rivierarmen waarin verlandingsprocessen optreden geven een structuurrijk habitat (Käfel, 1991). Het water hoeft niet zuurstofrijk te zijn: dankzij de verschillende vormen van ademhaling, kan de grote modderkruiper zich in zuurstofarm water uitstekend redden. Ook perioden van grote droogte, waarin de watertemperatuur behoorlijk kan oplopen of het water zelfs geheel opdroogt, kan de grote modderkruiper overbruggen. In de bodem ingegraven wacht hij dan op het aanbreken van gunstigere leefomstandigheden (van Beek, 2003). De toestand van deze vissoort is zeer ongunstig vooral wegens de verdwijning van geschikte leefgebieden door drainage van moerassen, intensief waterbeheer en vervuiling van het water (van Beek, 2003). Grote modderkruiper werd bij recente inventarisaties van beken en rivieren in Vlaanderen slechts zeer zelden aangetroffen en steeds in geringe aantallen.

Er zijn ons geen studies bekend over endocriene verstoring bij *Misgurnus fossilis*. Bij de verwante soort, de Chinese modderkruiper (*Misgurnus anguillicaudatus*) werden mannelijke dieren blootgesteld aan 17 $\beta$ -oestradiol (E2). De gonadosomatische index, de totale plasma-eiwit, totaal plasma calcium, magnesium en zink, en plasma VTG werden bepaald. Er waren geen significante veranderingen in de GSI tussen blootgestelde en controlegroepen, maar alle E2 blootstellingen induceerden de productie van VTG binnen 7 dagen. Ook totale plasmaproteïnen, totaal plasma calcium en magnesium correleerden significant met plasma VTG, bij hogere concentraties (Xuefei *et al.*, 2006). De studie concludeert dat deze Chinese modderkruiper gevoelig is voor oestrogene stoffen en geschikt is als potentiële indicatorsoort in het veld en in laboratoriumstudies (Xuefei *et al.*, 2006).

Gelijkaardige resultaten werden verkregen na blootstelling van dezelfde soort aan bisphenol A (BPA) (Xuefei *et al.*, 2007).

Ook op dezelfde Chinese modderkruiper (*Misgurnus anguillicaudatus*) werden de effecten van endosulfan nagegaan. Dit insecticide veroorzaakte o.a. vitellogenese, cytochrom P450 inductie, AChE schade en DNA-schade bij vissen uit de blootgestelde condities. De auteurs concluderen dat endosulfan als EDC optreedt in benthische zoetwatervis. Daarnaast kunnen deze biomerkers

worden gebruikt voor de monitoring van endosulfan contaminatie in aquatische ecosystemen (Seok-Ki Min *et al.*, 2010).

Deze studies op een verwante soort lijken aan te geven dat het geslacht *Misgurnus* gevoelig is voor hormonaal versturende stoffen, en wellicht is dit in Vlaanderen ook het geval. Door de beperkte verspreiding en moeilijke vangbaarheid van de soort is het echter wellicht niet haalbaar om op deze soort onderzoek naar de toestand en effecten van EDC's in veldpopulaties uit te voeren.

### 3.6 *Cobitis taenia*, kleine modderkruiper

De kleine modderkruiper is iteropaar en is een kortlevende soort (maximale leeftijd 5 jaar). Het is een typische bodembewoner van beken en rivieren, maar ook van sloten en vijvers met een zandbodem en een goede waterkwaliteit. In heel wat beken in het bekken van de Kleine Nete wordt kleine modderkruiper nog regelmatig gevangen. In het bekken van de Grote Nete wordt de soort sporadisch aangetroffen in de Grote Nete zelf en de Molse Nete. De laatste jaren zijn er meer en meer vangsten in het IJzerbekken, op de IJzer zelf maar ook in enkele van de zijbeken en in polderwaterlopen. Uit de stromende wateren van het stroomgebied van de Maas is de soort zo goed als verdwenen, met uitzondering van het Merkske en de Hammonterbeek, en recente meldingen uit de Grensmaas. Sporadische vondsten zijn bekend van enkele beken in het Beneden-Zeescheldebekken (Geeraerts en Quataert, 2012a).

Ook triploïde vrouwelijke exemplaren kunnen voorkomen, deze produceren triploïde eieren die zonder bevruchting kunnen ontwikkelen. Deze eieren hebben wel contact met sperma nodig om de ontwikkeling te starten (gynogenese)(Freyhof, 1999; Sokolov en Berdicheskii, 1989). Mogelijks is dit ook een strategie die de gevolgen van endocriene verstoring kan beperken.

Er werden geen literatuurgegevens gevonden omtrent endocriene verstoring bij kleine modderkruiper.

### 3.7 *Thymallus thymallus*, vlagzalm

Er is weinig onderzoek gedaan naar de effecten van contaminanten op de vlagzalm. Toch werd er (reeds in 1991) een hermafrodiete vlagzalm beschreven uit Polen (Blachuta *et al.*, 1991), waarbij op de gonaden zowel ovarieel als testiculair weefsel aangetroffen werd.

Een onderzoek naar de effecten van blootstelling van vlagzalmembryo's aan methyalkwik gaf aan dat drie jaar na blootstelling de voedselopname en competitiviteit in de proefdieren verstoord was (Fjeld *et al.*, 1998). De onderzochte concentraties waren milieurelevant en de studie concludeert dat methyalkwik een ecologische impact kan hebben door een verlaagde fitness van de betrokken populaties.

### 3.8 *Lampetra fluviatilis*, rivierprik

Rivierprik is een semelpare, anadrome vissoort waarvan de levenscyclus gesloten is in het Schelde-estuarium, hoewel er tot op heden echter geen informatie beschikbaar is over de paai- en opgroehabitaten van deze soort. De soort brengt een groot deel van zijn leven door als ammocoete of larve (gemiddeld vier jaar) op slibrijke plekken in de bodem van rivieren en beken. De larven van rivierprik verlaten het sediment na 4.5 tot 9 jaar, ze metamorfoserend bij een lengte van ca 13 cm, en migreren geleidelijk stroomafwaarts naar zee. Volwassen rivierprikken verblijven minstens anderhalf jaar in het mariene milieu alvorens terug te keren naar het zoetwater om zich

voort te planten (Stevens *et al.*, 2011). Nadat de voortplanting heeft plaatsgevonden sterft rivierprik (Geeraerts en Quataert, 2012a).

Rivierprikken worden dus blootgesteld aan schadelijke toxische stoffen tijdens de opgroei als ammocoete op de rivier, en later in de groeifase via parasitisme op andere vissen in zee. Literatuuronderzoek leverde echter geen informatie omtrent endocriene verstoring bij de rivierprik.

### 3.9 *Alosa fallax*, fint

De fint is een anadrome soort, iteropaar, met als Rode Lijst status *ernstig bedreigd*. Daar waar finten massaal de Zeeschelde optrokken begin vorige eeuw, is de populatie verdwenen samen met de achteruitgang van de waterkwaliteit in de loop van de twintigste eeuw. De laatste jaren lijkt de soort zich zeer geleidelijk terug aan het herstellen.

De paaiplaatsen liggen stroomopwaarts op de hoofdstroom van de rivier. Finten trekken niet ver de rivier op, soms wordt al in het estuarium gepaaid. In vele rivieren trekken ze op tot de plaats waar de getijdewerking niet meer merkbaar is. In het estuarium groeien de larven op tot een lengte van 10 tot 12 centimeter, alvorens naar zee te trekken. Na twee jaar keren sommige vissen terug om af te paaien. De finten hebben dan een lengte bereikt van circa 30-40 cm. Finten kunnen meerdere malen paaien tot een leeftijd van 7 à 8 jaar (de Laak, 2009; Geeraerts en Quataert, 2012a).

Ook voor fint lijken vooral waterkwaliteit, toxische stoffen en mogelijk ook de kwaliteit van de paaiplaatsen verantwoordelijk voor het verdwijnen van de soort.

Er zijn geen rapporten beschikbaar met specifieke informatie over het voorkomen of de effecten van hormoonverstoorders of andere toxische stoffen op de fint.

Wel hebben Fairchild *et al.* (1999) in Canada op de verwante soort *Alosa aestivalis*, de achteruitgang in rekrutering in verband gebracht met de grootschalige bestrijding van een sparrparasiet met Matacil 1.8D waar in het oplosmiddel een EDC aanwezig was (zie voor meer details onder 'zalm').

### 3.10 *Salmo salar*, zalm

Semelpare, anadrome soort die tot circa 1920 waargenomen werd in de Schelde, Rupel, Durme, Nete, Dijle en Demer, maar vooral in het Maasbekken. Migrerende vis bij uitstek waarvan de populaties ineengestort zijn als gevolg van migratiebelemmeringen, slechte waterkwaliteit en visserij.

Jonge stadia verblijven enkele jaren in het zoetwater en migreren dan naar zee waar ze 1 tot 4 jaar verder opgroeien, om nadien naar hun geboorteplaats terug te keren om te paaien. Atlantische zalm wordt tot 10 jaar oud, maar de meesten bereiken slechts een leeftijd van 4 tot 6 jaar.

Mannelijke dieren sterven meestal af na het paaien, terwijl een minderheid (10-40%) van de vrouwelijke zalmen terug naar zee kunnen trekken of in de lageregelegen rivierzones overleven om het daaropvolgende jaar terug een paaimigratie uit te voeren.

Vervuiling door toxische stoffen kan dus zowel in de juveniele stadia in het zoet water optreden, als tijdens de verdere opgroei op zee.

Dill *et al.* (2002) geven een overzicht van waterkwaliteitsparameters (met aandacht voor EDC's) die de Atlantische zalm kunnen beïnvloeden.

Endocriene verstoorders worden verondersteld effecten te hebben op de smoltificatie<sup>6</sup> in Atlantische zalm via het verstoren van het hormonaal systeem betrokken in de fysiologische aanpassingen voor het leven in zout water (Fairchild *et al.*, 1999).

Fairchild *et al.* (1999) beschrijven de mogelijke rol van een EDC in de achteruitgang van de Canadese zalmpopulaties. Tussen 1975 en 1985 werd in de Canadese bossen Matacil 1.8D grootschalig toegepast ter bestrijding van een sparrparasiet. Matacil 1.8D bevat het carbamaat insecticide aminocarb, met 4-nonylphenol (4-NP, een bekende hormoonverstorende stof) als primair oplosmiddel. Na behandeling viel de geschatte rivierwaterconcentratie van 4-NP binnen een bereik waarin oestrogene effecten kunnen worden verwacht. Er was een daling van de terugkerende volwassen Atlantische zalm in gebieden waar het bestrijdingsmiddel was toegepast. Blootstelling aan 4-nonylphenol induceerde vitellogenine in zalmsmolts op dezelfde wijze als bij blootstelling aan 17  $\beta$ -oestradiol (Sherry *et al.*, 2001).

Moore en Lower (2001) toonden aan dat blootstelling van smolt aan atrazine (een triazine herbicide) en pentabroomdifenyylether (een broomhoudende brandvertrager), kieuw Na / K-ATPase activiteit verminderde, osmoseregulatorische verstoring veroorzaakte, alsook verhoogde cortisol niveaus, verminderde overleving in zeewater, en verminderde migratieactiviteit. Magee *et al.* (2001) rapporteerden gelijkaardige effecten in molts op de Narraguagus rivier (US).

Blootstellingsproeven van zalm met verschillende EDC's waaronder *o,p'*-DDT, lindaan en bisphenol-A had een dosisafhankelijke VTG inductie tot gevolg (Celius *et al.*, 1999).

Op basis van de wijdverspreide aanwezigheid van een grote verscheidenheid aan EDC's in zalmrivieren in Maine werd geconcludeerd dat EDC's er een hoge probabibiliteit hebben om een negatieve impact te hebben op het herstel van de zalm (Dill *et al.*, 2002).

### 3.11 *Petromyzon marinus*, zeeprik

Anadrome, semelpare soort met een Rode Lijst status van *ernstig bedreigd*, welke in Vlaanderen slechts occasioneel in de Zeeschelde waargenomen wordt.

De soort is gekenmerkt door belangrijke migraties. De zeeprik brengt zijn volwassen leven in de zee door (20-36 maanden). Volwassen zeeprikken zijn parasitair, en hechten zich vast aan walvisachtigen en grote vissen met behulp van hun scherpe tanden en voeden zich met bloed, lichaamsvocht en vlees van hun gastheer. Ze trekken rivieren en beken op om te paaien in het voorjaar (van enkele kms tot 850 km landinwaarts). De larven (ammocoetes) bewegen stroomafwaarts en begraven zich in detritus-rijke modder, slib of zand bodems voor 5.5-8 jaar. Ammocoetes zijn filter feeders van diatomeeën en detritus. Bij de metamorfose gaan ze stroomafwaarts richting zee trekken. Juvenielen blijven in de riviermondingen en ondiepe kustgebieden waar ze zich voeden gedurende 23-28 maanden, ze groeien dan uit van ca 4 tot 900 g (Froese en Pauly, 2013).

Er zijn geen concrete indicaties waarom de soort in het Scheldebekken verdween in de loop van de twintigste eeuw. Waarschijnlijk is algemene waterkwaliteit en contaminanten de belangrijkste oorzaak, maar ook de structuurkwaliteit van de bodem ter hoogte van de paaiplaatsen en de opgroeiplaatsen van de ammocoetes kan een impact gehad hebben.

---

<sup>6</sup> De reeks van fysiologische, morfologische, biochemische en gedragsveranderingen dat het parr stadium in zalmachtigen ondergaat ter voorbereiding van de zeevaartse migratie en de overgang van zoet naar zout.

Er zijn geen literatuurgegevens bekend over hormonale verstoring in zeeprik. Gevoelige periodes waar de blootstelling het hoogst kan zijn, zijn de opgroeiperiode in estuaria (zones die meestal nogal belast zijn door stoffen met oestrogene werking), en de periodes van parasiterende activiteit waar de zeeprikken zich voeden met bloed van zeezoogdieren en grotere vissen en op deze wijze ook nogal wat contaminanten kunnen opstapelen.

## 4 Impact van hormoonverstoring op het behalen van de doelstellingen van de Kaderrichtlijn Water

De doelstelling van de KRW (CEC, 2000) is het behalen van een goede oppervlakte- en grondwatertoestand in de verschillende Europese watersystemen. Om die toestand te meten is de monitoring van de biologische elementen van de te bewaken waterlichamen noodzakelijk, teneinde de ecologische kwaliteit van de geselecteerde waterlichamen op te volgen. De ecologische toestand wordt onder meer beoordeeld aan de hand van vier biologische kwaliteitselementen : visfauna, macro-invertebraten, fyto benthos en macrofyten, fytoplankton.

De beoordeling van de ecologische toestand van de vissen omvat de integratie van kenmerken zoals samenstelling, abundantie en leeftijdsopbouw van de populaties. Deze beoordeling wordt berekend via een ecologische kwaliteitscoëfficiënt (EKC of EQM = ecological quality measure) of kwaliteitsratio (EKR of EQR = ecological quality ratio), een ecologische kwaliteitsmaat met een continue schaal tussen 0 en 1, welke aangeeft in welke mate de visstand afwijkt van de natuurlijke situatie onder onverstoorte condities. Voor vissen wordt de EKC bepaald via het bepalen van de Index voor Biotische Integriteit (Visindex of kortweg IBI, Belpaire *et al.*, 2000). De IBI drukt de similariteit uit van de waargenomen levensgemeenschap (vangstgegevens) tot de natuurlijke levensgemeenschap in een schaal van 0 (helemaal niet gelijkend) tot 1 (volledig overeenstemmend), afhankelijk van de typologie van het waterlichaam.

De IBI is opgebouwd uit metrieken die elk een specifiek aspect van de levensgemeenschap evalueren. Metrieken zijn variabelen, afgeleid uit de biologische gegevens, die ecologische kenmerken van de levensgemeenschap die gevoelig zijn voor antropogene invloeden kwantificeren, zoals bijvoorbeeld de proportie heel gevoelige soorten of – net andersom – eerder ongevoelige soorten die in verstoorte omstandigheden kunnen overleven. Bij een hoge antropogene druk zal de proportie gevoelige soorten afnemen en de proportie ongevoelige soorten toenemen. Door meerdere gevoelige metrieken te bundelen in één index, worden verschillende facetten van de levensgemeenschap onderzocht die samen met een breed spectrum de toestand globaal inschatten (Geeraerts en Quataert, 2012b).

Zowel individuele metrieken als de totale indexscore zullen negatief beïnvloed worden door antropogene stressoren. Zo zal de aanwezigheid van migratiebarrières op een waterloop de toestand van de migrerende soorten bemoeilijken en diversiteit en abundantie gerelateerde metrieken beïnvloeden. Betonnen oevers en afwezigheid van oevervegetatie zullen door de afwezigheid van geschikte paaiplaatsen de scores van de metriek rekrutering doen dalen. Hoge contaminantdruk heeft ontegensprekelijk ook effecten op de visfauna. Hormoonverstorende stoffen zullen specifiek de rekrutering van soorten verstoren en zullen impact hebben op diversiteit, abundantie en leeftijdsopbouw van soorten.

Zoals eerder aangehaald zijn er een veelheid aan rapporten die het verband tussen bepaalde chemische stressoren (bv de aanwezigheid van een RWZI op een waterloop) en effecten op een vissoort beschrijven. Onder labo-omstandigheden is het mogelijk om rechtstreeks het effect te meten van een EDC op de gezondheid van het individu. Onder veldomstandigheden is het echter vaak zeer moeilijk om eenduidig te concluderen welke EDC specifiek verantwoordelijk is voor het meten van een verhoogd niveau in een biomerker indicatief voor endocriene verstoring.

Aangezien er op populatieniveau en in gecontroleerde omstandigheden aangetoond is dat bepaalde EDC's negatieve effecten hebben op de reproductiecapaciteit van sommige vissoorten, tevens met sterke indicaties van effecten op populatieniveau onder veldomstandigheden, is het te verwachten dat de effecten van EDC's zich ook op het gemeenschapsniveau zullen manifesteren.

Gezien hormonale verstoring duidelijk in verband wordt gebracht met een aantal specifieke contaminanten, is het nuttig na te gaan in hoeverre sommige van die contaminanten visgemeenschappen kunnen beïnvloeden. Indien de visdiversiteit door bepaalde stoffen nadelig



beïnvloed wordt, zal dit het behalen van de ecologische kwaliteitsdoelstellingen binnen de Europese Kaderrichtlijn Water (CEC, 2000) hypothekeren.

Hieronder geven we een overzicht van enkele studies over de impact van hormoonontregelaars en andere contaminanten op visgemeenschappen en beoordelingssystemen. Verscheidene studies proberen het verband tussen chemische vervuiling en visdiversiteit op gemeenschapsniveau te achterhalen en gebruiken hiervoor verschillende vis-biodiversiteitsindices (o.a. IBI). Maar ook in deze analyses bemoeilijken de grote variabiliteit aan milieufactoren, gecombineerd met synergetische en cumulatieve interacties van stressoren in aquatische ecosystemen, het kwantificeren van causale verbanden tussen stressoren en effecten (bv gereduceerde biologische diversiteit).

Hall en Giddings (2000) bestudeerden door middel van verschillende grote datasets diverse meet- en evaluatiemethoden om de impact van chemische stoffen op aquatische biota te testen. Soortgerichte toxiciteitstesten zijn waardevol als basiscreening en reiken nuttige informatie aan om potentiële milieustress te evalueren. Ze zijn echter ontoereikend om ecologische effecten te voorspellen, en aanvullend zijn additionele testen met dezelfde soort, maar ook met een batterij andere soorten, biologische evaluaties, en chemische karakterisering noodzakelijk om onderbouwde ecologische effecten te voorspellen. Standaard toxiciteitstesten op één soort vertonen vaak hoge variabiliteit. De auteurs concluderen dat het nodig is om verschillende meetstrategieën (watertoxiciteit, sedimenttoxiciteit, benthische en vis IBI's) te integreren om ecologische effecten in het milieu in beeld te brengen.

Ook Dyer *et al.* (2000) wijzen erop dat er een groot verschil bestaat tussen toxiciteitsgegevens (en grensnormen teneinde populaties te beschermen) en de toestand in natuurlijke ecosystemen. Zij compileerden een dataset met contaminant concentraties in vis en de ecologische kwaliteit van aquatische gemeenschappen over een uitgestrekt gebied (1010 meetplaatsen). In een subdataset waar naast contaminantconcentraties en IBI ook habitatkwaliteitsindices beschikbaar waren (n = 176), bleek dat 23% van de variatie in IBI te verklaren was door het habitat en 8% door opgestapelde organische stoffen.

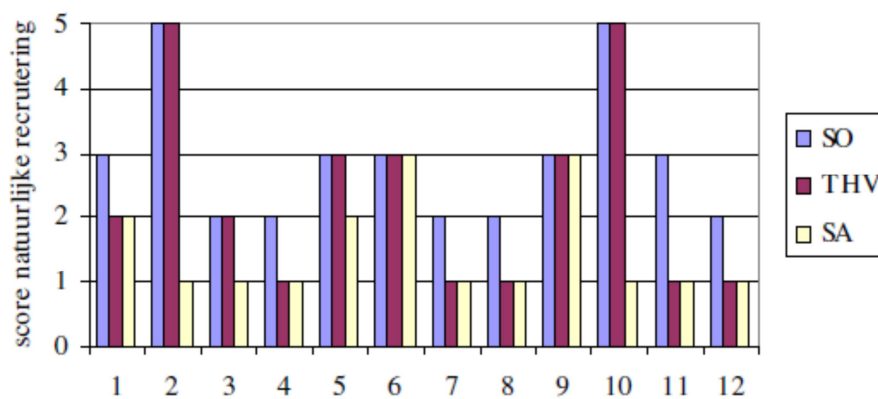
Hartwell 1997 ontwierp een methodiek om toxicologische risico's te kwantificeren. Ook zijn studie toont aan dat er verbanden bestaan tussen de IBI scores en de toxicologische risico waarden. Gebaseerd op zijn resultaten, kunnen er drie voorspellingen worden gedaan:

1. Gebieden met hoge IBI scores en/of diversiteitsindices vertonen altijd lage toxicologische risicoscores, tenzij de populaties zich aangepast hebben aan de vervuilingdruk.
2. Gebieden met een hoge toxicologisch risicoscore zullen altijd lage IBI scores en/of diversiteitsindices vertonen, tenzij de populaties zich aangepast hebben aan de vervuilingdruk.
3. Gebieden met lage IBI scores en/of diversiteitsindices kunnen zowel hoge of lage toxicologische risicoscores hebben, afhankelijk van de reden voor de verarmde visgemeenschappen.

In Wallonië, bestudeerden Mayon *et al.* (2006) het verband tussen de aanwezigheid van contaminanten, biomerkers van hormonale verstoring en de IBI van de meetplaatsen. Dit onderzoek gebeurde weliswaar op een eerder beperkte set van 5 meetplaatsen (rivieren Ourthe, Méhaigne, Vesder, Semois en Ton), waarvan twee referentiemeetplaatsen. Deze meetplaatsen hadden een verschillend profiel en niveau van verontreiniging. Als indicatorsoort fungeerde kopvoorn, en een brede set van biomerkers voor endocriene verstoring werd gemeten. Zowel lever EROD activiteit als het voorkomen van even hoge ALP waarden in beide geslachten wees op endocriene verstoring in de vervuilde sites. Tevens waren op de vervuilde sites de kopvoornpopulaties niet evenwichtig en de parameters op gemeenschapsniveau waren verstoord.

In Vlaanderen werd door Bervoets *et al.* (2005, 2007) voor een groter aantal waterlopen (55 sites) nagegaan of er een verband bestaat tussen de metaalgehalten gemeten in de omgeving en in vissen enerzijds en de samenstelling van de vislevensgemeenschappen anderzijds. Als maat voor de samenstelling van de vislevensgemeenschap werd de visindex bepaald en werd de visdiversiteit berekend. Deze gegevens werden dan gerelateerd aan omgevingsgehalten en aan gehalten in de lever van de grondel. De resultaten tonen een grote variatie in Toxische Eenheden (totale metaalbelasting) in het water en in lever van grondel. Er bleek een significante negatieve relatie te bestaan tussen totale metaalbelasting (zowel in water als in vislever) enerzijds en de visindex anderzijds. Er kon respectievelijk 34 en 29% van de variatie van de IBI worden verklaard. Wanneer echter de punten uit één waterloop (de Dommel) niet mee werden beschouwd kon er 56 en 73% van de variatie worden verklaard.

Tijdens een VLINA onderzoek bestudeerden Breine *et al.* (2001) visgemeenschappen op 12 RWZI's in Vlaanderen, waarbij de IBI stroomopwaarts, ter hoogte van en stroomafwaarts het RWZI gemeten werd. De metriek 'natuurlijke rekrutering' werd negatief beïnvloed door de aanwezigheid van een RWZI (Fig. 8). Ter hoogte van, en nog in grotere mate stroomafwaarts van de RWZI blijken de jonge jaarklassen van de aldaar aangetroffen vissoorten vaak afwezig te zijn. Dit zou een indicatie kunnen zijn dat de oestrogeniciteit van de RWZI effluënten via hormonale verstoring de reproductiecapaciteit van vissoorten ontregelt.

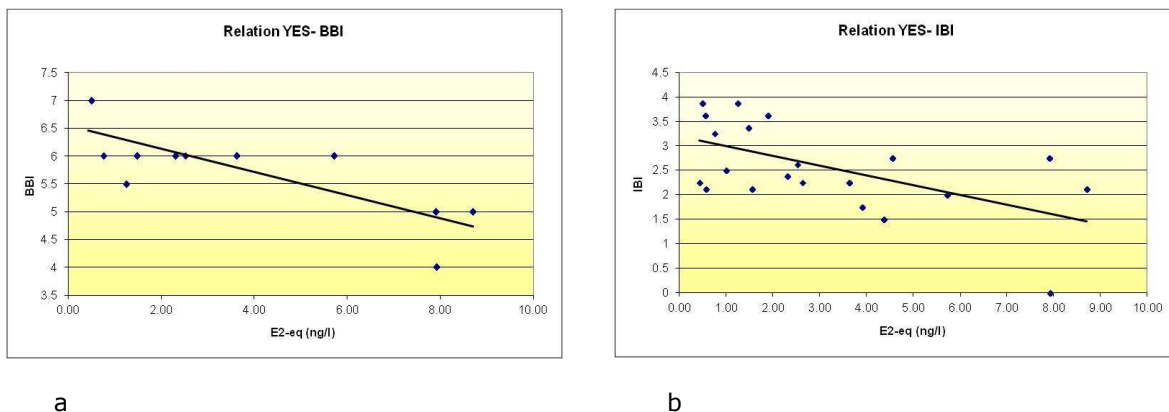


**Figuur 8.** Score van de metriek 'natuurlijke rekrutering' voor de 12 onderzochte RWZI's waarbij de drie locaties per beek gerangschikt zijn volgens hun positie t.o.v. de RWZI (SO stroomopwaarts, THV ter hoogte van, SA stroomafwaarts) (Breine *et al.*, 2001).

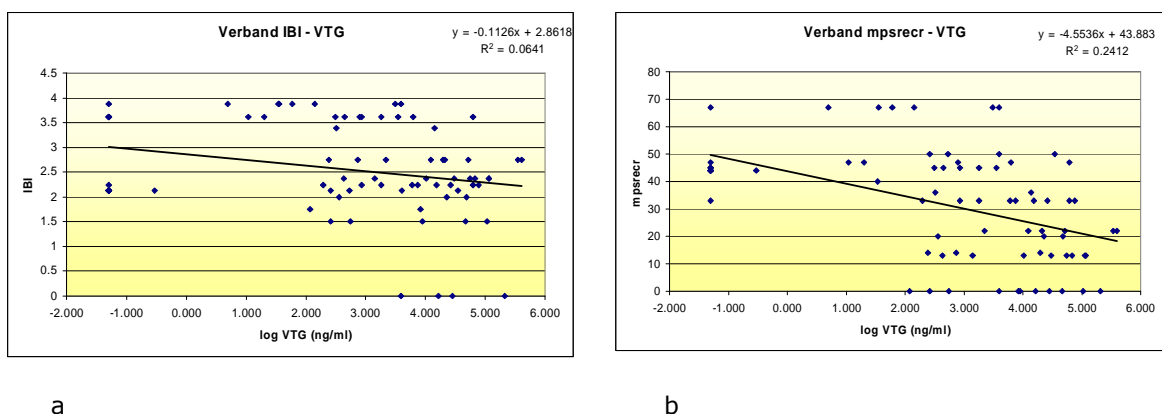
In Vlaanderen wordt momenteel de relatie geanalyseerd tussen de aanwezigheid van een aantal pesticiden op een meetplaats (gemeten als concentratie in de vetfractie van Europese paling, een indicator voor de plaatselijke aanwezigheid van die stoffen in het milieu) en de ecologische kwaliteit van die meetplaats (gemeten als de 'Ecological Quality Ratio' (EQR) van de lokale visgemeenschappen) (Van Ael *et al.*, submitted). De EQR, is gebaseerd op de IBI ontwikkeld voor Vlaamse waterlichamen (Belpaire *et al.*, 2000) waarbij volgende gemeenschapsparameters in rekening gebracht worden: totaal aantal soorten, gemiddelde tolerantie, typische soorten waarde, relatieve aanwezigheid van een aantal type soorten, totale biomassa (kg/ha), gewichts-aandeel van niet inheemse soorten, trofische samenstelling, en natuurlijke rekrutering. De EQR-score varieert van 0 (geen vis) tot 1 (hoge ecologische toestand). Bij hoge palinggehalten aan *p,p'*-DDT of dichlorodiphenyltrichloroethane en TDE (of *p,p'*-DDD of 1,10-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane), werden enkel lage EQR scores aangetroffen. Er bestaat ook een duidelijk verband tussen hexachlorobenzeen (HCB) en gamma-hexachlorocyclohexanes ( $\gamma$ -HCH of lindaan) concentraties in paling en de EQR. Voor deze vier pesticiden was het mogelijk om een palingconcentratie-grenswaarde te bepalen waarboven een goede ecologische toestand nooit

gehaald werd ( $EQR \geq 0.6$ ). Voor enkele andere pesticiden ( $\alpha$ -HCH,  $p,p'$ -DDE, trans-nonachlor en dieldrin) kon dit verband niet aangetoond worden.

De eerder aangehaalde studie van Berckmans *et al.* (2007) waarbij hormonale verstoring in Vlaamse blankvoorn bestudeerd werd, heeft ook de relaties tussen verstoring door EDC's (gemeten als oestrogeniciteit van de waterkolom en VTG gehalten in mannelijke blankvoorn) en de integriteit van aquatische levensgemeenschappen (BBI en IBI) in beeld gebracht. Bij vergelijking van de parameters van oestrogene activiteit (VTG, YES) en populatie indexen zoals IBI en BBI die een maat zijn voor de ecologische kwaliteit (KRW doelstellingen) zien we een omgekeerd verband (Fig. 9 en 10). Hoe hoger de oestrogene activiteit des te lager de ecologische kwaliteit. Deze correlaties zijn significant, maar geven geen causaliteit weer. Ook het percentage recruterende vissoorten op de meetplaats (een metriek gebruikt bij het berekenen van de IBI, die de normale reproductie van de aanwezige vissoorten beschrijft, Belpaire *et al.*, 2000) bleek significant omgekeerd gecorreleerd met de VTG en YES waarden.



**Figuur 9.** Inverse relatie tussen oestrogene activiteit in water (YES test) en beschikbare data voor ecologische kwaliteit op de meetplaatsen, respectievelijk (a) BBI macro invertebraten gemeenschapsindex (Spearman  $R = -0.75$ , significantie  $p = 0.0004$ ) en (b) IBI visgemeenschapsindex (Spearman  $R = -0.61$ , significantie  $p = 0.0063$ ) (Berckmans *et al.*, 2007).



**Figuur 10.** Inverse relatie tussen VTG gehalten gemeten in mannelijke blankvoorn en de ecologische kwaliteit op de meetplaatsen, respectievelijk (a) IBI visgemeenschapsindex (Spearman  $R = -0.49$ , significantie  $p = 0.0390$ ) en (b) het percentage recruterende soorten ('Mpsrecr') een deelmetriek van de IBI (Spearman  $R = -0.58$ , significantie  $p = 0.0110$ ) (Berckmans *et al.*, 2007).

Dit onderzoek was een oriënterende studie en laat niet toe om statistisch verantwoorde *causale* verbanden te leggen tussen hormoonverstoring en verontreinigingsgegevens door chemische stoffen, noch om statistische verantwoorde *causale* verbanden te leggen tussen hormoonverstoring en gemeenschapsindices in aquatische ecosystemen. Nochtans zijn er een aantal trends aangetoond, waarbij als belangrijkste de significante correlaties tussen parameters voor oestrogene verstoring (gisttest in waterstalen, VTG in mannelijke blankvoorn) en indices voor de evaluatie van levensgemeenschappen (IBI, BBI).

## 5 Conclusies

- Een grote verscheidenheid aan buitenlandse studies heeft de aanwezigheid en effecten van stoffen met hormoonversturende eigenschappen op mens en dier gedocumenteerd, en de negatieve impact van EDC's op het reproductiepotentieel van sommige soorten is door een brede wetenschappelijke evidentie duidelijk aangetoond. De effecten van deze stoffen op lokale vispopulaties zijn echter zeer uiteenlopend van aard, en zijn onder andere in hoge mate stof-, concentratie- en soortafhankelijk.
- In Vlaanderen zijn stoffen met oestrogene werking zeer nadrukkelijk aanwezig in oppervlaktewater.
- Ondanks de in het algemeen slechte toestand van de waterkwaliteit in Vlaanderen, en de duidelijke impact van EDC's op de visbestanden en de ecologische kwaliteit van ons oppervlaktewater, heeft Vlaanderen hierrond nog maar weinig gerichte studies uitgevoerd.
- Eén verkennend onderzoek op 20 Vlaamse meetplaatsen heeft aangetoond dat deze stoffen met oestrogene werking ook effecten op bepaalde vispopulaties veroorzaken: bij blankvoorn blijken ongeveer de helft van het aantal onderzochte mannelijke dieren tekenen van vrouwelijking te vertonen (aanwezigheid van oöcyten – verhoogde VTG-concentraties). Natuurlijke vispopulaties, zoals blankvoorn, worden blootgesteld aan stoffen met oestrogene activiteit met ingrijpende veranderingen in bloed en geslachtsorganen tot gevolg. Dit probleem vergt een gerichte aanpak in ons milieubeleid naar de aard en de bron van deze stoffen met pseudo-oestrogene activiteit en een lange termijn studie op reproductiesucces van natuurlijke vispopulaties (Berckmans *et al.*, 2007).
- Habitatrichtlijn: Specifieke studies naar de impact van hormoonversturende stoffen op Habitatrichtlijnsoorten in Vlaanderen ontbreken. Voor sommige soorten (of aanverwante soorten) zijn er in de internationale literatuur wel beschrijvingen van de impact van deze stoffen, bv voor barbeel, rivierdonderpad, grote modderkruiper en zalm. Op de andere soorten werd er geen of weinig onderzoek uitgevoerd. Soortgebonden verschillen in verspreiding, voortplantings-, migratie-, en trofische ecologie zijn verondersteld een grote impact te hebben op de graad van gevoeligheid van de HRL-soorten aan EDC's. De studies varieerden nogal van opzet, van experimentele blootstellingen onder labo-omstandigheden tot het opvolgen van biomerkers van natuurlijke populaties onder veldcondities. Maar alle studies toonden de nefaste invloed van EDC's op individu of populatie. Gelet op de hoge concentraties aan stoffen met oestrogene werking in Vlaanderen vergeleken met het buitenland, mag ondanks de afwezigheid van gerichte studies over de effecten in Vlaamse HRL-soorten, verwacht worden dat hormoonversturende stoffen een grote impact hebben op de toestand en het herstel van de Vlaamse HRL-soorten.
  - **Advies.** *Het verdient aanbeveling om de impact van EDC's op een of meerdere HRL-soorten in Vlaanderen te onderzoeken. Vlaanderen is hiervoor uitermate geschikt daar er heel wat informatie beschikbaar is over de verspreiding van toxische stoffen en EDC's in aquatische ecosystemen (via meetnetten van water, sediment of biota), en het bijgevolg haalbaar is om pollutiegradiënten te selecteren, waarbij populaties opgevolgd kunnen worden via een brede set van biomerkers.*
- Kaderrichtlijn Water. Verkennend onderzoek op een brede set van meetplaatsen heeft aangetoond dat er een omgekeerd verband bestaat tussen de gehalten van bepaalde stoffen waarvan sommige als EDC bekend staan, en de indices gebruikt bij de rapportage van de ecologische toestand van de KRW. Zo worden bijvoorbeeld bij hoge palinggehalten aan DDT enkel lage EQR scores aangetroffen. Op een beperktere set van meetplaatsen werd ook een significante relatie gevonden tussen biomerkers voor oestrogeniciteit (gemeten als oestrogeniciteit van de waterkolom en VTG gehalten in mannelijke

blankvoorn) en indicatoren voor de integriteit van aquatische levensgemeenschappen (BBI en IBI). Hoe hoger de oestrogene activiteit des te lager de ecologische kwaliteit. Gelet op deze bevindingen en andere wetenschappelijk onderzoek waarbij aangetoond werd dat EDC's (en bij uitbreiding ook andere toxische stoffen) negatieve effecten genereren op populatie- en gemeenschapsniveau, mag besloten worden dat hormonale verstoring één van de vele antropogene drukken is die een significante impact heeft op het behalen van de doelstellingen van de Kaderrichtlijn Water.

- **Advies.** *Het verdient aanbeveling om de verbanden tussen het voorkomen van EDC's in oppervlaktewater en de ecologische kwaliteit en haar indicatoren verder te onderzoeken. Mogelijkheden hiertoe zijn de analyse van datasets via de integratie van databanken en meetnetten, en gericht veldonderzoek op een set van meetplaatsen geselecteerd volgens een welbepaalde EDC gradiënt.*

## Lijst van afkortingen

11 KT-en T	11-Ketotestosterone
2,4'-DDT ( <i>o,p'</i> -DDT)	2-(2-Chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)-1,1,1-dichloroethane
4,4'-DDE ( <i>p,p'</i> -DDE)	2,2-Bis-(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene
4-NP	4-nonylphenol
ALP	Alkaline phosphatase
BBI	Belgische Biotische Index (Belgian Biotic Index)
BBP	Benzyl butyl phthalate
D4	Octamethylcyclotetrasiloxane
D5	Decamethylcyclopentasiloxane
D6	Dodecamethylcyclohexasiloxane
DBP	Dibutyl phthalate
DEHP	Diethyl hexyl phthalate
DiNP	Diisononyl phthalate
E2	17 $\beta$ -oestradiol
ECOD	ethoxycoumarine o-deethylase
EDCs	Endocrine Disrupting Compounds
EE2	17 alpha-ethinylestradiol
EFSA	European Food Safety Authority
EKC of EQM	ecological quality measure
EKR of EQR	ecological quality ratio
EROD	ethoxyresorufin o-deethylase
GSI	gonadosomatische index
HBCDD	Hexabromocyclododecane
HCB	Hexachlorobenzene
HCH's	gehalogeneerde cyclische koolwaterstoffen
HD	Habitats Directive
HRL	Habitatrichtlijn
IBI	Index voor Biotische Integriteit (Index of Biotic Integrity)
IPCS	International Programme on Chemical Safety
KRW	Kaderrichtlijn Water
PBB's	Polybrominated biphenyl
PBDE's	Polybrominated diphenyl ethers
PCB's	polychlorinated biphenyles
PCDDs/PCDFs	Polychlorinated dibenzofurans/Polychlorinated dibenzodioxins
PFAS, PFOSF	Perfluorooctane sulfonyl fluoride
PFOS	Perfluorooctane sulfonate/-sulfonic acid
POP's	Persistente organische pollutanten
RWZI	rioolwaterzuiveringsinstallaties
SCCP	Short chain chlorinated paraffins
UNEP	United Nations Environment Programme
VLINA	Vlaams Impulsprogramma Natuurontwikkeling
VTG	Vitellogenine
WFD	Water Framework Directive
WHO	World Health Organization

## Referenties

- Adriaens D., Adriaens T., Ameeuw G. (2008). Ontwikkeling van criteria voor de beoordeling van de lokale staat van instandhouding van de Habitatrichtlijnsoorten. Brussel. INBO.R.2008.35. 1-217 p.
- Aguayo S., Muñoz M.J., de la Torre A., Roset J., de la Peña E., Carballo M. (2004). Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Sci Total Environ* 328(1-3):69-81.
- Allen Y., Scott A.P., Matthiessen P., Haworth S., Thain J.E., Feist S. (1999). Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environ Toxicol Chem* 18:1791-1800
- Amaoka K., Nishikawa S., Tanaka N. (1974). Sexual dimorphism and an abnormal intersexual specimen in the botid flounder *Bothus pantherinus*. *Jpn J. Ichthyol* 21:16-20.
- Amberg J.J., Goforth R., Stefanavage T., Sepulveda, M.S. (2009). Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*). *Fish Physiol. Biochem.* 36:923-932.
- Anderson M.J., Cacela D., Beltman D., Teh S.J., Okihira M.S., Hinton, D.E., Denslow N., Zelikoff, J.T. (2003). Biochemical and toxicopathic biomarkers assessed in smallmouth bass recovered from a polychlorinated biphenyl-contaminated river. *Biomarkers* 8:371-393.
- Aravindakshan J., Paquet V., Gregory M., Dufresne J., Fournier M., Marcogliese D.J., Cyr D.G. (2004). Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol. Sci.* 78:156-165.
- Bahamonde P.A., Munkittrick K.R., Martyniuk C.J. (2013). Intersex in teleost fish: Are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? *General and Comparative Endocrinology*, in press, [.](#)
- Balch G.C., Mackenzie C.A., Metcalfe C.D. (2004). Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:782-791.
- Baldigo B.P., Sloan R.J., Smith S.B., Denslow N.D., Blazer V.S., Gross T.S. (2006). Polychlorinated biphenyls, mercury, and potential endocrine disruption in fish from the Hudson River, New York, USA. *Aquat. Sci.* 68:206-228.
- Banarescu P.M., Bogutskaya N.G. (2003). *The Freshwater Fishes of Europe; Cyprinidae 2, part II: Barbus*. AULA-Verlag GmbH Wiebelsheim, 454 p.
- Barnhoorn I.E.J., Bornman M.S., Pieterse G.M., Van Vuren J.H.J. (2004). Histological evidence of intersex in feral sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus*) from an estrogen-polluted water source in Gauteng, South Africa. *Environ. Toxicol.* 19:603-608.
- Barnhoorn I.E.J., van Dyk J.C., Pieterse G.M., Bornman M.S. (2010). Intersex in feral indigenous freshwater *Oreochromis mossambicus*, from various parts in the Luvuvhu River, Limpopo Province, South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73:1537-1542.
- Barrett T.J., Munkittrick K.R. (2010). Seasonal reproductive patterns and recommended sampling times for sentinel fish species used in environmental effects monitoring programs in Canada. *Environ. Rev.* 18:115-135.



Belpaire C., Goemans G., Geeraerts C., Quataert P., Parmentier K., Hagel P., et al. (2009). Decreasing eel stocks: Survival of the fittest? *Ecol. Freshw. Fish.* 18(2):197-214.

Belpaire C., Goemans G., Geeraerts C., Quataert P., Parmentier K. (2008). Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES Journal of Marine Science* 65:1483-1491.

Belpaire C., Smolders R., Vanden Auweele I., Ercken D., Breine J., Van Thuyne G., Ollevier F. (2000). An Index of Biotic Integrity characterizing fish populations and the ecological quality of Flandrian water bodies. *Hydrobiologia* 434:17-33.

Berckmans P., Goemans G., Maes J., Van Volsem S., Belpaire C., Witters H. (2012). The presence of endocrine disrupting chemicals in Flemish surface waters and their ecological relevance. NORMAN workshop. Occurrence, fate and effects of emerging pollutants in the environment – chemical analysis and toxicological assessment The NORMAN network and IVM – Institute for Environmental Studies VU University, The Netherlands, 29 – 30 November 2012, Amsterdam, The Netherlands. Poster.

Berckmans P., Witters H., Goemans G., Maes J., Belpaire C. (2007). Ondersteunend studiewerk en verdere karakterisatie van de Vlaamse toestand inzake hormoonverstoring: vraagstelling inzake ecologische relevantie. Studie uitgevoerd in opdracht van VMM door Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek, Mol, VITO rapport nr. 2007/TOX/R071 in samenwerking met Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel. INBO rapport nr. R.2007.37 en depot nr. D/2007/3241/040.

Bervoets L., Knaepkens G., Eens M., Blust R. (2005). Fish community responses to metal pollution. *Environ. Pollut.* 138:338-349.

Bervoets L., Reynders H., Knapen D., De Cooman W., Goemans G., Belpaire C., Van Thuyne, G., Blust R. (2007). Is de visindex bruikbaar voor de evaluatie van effecten van metalen op vislevensgemeenschappen? *Water*:1-8.

Bjerregaard L.B., Korsgaard B., Bjerregaard P. (2006). Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:321-328.

Blachuta J., Witkowski A., Kokurewicz B. (1991). An hermaphrodite grayling, *Thymallus thymallus* (L), from the Nysa Klodzka River (Lower Silesia, Poland). *J. Fish Biol.* 38:955-957.

Blazer V.S., Iwanowicz L.R., Henderson H., Mazik P.M., Jenkins J.A., Alvarez D.A, Young J.A. (2012). Reproductive endocrine disruption in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) in the Potomac River Basin--Spatial and temporal comparisons of biological effects. *Environmental Monitoring and Assessment* 184:4309-4334.

Blazer V.S., Iwanowicz L.R., Iwanowicz D.D., Smith D.R., Young J.A., Hedrick J.D., Foster S.W., Reeser, S.J. (2007). Intersex (testicular oocytes) in smallmouth bass from the Potomac River and selected nearby drainages. *J. Aquat. Anim. Health.*

Breine J., P. Goethals, Simoens I., Ercken D., Van Liefferinge C., Verhaegen G., Belpaire C., De Pauw N., Meire P., Ollevier F. (2001). De visindex als instrument voor het meten van de biotische integriteit van de Vlaamse binnenwateren. Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer, Groenendaal. Eindverslag van project VLINA 9901, studie uitgevoerd voor rekening van de Vlaamse Gemeenschap binnen het kader van het Vlaams Impulsprogramma Natuurontwikkeling. D/2001/3241/261. 173 pagina's, 19 bijlagen, 1 kaart.

Bucher F., Hofer R. (1993). Histopathological effects of sublethal exposure to phenol on two variously pre-stressed populations of bullhead (*Cottus gobio* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51:309-316.

CEC (2000). Directive of the European parliament and of the council 2000/60/EC establishing a framework for community action in the field of water policy. Off J Eur Comm 22.12.2000, L 327/1.

Celius T., Haugen T.B., Grotmol T., Walther B.T. (1999). A sensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. Environ. Health Perspect. 107(1):63-68.

Cheek A. O. (2006). Subtle sabotage: endocrine disruption in wild populations. Revista De Biologia Tropical 54:1-19.

Couillard C. M., et al. (2008). Chemical-environment interactions affecting the risk of impacts on aquatic organisms: A review with a Canadian perspective - interactions affecting exposure. Environmental Reviews 16:1-17.

Crump K. L., Trudeau V. L. (2009). Mercury induced reproductive impairment in fish. Environmental Toxicology and Chemistry 28(5):895-907.

de Laak G.A.J. (2009). Kennisdokument fint, *Alosa fallax* (Lacépède, 1803). Bilthoven. Kennisdokument 26. 1-26 p.

de Lange M.C., Van Emmerik W.A.M. (2006). Kennisdokument bittervoorn *Rhodeus amarus* (Bloch, 1782). Bilthoven. Kennisdokument 15. 1-50 p.

Decler K. (2007). Europees beschermde natuur in Vlaanderen en het Belgisch deel van de Noordzee: Habittatypen I: Dier- en plantensoorten. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. Brussel.

Dill R., Fay C., Gallagher M., Kircheis D., Mierzykowski S., Whiting M., Haines T. (2002). Water quality issues as potential limiting factors affecting juvenile Atlantic salmon life stages in Maine rivers. Report to the Maine Atlantic Salmon Technical Advisory Committee by the Ad Hoc Committee on Water Quality. Maine Atlantic Salmon Commission. Bangor. ME. 29 p.

Dottrens E. (1952). Poissons d'eau douce. Vol. 2. Delachaux et Niestlé, Neuchâtel.

Douxflis J., Mandiki R., Silvestre F., Bertrand A., Leroy D., Thomé J.P., Kestemont P. (2007). Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers? Sci. Total Environ. 372:497-514.

Dyer S.D., White-Hull C.E., Shephard B.K. (2000). Assessments of chemical mixtures via toxicity reference values overpredict hazard to Ohio fish communities. Environ. Sci. Technol. 34:2518-2524.

EFSA (European Food Safety Authority) (2013). Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. EFSA Journal 11(3):3132.

Fairchild, W.L., Swansburg E.O., Arenault J.T., Brown S.B. (1999). Does an association between pesticide use and subsequent declines in catch of Atlantic salmon (*Salmo salar*) represent a case of endocrine disruption? Environ. Health Perspect. 107:349-358.

Faller P., Kobler B., Peter A., Sumpter J.P., Burkhardt-Holm P. (2003). Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. Environ. Toxicol. Chem. 22:2063-2072.

- Fitzgerald D.G., Lanno R.P., Dixon D.G. (1999). A comparison of a sentinel species evaluation using creek chub (*Semotilus atromaculatus*) to a fish community evaluation for the initial identification of environmental stressors in small streams. *Ecotoxicology* 8:33–48.
- Fjeld E., Haugen T. O., Vollestad L. A. (1998). Permanent impairment in the feeding behavior of grayling (*Thymallus thymallus*) exposed to methylmercury during embryogenesis. *Sci. Total Environ.* 213:247-254.
- Freyhof J., (1999). Eine verwirrende Artengruppe: Steinbeißer. *D.A.T.Z.* 52(11):14-18.
- Froese R., Pauly D. (eds) (2013) FishBase. <http://www.fishbase.org>, version 07/2013.
- Geeraerts C., Belpaire C. (2010). The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19(2):239-266.
- Geeraerts C., Quataert P. (2012a). Meetnetstrategie voor de visfauna van de Habitatrichtlijn. Revisie van het INBO zoetwatervismetnet. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2012 (INBO.R.2012.56). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Geeraerts C., Quataert P. (2012b). Ontwerp van het Vlaams referentiemetnet voor de visfauna. Revisie van het INBO-zoetwatervismetnet op basis van een vraaganalyse van de informatiebehoefte van de Kaderrichtlijn Water met aandacht voor een betere afstemming tussen de ecologische meetnetten en andere monitoringsverplichtingen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2012 (rapportnr. 41). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- Gercken J., Sordyl H. (2002). Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. *Mar. Environ. Res.* 54:651–655.
- Goldschmidt R. (1931). Die sexuellen zwischenstufen (Sex-Intergrades) 230–265.
- Gomes R.L., Scrimshaw M.D., Lester J.N. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends Anal Chem* 2003 22(10):697–707.
- Gray M.A., Munkittrick K.R. (2005). An effects-based assessment of Slimy Sculpin (*Cottus cognatus*) populations in agricultural regions of Northwestern New Brunswick. *Water Qual. Res. J. Canada* 40(1):16–27.
- Greeley M.S. (2002). Reproductive indicators of environmental stress. In Adams SM (ed.), *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. Am. Fish. Soc., Bethesda, Md. 312–377 p.
- Hall L.W., Giddings J.M. (2000). The need for multiple lines of evidence for predicting site-specific ecological effects. *Human and Ecological Risk Assessment* 6(4):679-710.
- Harris C.A., Hamilton P.B., Runnalls T.J., Vinciotti V., Henshaw A., Hodgson D., Coe T.S., Jobling S., Tyler C.R., Sumpter J.P. (2011). The Consequences of Feminization in Breeding Groups of Wild Fish. *Environmental Health Perspectives* 119(3):306-311.
- Harshbarger J.C., Coffey M.J., Young M.Y. (2000). Intersexes in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA. *Mar. Environ. Res.* 50:247–250.
- Hartwell S.I. (1997). Demonstration of a toxicological risk ranking method to correlate measures of ambient toxicity and fish community diversity. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:361-371.
- Hashimoto S., Bessho H., Nakamura M., Iguchi T., Fujita K., (2000). Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Mar Environ Res* 49:37–53

Hecker M., Tyler C.R., Hoffmann M., Maddix S., Karbe L. (2002). Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. *Environ. Sci. Technol.* 36:2311–2321.

Hinck J.E., Blazer V.S., Denslow N.D., Echols K.R., Gale R.W., Wieser C., May T.W., Ellersieck M., Coyle J.J., Tillitt D.E. (2008). Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States. *Sci. Total Environ.* 390: 538–557.

Hinck J.E., Blazer V.S., Denslow N.D., Echols K.R., Gross T.S., May T.W., Anderson P.J., Coyle J.J., Tillitt D.E. (2007). Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. *Sci. Total Environ.* 378: 376–402.

Hinck J.E., Blazer V.S., Schmitt C.J., Papoulias D.M., Tillitt D.E. (2009). Widespread occurrence of intersex in black basses (*Micropterus spp.*) from U.S. rivers, 1995– 2004. *Aquat. Toxicol.* 95:60–70.

Hirakawa I., Miyagawa S., Katsu Y., Kagami Y., Tatarazako N., Kobayashi T., Kusano T., Mizutani T., Ogino Y., Takeuchi T., Ohta Y., Iguchi T. (2012). Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Chemosphere* 87:668–674.

Hoff P.T., Van Campenhout K., Van de Vijver K., Covaci A., Bervoets L., Moens L., Huyskens G., Goemans G., Belpaire C., Blust R., De Coen W. (2005). Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three freshwater fish species in Flanders (Belgium): relationships with biochemical and organismal effects. *Environmental Pollution* 137:324–333.

Hugla J.L., Philippart J. C., Kremers P., Goffinet G., Thomé J.P. (1995). PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (pisces, cyprinidae), in the River Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change *Netherland Journal of Aquatic Ecology* 29 (1):135-145 .

Hugla J.L., Thomé J.P. (1999). Effects of Polychlorinated Biphenyls on Liver Ultrastructure, Hepatic Monooxygenases, and Reproductive Success in the Barbel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 42(3):265–273

Ingram D.R., Miller D.L., Ingram T.R., Tannehill J.E. (2011). Intersex condition of shoal bass in the Flint River, Georgia. *J. Aquat. Anim. Health* 23:189–194.

Jafri S.I.H., Ensor D.M. (1979) Occurrence of an intersex condition in the roach *Rutilus rutilus* L. *J Fish Biol* 14:547–549

James M.F. (1946). Histology of gonadal changes in the bluegill, *Lepomis macrochirus* Rafinesque, and the largemouth bass, *Huro salmoides* (Lacépède). *J. Morphol.* 79:63–91.

Jobling S., Beresford N., Nolan M., Rodgers-Gray T., Brightly G.C., Sumpter J.P., Tyler C.R.(2002). Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol. Reprod.* 66:272–281.

Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brightly G., Sumpter J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Tech.* 32:2498-2506.

Jobling S., Williams R., Johnson A., Taylor A., Gross-Sorokin M., Nolan M., et al. (2006). Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ Health Perspect* 114:32–39.

Johnson D.W. (1968) Pesticides and fishes - A review of selected literature. Transactions of the American Fisheries Society 97(4):398-424

Jolly S., Bado-Nilles A., Lamand F., Turies C., Chadili E., Porcher J.M., Betoulle S., Sanchez W. (2012). Multi-biomarker approach in wild European bullhead, *Cottus sp.*, exposed to agricultural and urban environmental pressures: Practical recommendations for experimental design. Chemosphere 87:675-683.

Käfel G. (1991). Besonderheiten und Gefährdung von *Misgurnus fossilis*. Österreichs Fischerei 46(4):83-90.

Katsu Y, Taniguchi E, Urushitani H, Miyagawa SI, Takase M, Kubokawa K, Tooi O, Oka T, Santo N, Myburgh J, Matsuno A, Iguchi T (2010). Molecular cloning and characterization of ligand- and species-specificity of amphibian estrogen receptors. General and Comparative Endocrinology 168(2):220-230.

Katsu Y., Hinago M., Sone K., Urushitani H., Guillette L.J., Iguchi T. (2007). In vitro assessment of transcriptional activation of the estrogen and androgen receptors of mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*. Molecular and Cellular Endocrinology 276(1-2):10-17.

Kavanagh R.J., Balch G.C., Kiparissis Y., Niimi A.J., Metcalfe C.D. (2002). Gonadal intersex in white perch (*Morone americana*) from the Lower Great Lakes region. In: Conference on Great Lakes Research Winnipeg Canada June 2002. International Association for Great Lakes Research Ann. Arbor MI 64 p.

Kavanagh R.J., Balch G.C., Kiparissis Y., Niimi A.J., Sherry J., Tinson C., Metcalfe C.D. (2004). Endocrine disruption and altered gonadal development in white perch (*Morone americana*) from the Lower Great Lakes Region. Environ. Health Perspect. 112:898-902.

Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R.W. (2007). Collapse of fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 104:8897-8901.

Kinnison M.T., Unwin M.J., Jara F. (2000). Macroscopic intersexuality in salmonid fishes. N.Z. J. Mar. Freshwat. Res. 34: 125-134.

Knaepkens G., Knapen D., Bervoets L., Hänfling B., Verheyen E. & Eens M. (2002). Genetic diversity and condition factor: a significant relationship in Flemish but not in German populations of the European bullhead (*Cottus gobio* L.). Heredity 89 (4):280-287.

Körner O., Vermeirssen E.L.M., Burkhardt-Holm P. (2005). Intersex in feral brown trout from Swiss midland rivers. J. Fish Biol. 67:1734-1740.

Le Page Y., et al. (2011). Neuroendocrine effects of endocrine disruptors in teleost fish. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews 14(5-7):370-386.

Lin Sun P., Tsai S.S. (2009). Intersex tilapia (*Oreochromis* spp.) from a contaminated river in Taiwan: a case study. Toxins 1:14-24.

Louette G., Adriaens D., De Knijf G. & Paelinckx D. (2013). Staat van instandhouding (status en trends) habitattypen en soorten van de Habitatrichtlijn (rapportageperiode 2007-2012). Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2013 (INBO.R.2013.23). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

- Ma T., Wan X., Huang Q., Wang Z., Liu J. (2005). Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 59:281-8.
- Maes G.E., Raeymaekers J.A.M., Hellemans B., Geeraerts C., Parmentier K., De Temmerman L., Volckaert F.A.M., Belpaire C. (2013). Gene transcription reflects poor health status of resident European eel chronically exposed to environmental pollutants. *Aquatic Toxicology* 126:242-255.
- Maes G.E., Raeymaekers J.A.M., Pampoulie C., Seynaeve A., Goemans G., Belpaire C., Volckaert F.A.M. (2005). The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic Toxicology* 73:99-114.
- Maes J., Belpaire C., Goemans G. (2008). Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution* 153:223-237.
- Magee J., Haines T., Kocik J., Beland K., and McCormick S. (2001). Effects of acidity and aluminum on the physiology and migratory behavior of Atlantic salmon smolts in Maine. USA. *Water Air Soil Pollut.* 130: 881-886.
- Maltret-Geraudie P., Gerbron M., Minier C. (2008). Estrogenic response of wild roach from the Seine River (France). *Cybium* 32(Suppl.):256-257.
- Marchand M.J., Pieterse G.M., Barnhoorn I.E.J. (2010). Sperm motility and testicular histology as reproductive indicators of fish health of two feral fish species from a currently DDT sprayed area. South Africa., *J. Appl. Ichthyol.* 26:707-714.
- Marentette J.R., Fitzpatrick J.L., Berger R.G., Balshine S. (2009). Multiple male reproductive morphs in the invasive round goby (*Apolonia melanostoma*). *J. Great Lakes Res.* 35:302-308.
- Matthiessen P. (2003). Endocrine disruption in marine fish. *Pure and Applied Chemistry* 75(11-12):2249-2261.
- Matthiessen P., Allen Y., Bignell J., Craft J., and 8 others (2000). Studies of endocrine disruption in marine fish-progress with the EDMAR programme. ICES Copenhagen
- Maunder R.J., Matthiessen P., Sumpter J.P., Pottinger T.G. (2007). Impaired reproduction in three-spined sticklebacks exposed to ethinyl estradiol as juveniles. *Biol. Reprod.* 77, 999-1006.
- Mayon N., Bertrand A., Leroy D., Malbrouck C., Mandiki S.N.M., Silvestre F., Goffart A., Thomé J.P., and Kestemont P. (2006). Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: A case study. *Science of The Total Environment* 367(2-3):715-731.
- McGee C., Brougham C., Roche J., Fogarty A. (2012). First report of intersex roach residing in Irish rivers downstream of several wastewater treatment plants. *Biol. Environ.* 112B:1-9.
- McNair A., et al. (2012). The fitness consequences of environmental sex reversal in fish: a quantitative review. *Biological Reviews* 87(4):900-911.
- Mikaelian I., De Lafontaine Y., Harshbarger J.C., Lee L.L.J., Martineau D. (2002). Health of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) with elevated tissue levels of environmental contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:532-541.

Miller L.M., Bartell S.E., Schoenfuss H.L. (2012). Assessing the effects of historical exposure to endocrine-active compounds on reproductive health and genetic diversity in walleye a native apex predator in a large riverine system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62:657-667.

Mills L.J., Chichester C. (2005). Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment* 343(1-3):1-34.

Mills S.C., Reynolds J.D. (2004). The importance of species interactions in conservation: the endangered European bitterling *Rhodeus sericeus* and its freshwater mussel hosts. *Animal Conservation* 7(3):257-263.

Minier C., Caltot G., Leboulanger F., Hill E.M. (2000). An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex region. *Analysis* 28:801-806.

Moore A., Lower N. (2001). The effects of aquatic contaminants on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. 6th International Workshop on Salmonid Smoltification Westport Ireland 3-7 September 2001 30 p.

Nakada N., Nyunoya H., Nakamura M., Hara A., Iguchi T., Takada H. (2004). Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(12):2807-15.

Nolan M., Jobling S., Brighty G., Sumpter J.P., Tyler C.R. (2001). A histological description of intersexuality in the roach. *J. Fish Biol.* 58:160-176.

Pait A.S., Nelson J.O. (2002). Endocrine Disruption in Fish: An Assessment of Recent Research and Results. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS CCMA 149. Silver Spring MD: NOAA NOS Center for Coastal Monitoring and Assessment 55 p.

Papoulias D.M., Chapman D., Tillitt D.E. (2006). Reproductive condition and occurrence of intersex in bighead carp and silver carp in the Missouri River. *Hydrobiologia* 571:355-360.

Penaz M., Svobodova Z., Barus V., Prokes M., Drastichova J. (2005). Endocrine disruption in a barbel *Barbus barbus* population from the River Jihlava Czech Republic. *J. Appl. Ichthyol.* 21(2005):420-428.

Peters L.D., Doyotte A., Mitchelmore C.L., McEvoy J., Livingstone D.R. (2001). Seasonal variation and estradiol-dependent elevation of Thames estuary eel *Anguilla anguilla* plasma vitellogenin and comparisons with other United Kingdom estuaries. *Sci Total Environ.* 279:137-150.

Pollock M.S., Dubé M.G., Schryer R. (2010). Investigating the link between pulp mill effluent and endocrine disruption: attempts to explain the presence of intersex fish in The Wabigoon River Ontario Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 29:952-965.

Prado P. S., Souza C.C., Bazzoli N., Rizzo E. (2011). Reproductive disruption in *lambari Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74:1879-1887.

Pujolar J.M., Marino I., Milan M., Coppe A., Maes G.E., Capoccioni F., Ciccotti E., Bervoets L., Covaci A., Belpaire C., Cramb G., Patarnello T., Bargelloni L., Bortoluzzi S., Zane L. (2012). Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *BMC Genomics* 13:507.

Pujolar J.M., Milan M., Marino I.A.M., Capoccioni F., Ciccotti E., Belpaire C., Covaci A., Malarvannan G., Patarnello T., Bargelloni L., Zane L., Maes G.E. (2013). Detecting genome-wide gene transcription profiles associated with high pollution burden in the critically endangered European eel. *Aquatic Toxicology* 132-133:157-164.

- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P., et al. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8:275-285.
- Randak T., Zlabek V., Pulkrabova J., Kolarova J., Kroupova H., Siroka Z., Velisek J., Svobodova Z., Hajslova J. (2009). Effects of pollution on chub in the River Elbe Czech Republic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:737-746.
- Rempel M.A., Schlenk D. (2008). Effects of environmental estrogens and antiandrogens on endocrine function gene regulation and health in fish. *International Review of Cell and Molecular Biology* Vol 267. K. W. Jeon. 267:207-252.
- Rodriguez J.N., Slembrouck J., Subagja J., Legendre M. (2012). Intersex in a cultured specimen of the Indo-Malay catfish *Pangasius nasutus* (Bleeker 1863). *J. Appl. Ichthyol.* 28(2012):284-286.
- Roland K., Kestemont P., Loos R., Tavazzi S., Paracchini B., Belpaire C., Dieu M., Raes M., Silvestre F. (2014). Looking for protein expression signatures in European eel peripheral blood mononuclear cells after in vivo exposure to perfluorooctane sulfonate and a real world field study. *Science of the Total Environment* 468-469: 958-967
- Ross A.J., Yasutake W.T., White G.R. (1963). Hermaphroditism in rainbow trout. *Trans. Am. Fish Soc.* 92:313-315.
- Rotchell J.M., Ostrander G.K. (2003). Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 6(5):453-495.
- Schmitt C.J., Hinck J.E., Blazer V.S., Denslow N.D., Dethloff G.M., Bartish T.M., Coyle J.J., Tillitt D.E. (2005). Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its U.S. tributaries: spatial and temporal trends. *Sci. Total Environ* 350:161-193.
- Scholz S., Kluver N. (2009). Effects of Endocrine Disrupters on Sexual Gonadal Development in Fish. *Sexual Development.* 3(2-3):136-151.
- Scholz S., et al. (2013). Alternatives to in vivo tests to detect endocrine disrupting chemicals (EDCs) in fish and amphibians - screening for estrogen androgen and thyroid hormone disruption. *Critical Reviews in Toxicology.* 43(1):45-72.
- Seok-Ki Min, Ja-Hyun Kim, Sooyeon Kim, Byung-Seok Kim, Dong-Hyuk Yeom (2010). Various biomarker and bioindicator responses in muddy loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) exposed to endosulfan for 21 days. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 31(2):125-131.
- Sherry J.C., Tinson K., Haya L., Burrige W., Fairchild, Brown S. (2001). An ELISA for Atlantic salmon (*Salmo salar*) Vg and its use in measuring the response of salmon smolts to 17  $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol treatments. In: McKernan J., Wilkes B., Mathers K., and Niimi A. (editors) *Proceedings of the 28th Annual Aquatic Toxicity Workshop: September 30-October 3 2001 Winnipeg Manitoba.* Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2379 p.
- Sikstrom C.B., Metner D.A., Lockhart W.L. (1975). Hermaphroditism in a white sucker (*Catostomus commersoni*) from the Athabasca River Alberta. *Trans. Am. Fish. Soc.* 104-413 p.
- Sloof F., Klootwijk-Vandijk E. (1982). Hermaphroditism in the bream *Abramis brama* (L.). *J. Fish Dis.* 5:79-81.
- Smith C., Reichard M., Jurajda P., Przybylski M. (2004). The reproductive ecology of the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Journal of Zoology* 262(2):107-124.
- Soffker M., Tyler C.R. (2012). Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish - a critical review on effects and possible consequences. *Critical Reviews in Toxicology* 42(8):653-668.



Sokolov L.I., L.S. Berdicheski (1989). Acipenseridae. 150-153 p. In: Holcík J. (ed.) The freshwater fishes of Europe. Vol. 1 Part II. General introduction to fishes Acipenseriformes. AULA-Verlag Wiesbaden. 469 p.

Solé M., Barceló D., Porte C. (2002). Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp *Cyprinus carpio* in relation to sewage treatment plants. *Aquat. Toxicol.* 60:233-248.

Solé M., Raldua D., Piferrer F., Barceló D., Porte C. (2003). Feminization of wild carp *Cyprinus carpio* in a polluted environment: plasma steroid hormones gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. Physiol. C* 136:145-156.

Sonnenschein C, Soto A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65(1-6):143-50.

Stentiford G.D., Longshaw M., Lyons B.P., Jones G., Green M., Feist S.W. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar. Environ. Res.* 55:137-159.

Stevens M., Van den Neucker T., Gelaude E., Baeyens R., Jacobs Y., Mouton A., Buysse D., Coeck J. (2011). Onderzoek naar de trekvissoorten in het Schelde-estuarium: Voortplantings- en opgroei-habitat van rivierprik en fint. Brussel. INBO.R.2011.14. 1-71 p.

Sumpter J. P., Johnson A.C. (2008). 10th Anniversary Perspective: Reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: from known knowns to unknown unknowns (and many things in between). *Journal of Environmental Monitoring* 10(12):1476-1485.

Tetreault G.R., Bennett C.J., Shires K., Knight B., Servos M., McMaster M.E. (2011). Intersex and reproductive impairment of two species wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. *Aquat. Toxicol.* 104:278-290.

Thorpe K.L., Maack G., Benstead R., Tyler C.R. (2009). Estrogenic wastewater treatment works effluents reduce egg production in fish. *Environ Sci Technol.* 43(8):2976-82.

Tyler C.R., Jobling S., (2008). Roach, sex, and gender-bending chemicals: the feminization of wild fish in English Rivers. *Bioscience* 58:1051-1059.

UNEP/WHO (2013). State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. / edited by Ake Bergman, Jerrold J. Heindel, Susan Jobling, Karen A. Kidd and R. Thomas Zoeller. United Nations Environment Programme and the World Health Organization. <http://www.unep.org/hazardoussubstances/UNEPsWork/EndocrineDisruptingChemicalsEDCs/tabid/79616/Default.aspx>

Van Ael E., Belpaire C., Breine J., Geeraerts C., Van Thuyne G., Eulaers I., Blust R., Bervoets L., submitted. The impact of persistent organic pollutants and metals in aquatic biota on the ecological status within the Water Framework Directive.

van Aerle R., Nolan M., Jobling S., Christiansen L.B., Sumpter J.P., Tyler C.R. (2001). Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:2841-2847.

van Beek G.C.W. (2003). Kennisdokument grote modderkruiper, *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758). Bilthoven. Kennisdokument 1. 1-38 p.

van den Heuvel M. R. (2010). Recent Progress in Understanding the Causes of Endocrine Disruption Related to Pulp and Paper Mill Effluents. *Water Quality Research Journal of Canada* 45(2):137-144.

Verreycken H., Belpaire C., Van Thuyne G., Breine J., Buysse D., Coeck J., Mouton A., Stevens M., Van den Neucker T., De Bruyn L., Maes D. (2013). An IUCN Red List of freshwater fishes and lampreys in Flanders (north Belgium). *Fisheries Management and Ecology*. In press doi: 10.1111/fme.12052.

Versonnen B.J., Goemans G., Belpaire C., Janssen C.R. (2004). Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution* 128:363-371.

Versonnen B.J., Goemans G., Verslycke T., Arijs K., Belpaire C., Janssen C.R. (2003). First monitoring of the occurrence of endocrine disruption in inland populations of eel (*Anguilla anguilla*), roach (*Rutilus rutilus*), rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) and tench (*Tinca tinca*) in Flanders (Belgium). SETAC U.K./SETAC Europe meeting on endocrine disruptors in the environment - Linking research and policy. York, U.K.

Vethaak A.D., Lahr J., Kuiper R.V., Grinwis G.C.M., Rankouhi T.R., Giesy J.P., Gerritsen A. (2002). Estrogenic effects in fish in The Netherlands: some preliminary results. *Toxicology* 181-182:147-150.

Viganò L., Arillo A., Bottero S., Massari A., Mandich A. (2001). First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *Sci. Total Environ.* 269:189-194.

Viganò L., Mandich A., Benfenati E., Bertolotti R., Bottero S., Porazzi E., Agradi E. (2006). Investigating the estrogenic risk along the River Po and its intermediate section. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51:641-651.

Vine E., Shears, J., Van Aerle R., Tyler C.R., Sumpter J.P. (2005). Endocrine (sexual) disruption is not a prominent feature in the pike (*Esox lucius*), a top predator, living in English waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:1436-1443.

Vrielynck S., Belpaire C., Stabel A., Breine J., Quataert P. (2003). *De visbestanden in Vlaanderen anno 1840-1950. Een historische schets van de referentietoestand van onze waterlopen aan de hand van de visstand, ingevoerd in een databank en vergeleken met de actuele toestand.* Rapport IBW.Wb.V.R.2002.89. Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer en Afdeling Water, AMINAL 271. p.

Waye A., Trudeau V.L. (2011). Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 14(5-7):270-291.

Wheeler J. R., et al. (2005). Vitellogenin: A review of analytical methods to detect (anti) estrogenic activity in fish. *Toxicology Mechanisms and Methods* 15(4):293-306.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme on Chemical Safety) (2002). *Global Assessment of the State-of-the-science of Endocrine Disruptors.* WHO/PCS/EDC/02.2. 180 p.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme on Chemical Safety) (2009). *Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food.* FAO and WHO, Environmental Health Criteria 240.

Woodling J.D., Lopez E.M., Maldonado T.A., Norris D.O., Vajda A.M. (2006). Intersex and other reproductive disruption of fish in wastewater effluent dominated Colorado streams. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 144: 10-15.

Xuefei L., Jing S., Maoyong S., Qunfang Z., Guibin J. (2006). Vitellogenic effects of 17 $\beta$ -estradiol in male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143 (1):127-133.

Xuefei L., Qunfang Z., Maoyong S., Guibin J., Jing S. (2007). Vitellogenic responses of 17 $\beta$ -estradiol and bisphenol A in male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24(2):155-159.

Yalçın, S., Solak, K., Akyurt, İ. (2002). Growth of the catfish *Clarias gariepinus* (clariidae) in the river Asi (Orontes), Turkey. *Cybium* 26:163-172.

Ying G., Kookana R.S., Ru Y. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28(6):545-51.