



Briefrapport 607013005/2007

A.C. de Groot | J.L. Maas | M.J. Wouterse | A. Espeldoorn | B. van Dijk

De Potentiële toxiciteit van oppervlaktewater

Gemeten op acht locaties in de Rijkswateren

RIVM Briefrapport 607013005/2007

De Potentiële toxiciteit van oppervlaktewater Gemeten op acht lokaties in de Rijkswateren

A.C. de Groot
J.L. Maas
M.J. Wouterse
A. Espeldoorn
B. van Dijk

Contact:
A. Sterkenburg
LER
aart.sterkenburg@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van VROM/DGM, in het kader van het project 'Ontwikkeling en toepassing van bioassays voor de beoordeling van waterkwaliteit'.

Rapport in het kort

De bepaling van toxische druk Rijkswateren

Het RIVM heeft in 2005 het oppervlaktewater in Nederland onderzocht op de aanwezigheid van toxische stoffen. Hiervoor zijn op zeven locaties verspreid over het land metingen verricht. Het oppervlaktewater uit de Maas (Eijsden) bleek in 2005 een bijzonder hoge potentiële toxiciteit te hebben (in maart > 15 %). Welke stof/stoffen deze toxiciteit veroorzaakten is onbekend.

Met de meetresultaten zijn de mogelijke risico's voor een ecosysteem berekend (potentiële toxiciteit). Het gaat hierbij om de gezamenlijke werking van de aanwezige stoffen. De stoffen afzonderlijk zijn namelijk in een te lage concentratie aanwezig om te kunnen meten.

De stoffen worden uit het water gehaald door ze te laten hechten aan bolletjes hars. Vervolgens worden ze weer losgehaald, waarna een concentraat van de giftige stoffen ontstaat. Op dit mengsel zijn vijf testen losgelaten, die het effect van de stoffen op kleine microscopische organismen in water meten: Algentest (algen), *Daphniatest* (watervlo), Microtox (bacterie), Thamnotox (kreeftachtige) en Rotox (rotifeer). Daarnaast is de Chydoridetoets uitgevoerd. Deze heeft als meerwaarde dat het betrouwbaarheidsinterval van de potentiële toxiciteit kleiner wordt, terwijl ook gevoeliger gemeten kan worden.

De metingen zijn uitgevoerd in samenwerking met het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA), voor het project 'Ontwikkeling en toepassing van bioassays voor de beoordeling van waterkwaliteit.'

Trefwoorden: potentiële toxiciteit, bioassays, oppervlaktewater, chydoriden

Inhoudsopgave

<i>Samenvatting</i>	1
<i>1 Inleiding</i>	2
1.1 Probleemstelling	2
1.2 Doel van het onderzoek en aanpak	3
1.3 Leeswijzer	4
<i>2. Materiaal en methoden</i>	5
2.1 Monstername	5
2.2 Monsterconcentratie	6
2.3 Monsteropwerking	6
2.4 Toxiciteitbepaling	7
2.5 Berekening potentiële toxiciteit	10
2.6 Toxische druk metalen	11
2.7 Filtratie van het oppervlaktewater	13
<i>3 Resultaten en Discussie</i>	14
3.1 Resultaten toxiciteittoets	14
3.2 Berekening potentiële druk van organische microverontreinigingen	14
3.3 Toxische druk metalen	16
3.4 Toxische druk berekend met een zesde toxiciteittoets (Chydoride)	19
3.5 Toxiciteitbepaling na 0.45µm filtratie	21
<i>4. Conclusie</i>	23
<i>5. Aanbevelingen</i>	23
<i>6. Referenties</i>	24
Bijlage 1: Resultaten EC_{50}^f en LC_{50}^f van het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Schaar van oude Doel, Steenbergen en Wolderwijd.	26
Bijlage 2: Resultaten potentiële toxiciteit berekend zonder de Chydoridetest in het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Schaar van oude Doel, Steenbergen en Wolderwijd.	26
Bijlage 3: Resultaten potentiële toxiciteit berekend met de Chydoridetest in het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Schaar van oude Doel, Steenbergen en Wolderwijd.	27
Bijlage 4: Hard-copy van de Wilcoxon rank sum test over	28

Samenvatting

In 2005 is in samenwerking met het RIZA een campagne uitgevoerd waarin oppervlaktewater bemonsterd werd om daarin toxiciteitmetingen te verrichten in het kader van het project Toxische drukmeting Rijkswateren. Deze rapportage meldt de potentiële toxiciteit (pT) van tweemaandelijks genomen oppervlaktewatermonsters afkomstig van acht locaties, namelijk Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Steenberg, Schaar van oude Doel en Wolderwijd.

De potentiële toxiciteit werd bepaald door de organische microverontreinigingen uit oppervlaktewater te concentreren door adsorptie aan een hars en vervolgens op te nemen in een klein volume water (testmedium). Met het testmedium werden vervolgens zes verschillende biologische testen en toxiciteitsbepalingen uitgevoerd, namelijk: een algen-, een Daphnia-, de Microtox-, de Thamnotox-, Rotox- en een Chydoridetoets.

De Chydoridetoets is een nieuwe toets die dit jaar voor het eerst is geïmplementeerd om de nauwkeurigheid en gevoeligheid van de berekende potentiële toxiciteit te vergroten.

De resultaten zijn weergegeven als een schatting van de potentiële toxiciteit van het oppervlaktewater, ofwel dat percentage van soorten, dat wordt blootgesteld boven hun No-Effect concentratie.

De resultaten laten zien dat in het oppervlaktewater van de Maas de hoogste potentiële toxiciteit wordt gemeten (> 15%).

De chemische normstelling van stoffen in het oppervlaktewater is gebaseerd op metingen na filtratie. De huidige methodiek van de biologische toxiciteitmetingen in het oppervlaktewater gebeurt met ongefilterd oppervlaktewater. Dit jaar is drie keer het oppervlaktewater uit Schaar van oude Doel in dubbele hoeveelheden aangeleverd, zodat parallel gefiltreerd en ongefilterd oppervlaktewater opgewerkt en gemeten kon worden. Uit de resultaten blijkt dat er geen significant verschil is in toxiciteit tussen gefiltreerd en ongefilterd oppervlaktewater.

Het meten van de potentiële toxiciteit door middel van het concentreren van contaminanten uit oppervlaktewater zal een onderschatting zijn van de mogelijke ecotoxicologische effecten van stoffen in oppervlaktewater, om de volgende redenen:

- bij deze methode wordt de specifieke werking van bijvoorbeeld hormoonverstorende stoffen niet meegenomen
- er wordt niet gecorrigeerd voor de inefficiëntie van de concentratiestap van de contaminanten
- de toxische druk veroorzaakt door blootstelling aan anorganische verbindingen (metalen) wordt niet gemeten. Uit modelberekeningen gebaseerd op gemeten veldconcentraties blijkt dat de toxische druk van metalen een substantiële bijdrage kan leveren aan de gehele toxische druk.
- uit modelberekeningen blijkt dat de toxiciteit veroorzaakt door metalen voor meer dan 80% toegeschreven kan worden aan zink, koper en nikkel bij 100% beschikbaarheid, en voor meer dan 80% aan nikkel indien de metaalactiviteiten wordt doorberekend

1 Inleiding

1.1 Probleemstelling

Mede door toedoen van de mens wordt het milieu gewild of ongewild belast met chemische verontreinigingen (lozingen, depositie, storting en ongelukken). Door de toxische druk van deze chemische verontreinigingen kan het ecosysteem worden aangetast, waardoor flora en/of faunasoorten kunnen verdwijnen terwijl andere hierbij floreren. Door verschuiving van dit evenwicht ontstaat een vershraling van de biodiversiteit of verandering van natuurlijke gemeenschappen. Deze verschuiving van de soortensamenstelling in flora en fauna is goed te meten. Om subtiele veranderingen van het ecosysteem aan te kunnen tonen, zijn er verschillende monitoringsprogramma's opgestart. Eén methode om het aquatisch ecosysteem te monitoren is het analyseren van chemische verontreinigingen in het oppervlaktewater om zo het ecosysteem te kunnen diagnosticeren. Een nadeel van deze methodiek is dat op deze manier om economische en analytische redenen slechts een zeer klein gedeelte van de aanwezige toxische stoffen kan worden meegewogen, waardoor het verkregen beeld incompleet is. Een bijkomend probleem van deze wijze van monitoring is, dat slechts voor enkele duizenden verbindingen iets van de ecotoxiciteit bekend is, terwijl de lijst van de European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances (EINECS) meer dan 100.000 verbindingen omvat. Ook kan met deze methode nauwelijks rekening worden gehouden met een eventuele combinatiewerking. Daardoor is het moeilijk de vertaalslag te maken van chemische druk naar toxische druk.

Om toch een beeld te krijgen van de toxische druk in het aquatische ecosysteem, wordt de toxiciteit van het oppervlaktewater bepaald door een vijftal functioneel verschillende soorten biota. Hierbij wordt aangenomen, dat deze soorten qua gevoeligheid voor toxische verbindingen in het oppervlaktewater representatief zijn voor de soorten in het aquatische systeem.

Van elk monster worden de eindpunten (EC_{50}^f of LC_{50}^f , term is beschreven in hoofdstuk 2.4 toxiciteitbepaling) van de vijf toxiciteittoetsen gebruikt om een gevoeligheidsverdeling van soorten te schatten die model staan voor de in het aquatische ecosysteem aanwezige soorten.

Op basis hiervan wordt geschat in hoeverre soorten een toxische druk hebben ondervonden in het originele, dus niet geconcentreerde watermonster. Deze druk wordt weergegeven als potentieel aangetaste fractie (PAF) van soorten, de fractie van soorten die boven de No Observed Effect Concentration (NOEC) is blootgesteld (De Zwart et al. 2002).

1.2 Doel van het onderzoek en aanpak

In het kader van het project toxische drukmeting Rijkswateren werd in 2005 de tweemaandelijke toxiciteit bepaald van acht locaties, Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Schaar van Ouden Doel, Steenbergen en Wolderwijd.

De toxische druk is een maat waarmee de toxicologische risico's van het oppervlaktewater worden gekwantificeerd in termen van Potentiële Toxiciteit (pT). Meting van de potentiële Toxiciteit (pT) bestaat uit drie onderdelen:

- *Een milieuchemisch gedeelte*
Fysisch-chemische technieken worden gebruikt om de organische toxicanten uit het oppervlaktewater te isoleren en te concentreren. Concentreren van organische microverontreinigingen uit het oppervlaktewater is nodig omdat kortdurende toxiciteitsbepalingen worden uitgevoerd en om de toxische stress te isoleren van andere stressfactoren (zoals zouten en nutriënten) die aanwezig kunnen zijn in het oppervlaktewater. Nadeel van deze opwerkingstechniek is dat de terugvindbaarheid ca. 60% bedraagt, hiervoor wordt niet gecorrigeerd (Struijs et al. 2001).
- *Een ecotoxicologisch gedeelte*
Om de toxiciteit van het geconcentreerde oppervlaktewater te bepalen wordt een aantal *in vivo*-bioassays uitgevoerd. *In vivo*-bioassays zijn proeven waarin levende complete organismen worden blootgesteld aan water, sediment, effluent of baggerspecie, of extracten daarvan. Deze testen kunnen worden uitgevoerd in het laboratorium of in een veldsituatie (*in situ*). De proeven kunnen kortdurend zijn (van enkele uren tot dagen) waarmee acute effecten kunnen worden vastgesteld, of langdurend (dagen of maanden), waarmee chronische effecten kunnen worden bepaald (Maas et al. 2003). Voor de pT-methodiek is gekozen om praktische en economische redenen voor kortdurende proeven.
- *Risico berekeningen*
De resultaten van de toxiciteitstoetsen worden omgerekend naar een chronische No Observed Effect Concentratie (NOEC) in termen van de nog net niet effectieve concentratiefactor. Hiermee wordt een cumulatieve gevoeligheidsverdeling voor organismen berekend. De resultaten van de risico schatting worden getoetst aan de voorgestelde normen voor *in-vivo* bioassays (Maas et al. 2003).

Het onderzoek is verricht in samenwerking met het RIZA, waarbij RIZA de bemonstering van het oppervlaktewater uitvoerde en vier van de zes toxiciteitstoetsen deed namelijk: de Daphnia IQ toets, de Thamnotoxtoets en de Rotoxtoets en de Microtoxtoets.

Het oppervlaktewater werd door het RIVM opgewerkt tot waterextracten waarmee de toxiciteitstoetsen werden uitgevoerd. De vijfde en zesde toxiciteitstoets, de algentoets en Chydoridetoets, werden uitgevoerd bij het RIVM. De laatste toets is als pilot studie meegenomen (de resultaten worden in een artikel in H₂O gerapporteerd). De resultaten zijn door het RIVM verwerkt en beschreven in deze rapportage.

1.3 Leeswijzer

In hoofdstuk 2 wordt de methodiek beschreven. Daarin wordt uitgelegd hoe het oppervlaktewater wordt geconcentreerd en welke toxiciteittoetsen worden gebruikt. In hoofdstuk 3 worden de resultaten gegeven en bediscussieerd. De conclusie is beschreven in hoofdstuk 4. In hoofdstuk 5 staat een aantal aanbevelingen.

2. Materiaal en methoden

2.1 Monstername

In 2005 heeft Rijkswaterstaat voor dit onderzoek op acht locaties, namelijk: Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Steenbergen, Schaar van oude Doel en Wolderwijd, tweemaandelijks een oppervlaktewater monster genomen van minimaal 80 liter. Het monster (incl. zwevende stof) werd verzameld in roestvrij stalen vaten van 20 liter. Na aflevering bij het RIVM werden de monsters direct in behandeling genomen. In tabel 1 zijn de bemonsteringslocaties, XY-coördinaten (deze zijn grafisch weergegeven in figuur 1) en bemonsteringsdagen weergegeven.

Tabel 1: Schema met monstercodes, locaties, coördinaten en bemonsteringsdata van 2005.

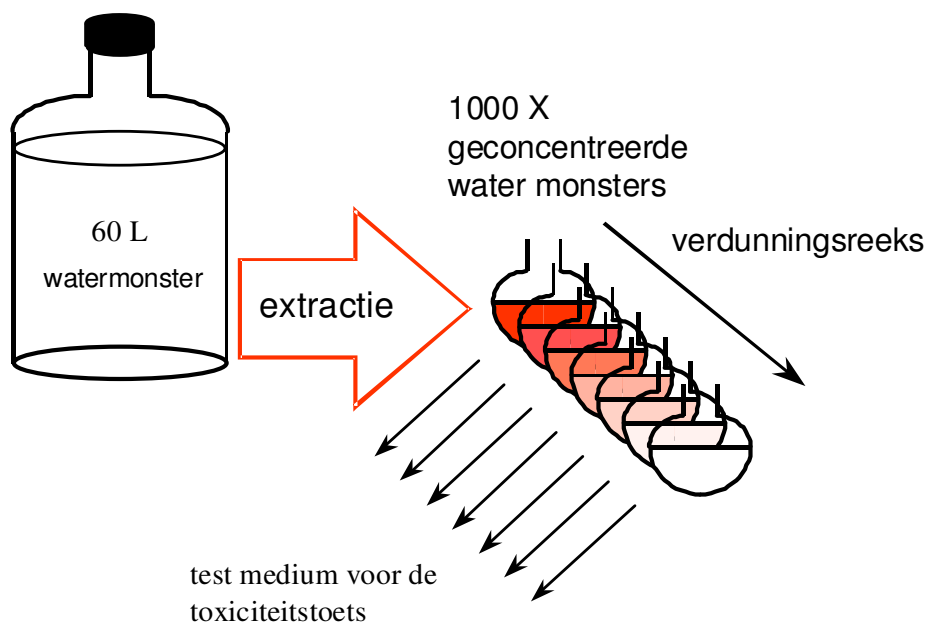
Locatie	XY-coördinaten		Bemonsteringsdata					
	X	Y						
Bovensluis	93200	411900	31-jan	29-mrt	23-mei	18-jul	12-sep	7-nov
Eijsden	177000	310000	18-jan	15-mrt	10-mei	5-jul	30-aug	25-okt
Haringvlietsluis	63400	427600	4-jan	2-mrt	26-apr	21-jun	16-aug	11-okt
Ketelmeer	180677	512107	6-jan	3-mrt	28-apr	23-jun	18-aug	13-okt
Lobith	203500	429750	19-jan	16-mrt	11-mei	6-jul	31-aug	26-okt
Schaar van Oude Doel	75825	374070	12-jan	7-mrt	2-mei	27-jun	23-aug	19-okt
Steenbergen	75750	406440	31-jan	31-mrt	26-mei	21-jul	15-sep	10-nov
Wolderwijd	167309	484672	4-jan	28-feb	26-apr	21-jun	16-aug	10-okt



Figuur 1: Grafische weergave van de bemonsteringslocaties.

2.2 Monsterconcentratie

De opwerkingsmethodiek van het oppervlaktewater bestaat uit het extraheren en concentreren van organische microverontreinigingen. Anorganische toxicanten, waaronder metalen, zouten en nutriënten onttrekken zich aan deze methode. Het oppervlaktewater met het daarin aanwezige zwevende materiaal wordt 48 uur geschud met een hars (XAD 4 en 8) waaraan de aanwezige organische microverontreinigingen worden gebonden. Het hars wordt vervolgens gescheiden van het water en overnacht gedroogd aan de lucht, waarna het wordt geëluëerd met een bekende hoeveelheid aceton. Het aldus verkregen extract wordt in een vriezer bij -20°C bewaard voor verdere opwerkingen. De opwerkprocedure van oppervlaktewater naar de aceton-fase staat beschreven in SOP nr. LER/303/03.



Figuur 2: Procedure voor het opwerken en toetsen van oppervlaktewater.

2.3 Monsteropwerking

Op de dag van het uitvoeren van de toxiciteits-toetsen worden de acetonconcentraten opgewerkt naar de waterfase. Het aceton wordt met behulp van Kuderna-Dänish (KD) destillatie zo goed mogelijk verwijderd en vervangen door water, waarna het met EPA-medium wordt aangevuld tot 60 ml. 60 Liter van het oorspronkelijke monster met de daarin opgeloste organische microverontreinigingen is hiermee theoretisch 1000 keer geconcentreerd. . Figuur 2 geeft de opwerkingsprocedure schematisch weer. Deze methodiek staat beschreven in SOP LER/310/02: “Opwerking van een aceton concentraat tot een watermonster voor aquatische toxiciteits-toetsen”.

2.4 Toxiciteitbepaling.

Om de toxiciteit van het geconcentreerde oppervlaktewater te bepalen wordt er eerst een verdunningreeks gemaakt (zie figuur 2). Deze verdunningsreeks wordt toxicologisch onderzocht. Hiervoor worden vijf toxiciteits-toetsen met verschillende organismen gebruikt. Voor elke toets kan een dosis-respons curve worden berekend waaruit een EC_{50} of LC_{50} kan worden afgeleid. Doordat dit niet een standaard EC_{50} of LC_{50} betreft maar om een concentreringsfactor waarbij 50% van de organismen effecten ondervinden, wordt in dit rapport verder gesproken over een EC_{50}^f of LC_{50}^f . Met andere woorden, wanneer er voor een toxiciteittoets een EC_{50}^f van 10 gerapporteerd wordt, betekend dit dat het oppervlaktewater 10 keer geconcentreerd moet worden om deze EC_{50} te meten. Tevens geldt dat de toxiciteit omgekeerd evenredig is aan de LC_{50}^f of EC_{50}^f , hoe hoger de waarde van LC_{50}^f of EC_{50}^f hoe lager de toxiciteit.

Voor het toetsen van het oppervlaktewater worden vijf organismen gebruikt. Tabel 2 geeft een aantal karakteristieken van de gebruikte toetsen weer. De zesde toets (Chydoride toets) wordt dit jaar als pilot meegenomen.

Tabel 2: Toxiciteittoetsen die gebruikt worden voor het testen van toxiciteit in de opgewerkte monsters.

Toets	Organisme	Toetsduur	Toxicologische Observatie	Toxicologische Parameter
Algen	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	4,5 uur	Fluorescentie na aanslaan fotosynthesysteem	EC_{50}^f (E=remming op fotosynthese)
Daphnia	<i>Daphnia magna IQ</i>	1 uur 15 min	Luminescentie	EC_{50}^f (E=afname enzymactiviteit)
Thamnotox	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24 uur	Sterfte	LC_{50}^f
Rotox	<i>Brachionus calyciflorus</i>	24 uur	Sterfte	LC_{50}^f
Microtox	<i>Vibrio fischeri</i>	5 en 15 min	Remming van luminescentie	EC_{50}^f (E=afname enzymactiviteit)
Chydoride	<i>Chydorus sphaericus</i>	48 uur	Remming v/d beweeglijkheid	EC_{50}^f (E=Immobiliteit)

Daphnia IQ toets

In de *Daphnia magna* IQ test (Aqua Survey, Inc, 1993) wordt de toxiciteit bepaald door de remming te meten van een enzymatische reactie bij *Daphnia magna*. In de test worden hongerige jonge *Daphnia*'s van ca. 4 dagen oud blootgesteld aan een serie verdunningen van de waterconcentraten. De test wordt in triplo uitgevoerd met 5 tot 6 daphnia's per 10 ml oplossing. Na 1 uur blootstelling wordt een tracer verbinding (4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside) toegevoegd aan elke verdunning. Na 15 minuten incubatie wordt de fluorescentie van iedere *Daphnia* met behulp van UV-licht gemeten. De toxiciteit wordt bepaald uit de remming van de enzymatische splitsing van de galactoside uit de tracer. Hoe minder licht gemeten wordt, hoe toxischer het monster is.

Het eindpunt van de test is die verdunning waarbij de *Daphnia* 50% van het licht emiteert ten opzichte van het controle monster (EC_{50}^f).

Deze toxiciteittoets is relatief ongevoelig voor narcotische stoffen maar gevoelig voor pesticiden en detergenten (Vaal en Struijs, 2002).

Thamnotoxtoets

De Thamnotoxtoets is een commercieel verkrijgbare bioassay kit voor het meten van acute toxiciteit in water (Centeno et al. 1995).

Het testorganisme *Thamnocephalus platyurus* is beschikbaar als cysten in gedroogde vorm. Na incubatie van 24 uur in standaard medium onder voortdurende belichting komen deze uit. Na 4 uur acclimatiseren kunnen ze worden gebruikt voor de test. De toxiciteit van de concentraten wordt bepaald als het percentage sterfte binnen 24 uur na blootstelling aan een serie verdunningen. De test wordt uitgevoerd in een multiwell plaat met well volumes van 1 ml. Per testvatje worden 10 organismen toegevoegd. De test wordt in triplo uitgevoerd. Na 24 uur blootstelling worden de onbeweeglijke organismen geregistreerd.

De toxiciteit wordt uitgedrukt als die verdunning waarbij 50% van de testorganismen is gestorven (LC_{50}^f). De toxiciteittoets is relatief ongevoelig voor narcotische stoffen en pesticiden maar gevoelig voor detergenten (Vaal en Struijs, 2002).

Rotoxtoets

De Rotoxtoets is ook een commercieel verkrijgbare bioassay kit voor het meten van acute toxiciteit in water (Snell en Persoone, 1989; Snell et al. 1991).

De test met rotiferen *Brachyonus calyciflorus* wordt op vergelijkbare wijze uitgevoerd als de Thamnotoxtoets. Ook dit organisme is als cysten beschikbaar. De eieren komen na 16-18 uur onder continue belichting uit in een gestandaardiseerd medium. Voor deze test wordt een multiwell plaat gebruikt met een well volume van 0,3 ml. Per testvatje worden 5 organismen toegevoegd. De test wordt in zesvoud uitgevoerd. Na 24 uur blootstelling aan de testconcentratie wordt het aantal dode organismen geregistreerd. De toxiciteit wordt uitgedrukt als LC_{50}^f . Dat is die verdunning van het concentraat waarbij 50% van de organismen is gestorven.

De gevoeligheid van de rotoxtoets voor organische microverontreiniging is onbekend.

Microtoxtoets

Bij de Microtoxtoets (Bulich, 1979; Bulich en Isenberg, 1981) wordt *Vibrio fischeri* gebruikt. Het organisme is een luminescerende bacterie. Van de luminescerende eigenschap wordt gebruik gemaakt bij de Microtoxtoets.

Wanneer deze bacterie in contact komt met een toxische stof zal het celmetabolisme veranderen wat directe gevolgen heeft voor de hoeveelheid licht die deze bacterie nog kan uitzenden.

De gevriesdroogde bacteriën worden in een reconstitutie medium opgewekt, waarna een hoeveelheid bacteriesuspensie wordt toegevoegd aan 3 ml van een verdunningsreeks. De lighthoeveelheid wordt fotometrisch bepaald na 5 en 15 minuten. Het eindpunt van de test is de laagste verdunningsconcentratie waarbij de lichtemissie is gedaald tot 50%, onafhankelijk of deze wordt gemeten na 5 of 15 minuten (EC_{50}^f).

Deze toxiciteittoets is gevoelig voor narcotische stoffen en detergents en ongevoelig voor pesticiden (Vaal en Struijs, 2002).

Algentoets (PAM)

De algentoets (Struijs et al. 2003 en Beusekom et al. 1999) wordt uitgevoerd met het testorganisme *Raphidocelis subcapitata*, (vroeger *Selenastrum capricornutum*). Met deze toets wordt het effect van de toxicanten op de fotosynthese gemeten.

De algen worden 4,5 uur blootgesteld aan een verdunningsreeks waarna de remming van de fotosynthese-efficiëntie wordt gemeten met behulp van een Pulse-Amplitude-Modulation fluorometer (PAM).

Fotosysteem I van de algen wordt door middel van een lichtpuls met hoge intensiteit verzadigd. Hierbij wordt het ontvangen licht omgezet in een chemisch energierijke verbinding (ATP). Bij een goed functionerende algencel wordt de ATP doorgegeven aan fotosysteem II, waar de ATP wordt gebruikt voor de vorming van glucose (fotosynthese). Als fotosysteem II geremd is door de blootstelling aan toxische stoffen, kan fotosysteem I de ATP niet doorgeven, en valt even later de ATP terug naar een minder energierijke toestand (ADP). Dit heeft tot gevolg dat de cel licht van een lagere frequentie zal uitzenden. De uitgezonden lichtintensiteit is een maat voor het disfunctioneren van de fotosynthese. Wanneer 50% van de lichtintensiteit wordt gemeten ten opzichte van de controle is dat het eindpunt voor de test. De verdunning van het concentraat waarbij deze lichtopbrengst wordt gemeten is de EC_{50}^f .

De toets is gevoelig voor herbiciden en relatief ongevoelig voor narcotische verbindingen en detergents (Vaal en Struijs, 2002).

Chydoridetoets

Deze toxiciteittoets loopt voor het eerst dit jaar mee naast de reguliere toxiciteittoetsen. De resultaten van het onderzoek naar de mogelijke implementatie van de chydoridetoets bij de pT-meting worden elders nog gepubliceerd. Na 48 uur blootstelling aan de testconcentratie wordt het aantal onbeweeglijke organismen geregistreerd. Hierbij wordt gekeken of het organisme stilligt op de bodem of hangt aan de oppervlaktespiegel met nog wel bewegende zwem- of filterbogen. De toxiciteit wordt uitgedrukt als EC_{50}^f , dat is die verdunning waarbij 50% van de organismen immobiel zijn.

2.5 Berekening potentiële toxiciteit

De eindpunten van de toxiciteitmetingen zijn de basis voor de berekening van de potentiële toxiciteit van de watermonsters. Hiermee wordt een cumulatieve gevoeligheidsverdeling gefit door de meetpunten, zoals is beschreven door Roghair et al. (1997). Met behulp van deze fit wordt de potentiële toxiciteit geschat als de fractie van de generieke soortenverzameling die in het ongeconcentreerde watermonster chronisch wordt blootgesteld boven de NOEC (potentieel aangetaste fractie, PAF).

De No-Effect Concentration factor ($NOEC^f$) wordt berekend uit de gemeten EC_{50}^f of LC_{50}^f , door aan te nemen dat de $NOEC^f$ gemiddeld over alle soorten een factor 10 lager ligt dan de EC_{50}^f of LC_{50}^f (De Zwart et al. 2002).

$$NOEC^f = \frac{EC_{50}^f}{10} \text{ en } NOEC^f = \frac{LC_{50}^f}{10} \quad \text{Formule 1}$$

De organismen gevoeligheidsverdelingscurve wordt beschreven met de volgende functie (De Zwart et al. 2002) :

$$PAF = F(C^f) = F(x) = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{{}^{10}\log(C^f) - \alpha}{\beta}\right)}} \quad \text{Formule 2}$$

Hierbij geldt:

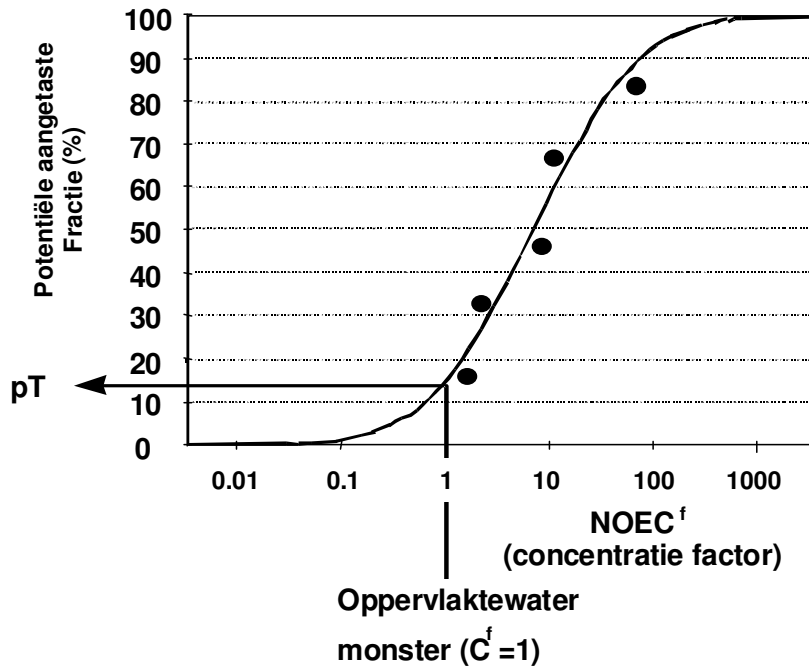
α is het gemiddelde van de log getransformeerde $NOEC^f$ -waarden van de verschillende soorten:

$$\alpha = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n {}^{10}\log(NOEC_i^f) \quad \text{Formule 3}$$

β wordt geschat uit de standaarddeviaties van de log getransformeerde $NOEC^f$ -waarden van de verschillende soorten:

$$\beta = \frac{\sqrt{3}}{\pi} \cdot s = \frac{\sqrt{3}}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n ({}^{10}\log(NOEC_i^f) - \alpha)^2} \quad \text{Formule 4}$$

Om de potentiële toxiciteit van het oppervlaktewater te berekenen wordt in formule 2 (bij C^f) het getal 1 ingevuld (de waarde voor het ongeconcentreerde oppervlaktewater monster). In figuur 3 wordt de bovenstaande berekening grafisch weergegeven.



Figuur 3: Grafische presentatie van de pT-berekening

2.6 Toxische druk metalen.

De bovenstaande methode is alleen geschikt om acute effecten van geconcentreerde organische microverontreinigingen te meten. Hormonale effecten en anorganische toxicanten, waaronder metalen en zouten, onttrekken zich aan de pT-methode.

De toxische druk van metalen kan door middel van een berekening worden bepaald (Struijs et al. 2003). Voor elke gemeten metaal in het oppervlaktewater werd een afzonderlijke PAF uitgerekend met behulp van formule 2.

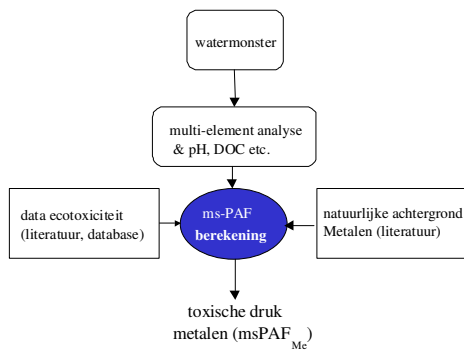
De α en β parameters van de gevoeligheidsverdelingscurve van de afzonderlijke metalen zijn door Crommentuijn et al. (1997) berekend. Deze α en β van de afzonderlijke metalen worden gebruikt met de gemeten concentratie van metalen in het oppervlaktewater om de potentiële aangetaste fractie te berekenen.

De gecombineerde toxiciteit van alle metalen werd uitgerekend ($ms\text{-}PAF_{me}$) volgens de respons-product methode van Hamers et al. (1996) en Traas et al. (2002) waarbij voor ieder metaal een verschillend werkingsmechanisme verondersteld wordt (formule 5).

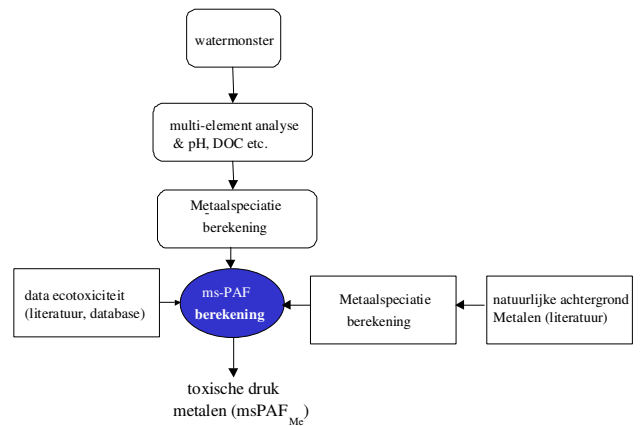
$$PAF_{berekend} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PAF_{totaal,i}) \quad \text{Formule 5}$$

Algemeen wordt aangenomen dat de effecten in standaard aquatische toxiciteitstoetsen tweegebracht worden door de vrije metaalionen. De concentratie aan vrije metaalionen is slechts een deel van het totaalgehalte aan metalen, dat aanwezig is in

het oppervlaktewater. Organische en anorganische componenten in het oppervlaktewater kunnen namelijk de gehalten aan vrije metaalionen, en dus de biobeschikbaarheid van deze ionen, aanzienlijk reduceren. Voor metaal in water wordt daarom de “biologische beschikbare fractie” gedefinieerd als fractie van het vrije metaal ion ten opzichte van de operationeel gedefinieerde totaalconcentratie van het metaal (totaal opgeloste concentratie na filtratie over 0,45µm en aangezuurd tot pH < 2). Standaard oplossingen voor aquatische toxiciteitstoetsen bevatten nauwelijks organisch materiaal en aangenomen kan worden dat in deze testen al het aanwezige metaal beschikbaar is voor effecten op organismen in de vorm van vrije metaalionen. Op dit moment is het echter nog niet goed mogelijk om de vrije metaalconcentratie in oppervlaktewater te meten of te voorspellen. Om toch een zo goed mogelijke schatting te krijgen van de potentiële toxiciteit van het oppervlaktewater, is in eerste instantie in deze studie de worst-case aanname gedaan dat de gemeten metaalconcentraties 100% beschikbaar zijn (figuur 4). Daarnaast is met behulp van een speciatieberekeningsmodel, WHAM6 een schatting gemaakt van het beschikbare vrije metaal ion (figuur 5).



Figuur 4: Op chemische analyse en toxiciteitdata van metalen gebaseerde msPAF_{me}.



Figuur 5: Op beschikbaarheid en toxiciteitdata van metalen gebaseerde msPAF_{me}.

2.7 Filtratie van het oppervlaktewater.

Het meten van de toxiciteit met behulp van de hier bovenbeschreven pT-methode wordt gedaan met ongefilterd oppervlaktewater. Binnen het projectteam is de vraag gerezen welk invloed het filtreren van het oppervlaktewater zal hebben op de toxiciteit. Om deze reden is een pilot gestart medio 2005, waarin het oppervlaktewater uit Schaar van oude Doel in dubbele hoeveelheden aangeleverd werd.

Er is gekozen voor het oppervlaktewater uit Schaar van oude Doel omdat hier in het verleden altijd toxiciteit werd aangetoond, voor dit experiment is de dubbele hoeveelheid oppervlaktewater bemonsterd.

Het monster werd in tweevoud ingezet, 60 liter ongefilterd oppervlaktewater en 60 liter gefiltreerd oppervlaktewater.

Om het oppervlaktewater te filteren werd gebruik gemaakt van speciale filterunits (0.45µm) die in het veldwerk worden gebruikt om grondwater te filteren.

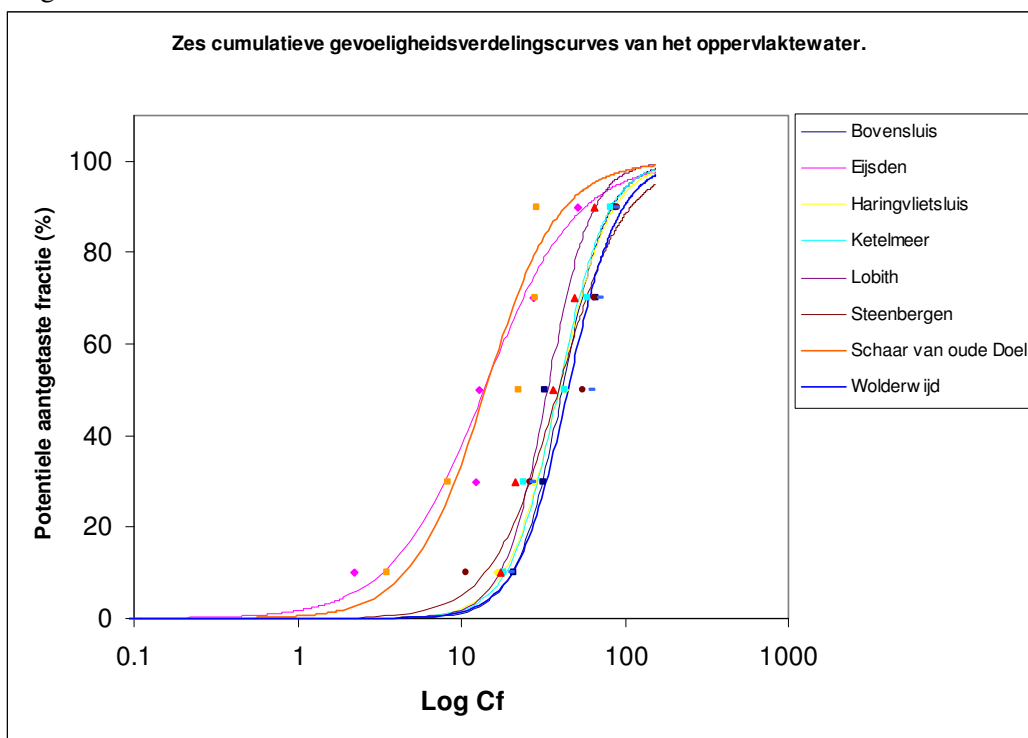
3 Resultaten en Discussie

3.1 Resultaten toxiciteittoets

De gemeten eindpunten van de toxiciteittoetsen zijn weergegeven in bijlage 1.

3.2 Berekening potentiële druk van organische microverontreinigingen

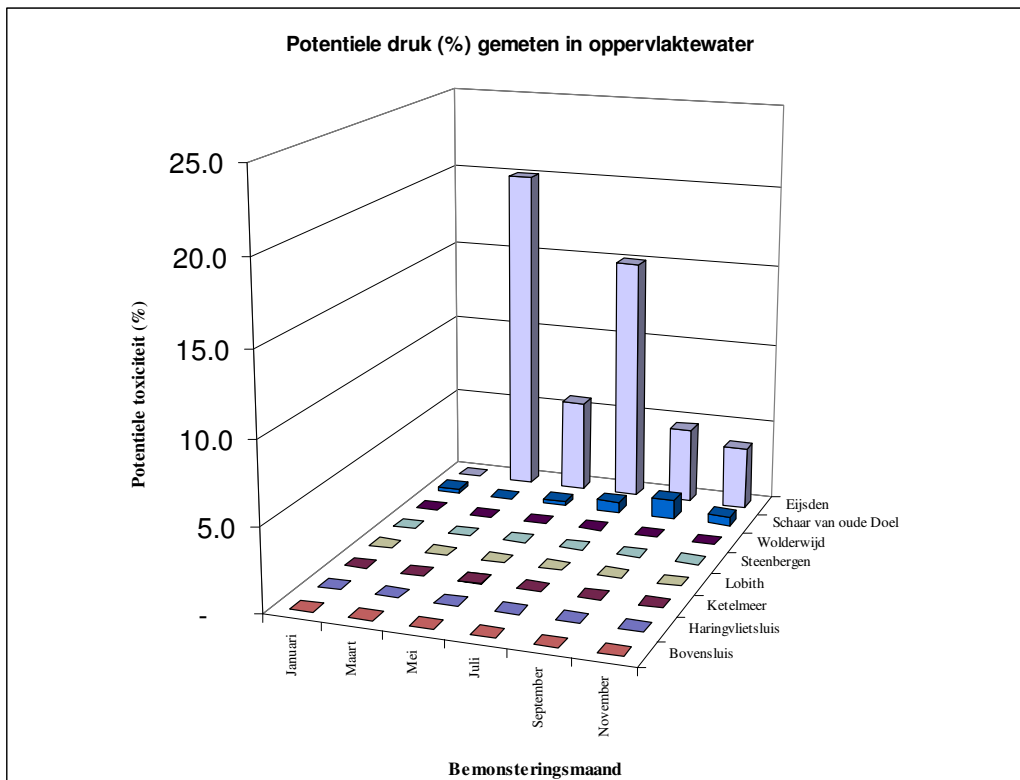
Om de potentiële druk in het oppervlaktewater te berekenen worden de formules gebruikt van hoofdstuk 2.5. In figuur 6 worden de gevoeligheidsverdelingscurves weergegeven van de gemiddelde toxiciteitdata van 2005. Hierbij wordt de log van de No Effect Concentration factor ($NOEC^f$) uitgezet tegen de gemiddelde potentiële aangetaste fractie.



Figuur 6: Gevoeligheidsverdelingscurves van het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Steenbergen, Schaar van ouden Doel en Wolderwijd.

Uit deze verdeling wordt de potentiële druk (pT) bepaald als de PAF-waarde waarbij de concentratiefactor (C^f) 1 is (De Zwart et al. 2002).

Naarmate het oppervlaktewater toxischer wordt zal de s-curve naar links verschuiven. In figuur 7 wordt de potentiële druk van de acht locaties grafisch weergegeven, de data wordt in bijlage 2 weergegeven. Hierbij is de spreiding in het resultaat niet weergegeven omdat dit het beeld niet verduidelijkt.



Figuur 7: Resultaten potentiële druk (in %) gemeten in het oppervlaktewater van de Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Steenberg, Schaar van ouden Doel en Wolderwijd.

Uit figuur 7 kan worden afgeleid dat het oppervlaktewater uit Eijsden (Maas) erg toxisch is. In de maand maart wordt de NOEC voor meer van 15% van de organismen overschreden.

Vooraf Daphnia bleek ernstige effecten te ondervinden van de Eijsden monsters (zie tabel bijlage 1), zelfs zozeer dat in maart het ongeconcentreerde monster acuut toxisch bleek.

3.3 Toxische druk metalen.

Het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA) heeft de gegevens van metalen, nutriënten, pH en DOC van 2005 in het oppervlaktewater van de volgende locaties doorgegeven, Lobith, Eijsden, Bovensluis, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Schaar van Oude Doel en Steenbergen.

In Tabel 3 staan de jaargemiddelden van deze locatie weergegeven. Voor Haringvlietsluis en Ketelmeer zijn er te weinig data bekend waardoor deze locaties niet verder worden meegenomen.

Tabel 3: Gemiddelde gehalten en achtergrondwaarden van metalen, nutriënten, opgelost koolstof en pH gemeten in het oppervlaktewater uit Lobith, Eijsden, Bovensluis, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Schaar van ouden Doel en Steenbergen.

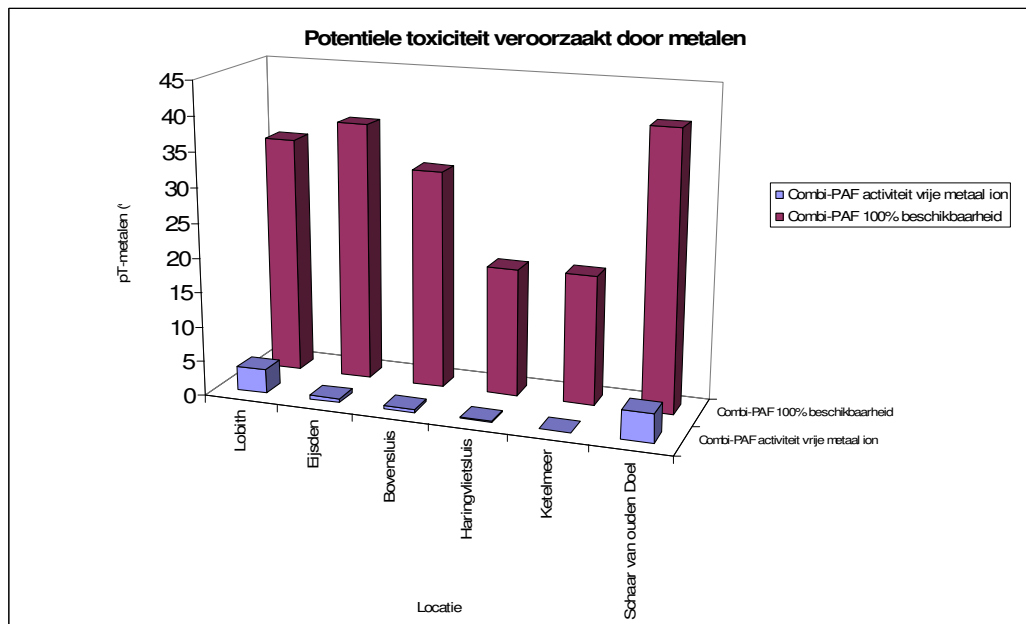
Element	Eenheid	Lobith	Eijsden	Bovensluis	Haringvlietsluis	Ketelmeer	Schaar van ouden Doel	Steenbergen
Ni	µg/l	2,25	4,13	3,39	2,19	1,84	4,48	
Pb	µg/l	1,47	1,77	1,62	0,40	0,33	2,57	
Cr	µg/l	1,55	0,92	2,05	0,32	0,47	4,46	0,37
Cu	µg/l	3,52	2,54	3,25	2,08	2,11	3,52	2,23
Cd	µg/l	0,063	0,668	0,089	0,049	0,032	0,313	0,041
Hg	µg/l	0,012	0,006	0,014	0,006	0,004	0,028	
Zn	µg/l	19	20	14	5	6	20	
Ba	µg/l	95	25		58			
Na	mg/l	57						
Mg	mg/l	11						
Br	mg/l	0,18	0,075					
Ca	mg/l	77					192	
Cl	mg/l	103	49	96	116	99	4843	374
K	mg/l	4,81	4,22	5,31	5,35		106,46	
NO3	mg/l	2,66	2,84	2,56	2,25	2,72	3,66	
SO4	mg/l	62	46	59	60	63	702	
DOC	mg/l	3,30	3,54	3,40	3,10	5,00	5,26	7,50
HCO3	mg/l	186						
pH		8,0	7,7	7,9	8,2	8,1	7,7	

Naast dat de totale metaalconcentratie wordt met behulp van een speciatiemodel (waarbij de CO₂ druk mee is genomen in de berekening) een schatting gemaakt van de activiteit van het vrij metaal ion. Voor de berekening van de activiteit wordt gebruikt van WHAM 6. De resultaten van deze berekening zijn weergegeven tabel 4.

Tabel 4: De activiteit van het vrij metaal ion in het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith en Schaar van ouden Doel berekend met het speciatiemodel WHAM6.

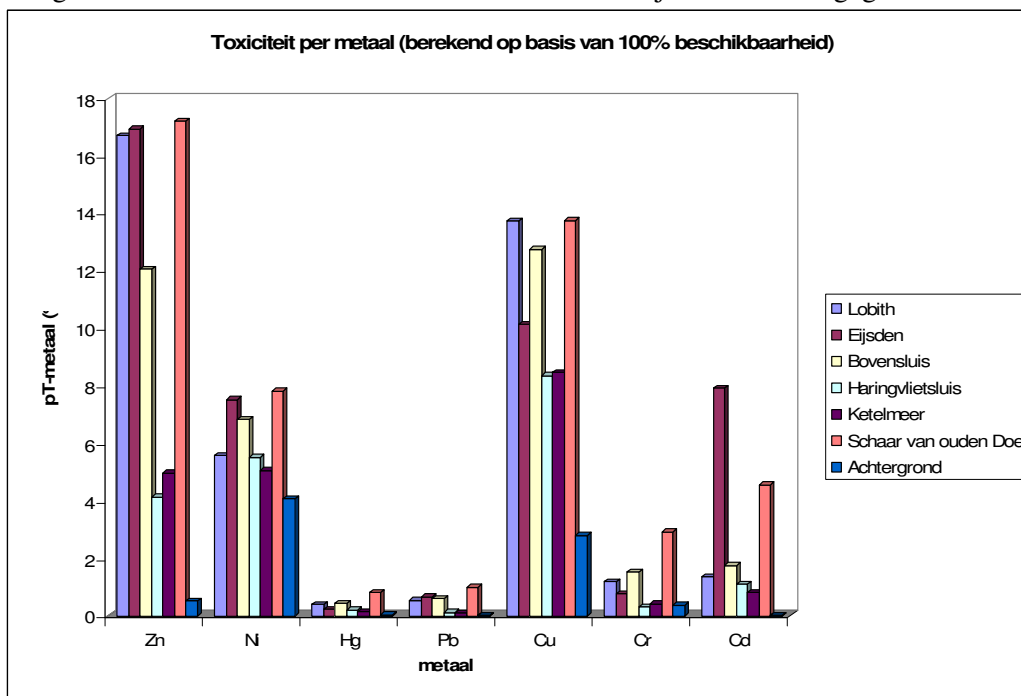
	Lobith	Eijsden	Bovensluis	Haringvlietsluis	Ketelmeer	Schaar van ouden Doel
Chroom ($\mu\text{g/l}$)	3,55E-11	7,03E-12	8,62E-12	1,95E-14	1,3E-18	1,13E-10
Nikkel ($\mu\text{g/l}$)	0,53	0,02	0,02	2,19E-03	5,42E-11	0,90
Koper ($\mu\text{g/l}$)	1,03E-05	7,66E-07	9,34E-07	1,69E-08	5,15E-11	4,60E-06
Zink ($\mu\text{g/l}$)	0,72	0,02	0,01	5,20E-04	1,77E-10	0,49
Cadmium ($\mu\text{g/l}$)	0,01	1,52E-03	1,93E-04	1,87E-05	9,45E-13	0,01
Kwik ($\mu\text{g/l}$)	1,3E-32	1,76E-32	4,49E-32	6,01E-35	1,41E-37	1,16E-32
Lood ($\mu\text{g/l}$)	1,68E-05	4,34E-06	2,96E-06	4,01E-08	9,75E-12	2,02E-05

De totale en de metaalactiviteit concentraties worden omgerekend met behulp van formule 5 en 6 naar een $\text{ms-PAF}_{\text{me}}$. De resultaten worden grafisch weergegeven in figuur 8.

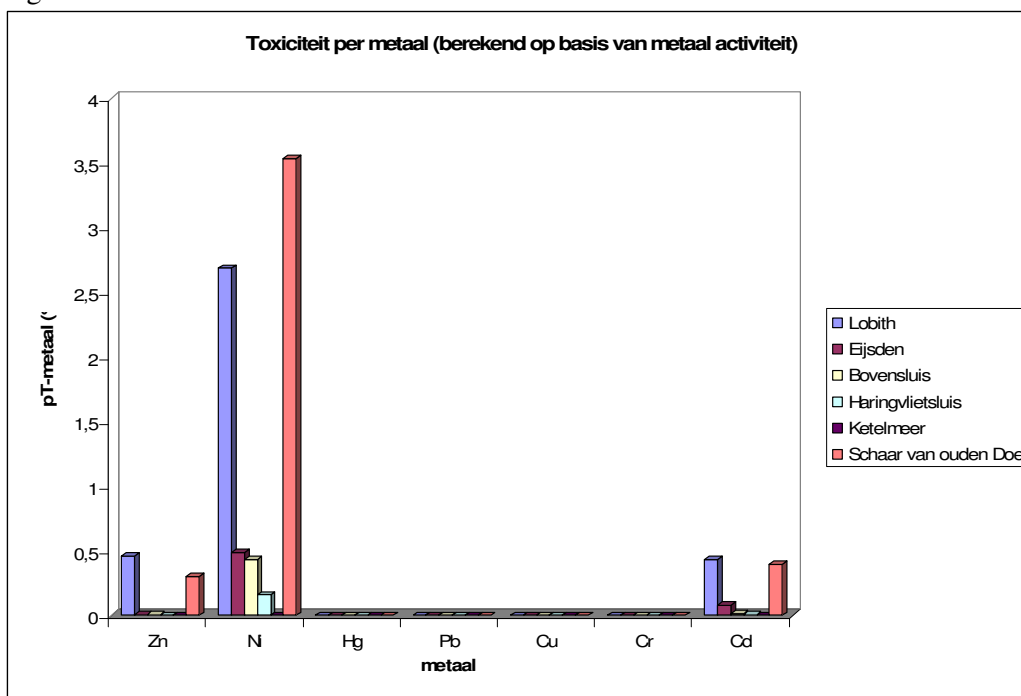


Figuur 8: De potentiële toxiciteit veroorzaakt door metalen in het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Lobith, Schaar van ouden Doel en Wolderwijd.

In figuur 9 en 10 wordt de toxiciteit van elk afzonderlijk metaal weergegeven.



Figuur 9: Toxiciteit veroorzaakt door de totaal metaal concentratie.



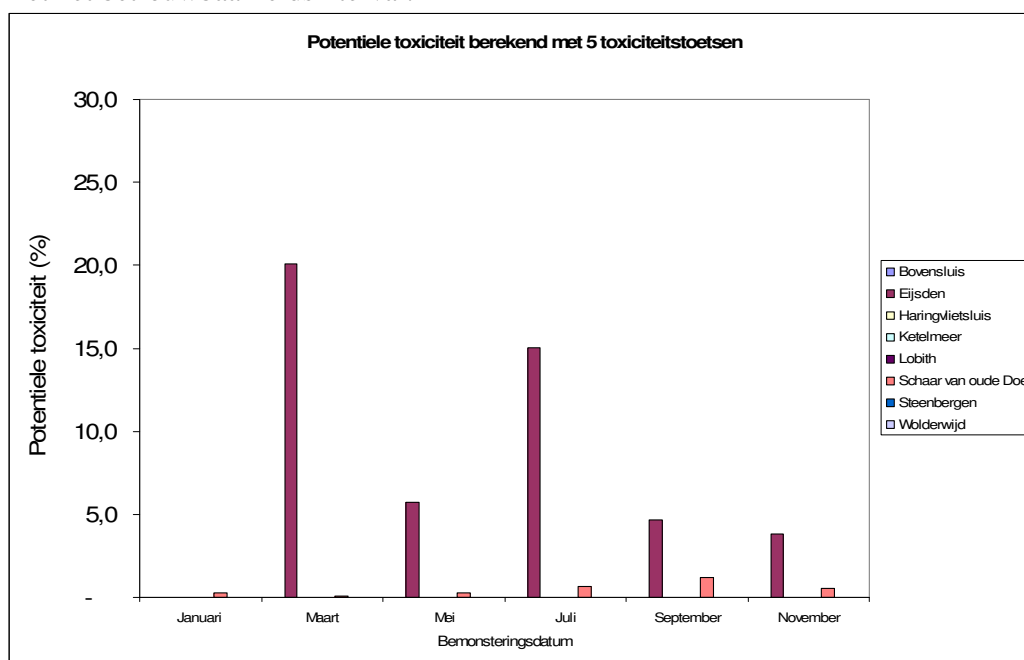
Figuur 10: Toxiciteit veroorzaakt door het vrije metaalion berekend m.b.v. Wham 6

Uit figuur 9 blijkt dat bij 100% beschikbaarheid van metalen, zink, nikkel en koper voor meer dan 80% van de totale toxiciteit veroorzaakt door metalen voor hun rekening nemen. Indien we rekening houden met complexvorming van metalen aan kationen en humuszuur (figuur 10) dan neemt nikkel voor meer dan 80% van de totale toxiciteit voor hun rekening.

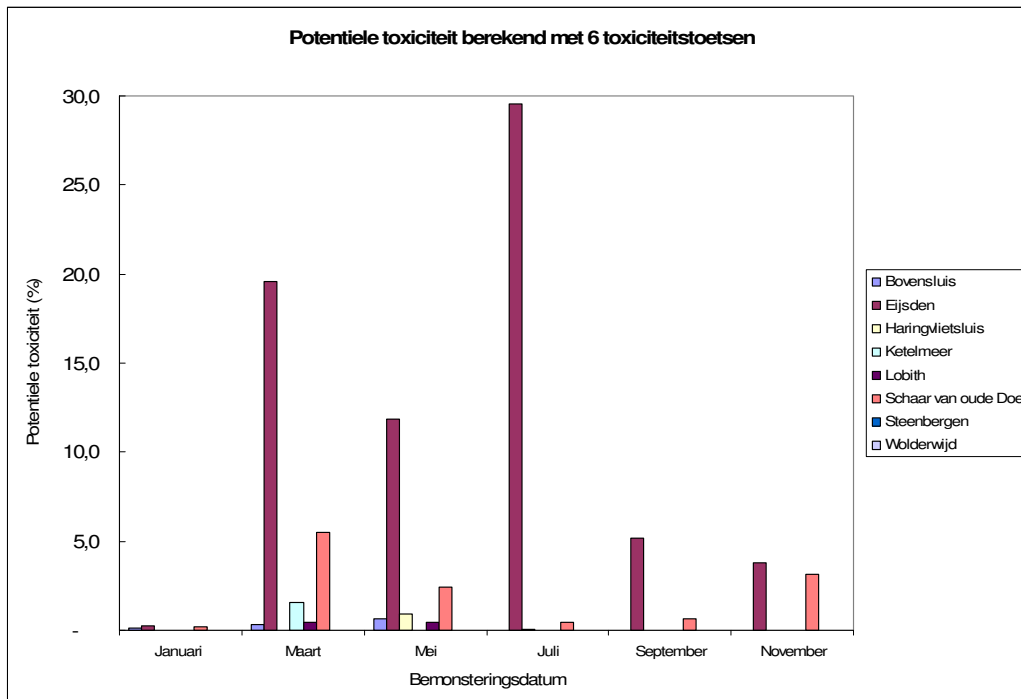
3.4 Toxische druk berekend met een zesde toxiciteitstoets (Chydoride)

Dit jaar is een zesde toxiciteitstoets uitgevoerd op het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Steenbergen, Schaar van oude Doel en Wolderwijd.

Deze test is nog in ontwikkeling, maar de resultaten van deze pilot zijn wel bruikbaar. In de figuren 11 en 12 worden de resultaten van de potentiële toxiciteit weergegeven met het betrouwbaarheidsinterval.



Figuur 11: Potentiële toxiciteit berekend zonder de Chydoridetoets



Figuur 12: Potentiële toxiciteit berekend met de Chydoridetoets

Uit de figuren 11 en 12 blijkt dat door het toevoegen van de Chydoridetoets voor sommige monsters een hogere potentiële toxiciteit wordt berekend. Dit kan verklaard worden doordat de Chydoridetoets erg gevoelig is voor de aanwezige toxicanten in het onderzochte oppervlaktewater.

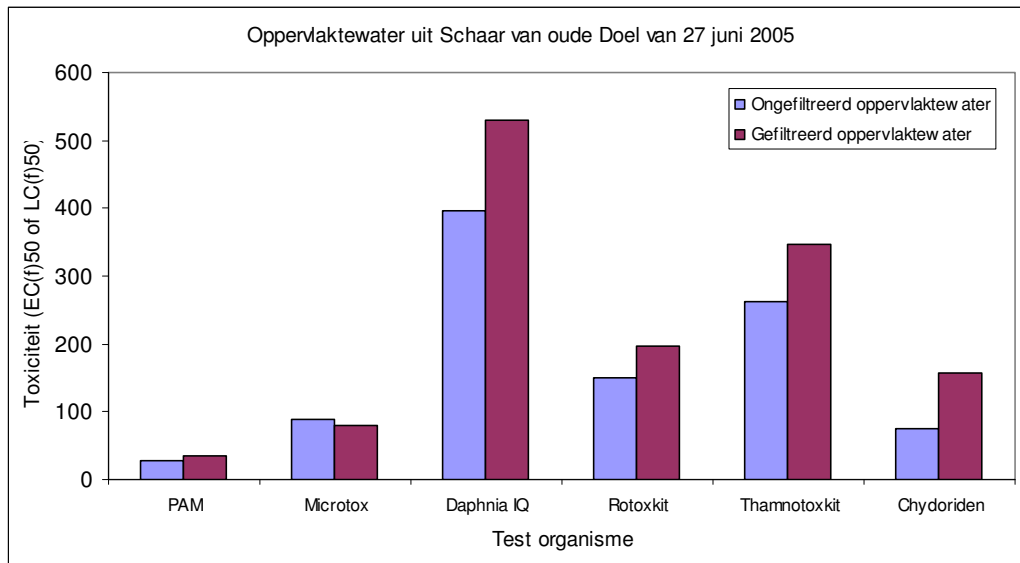
De Chydoridetoets zou een andere toxiciteitstoets kunnen vervangen of als zesde toxiciteitstoets worden ingevoerd voor het beschrijven van de gevoeligheidscurve waaruit de potentiële toxiciteit van het oppervlaktewater wordt berekend.

Door het invoeren van een extra 6^e toxiciteitstoets wordt de curve nauwkeuriger beschreven waardoor het betrouwbaarheidsinterval van de berekende potentiële toxiciteit in theorie kleiner zou moeten worden (zie formule 4).

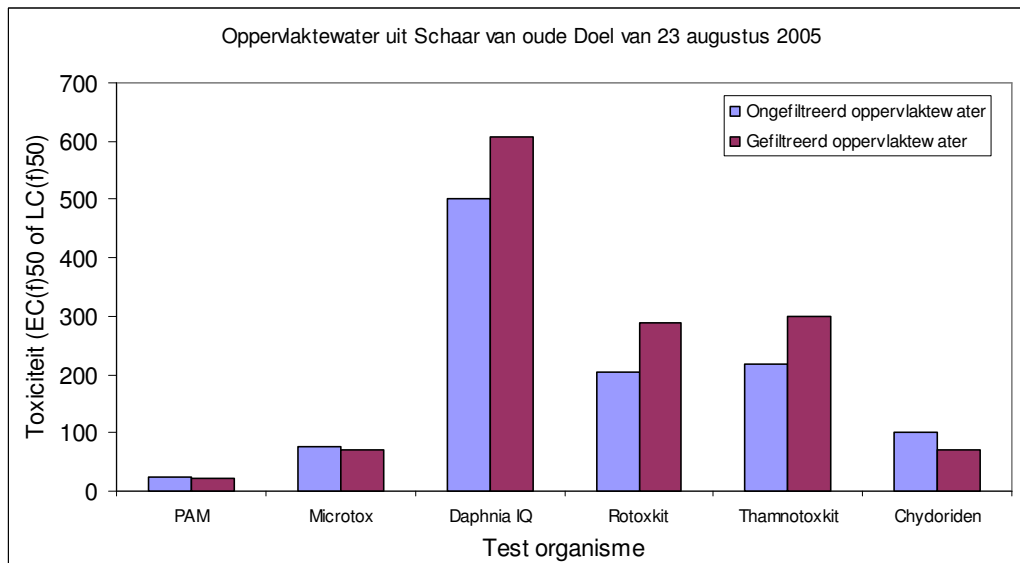
Een nadeel van een extra toxiciteitstoets zijn de bijkomende kosten voor het project.

3.5 Toxiciteitbepaling na 0.45µm filtratie.

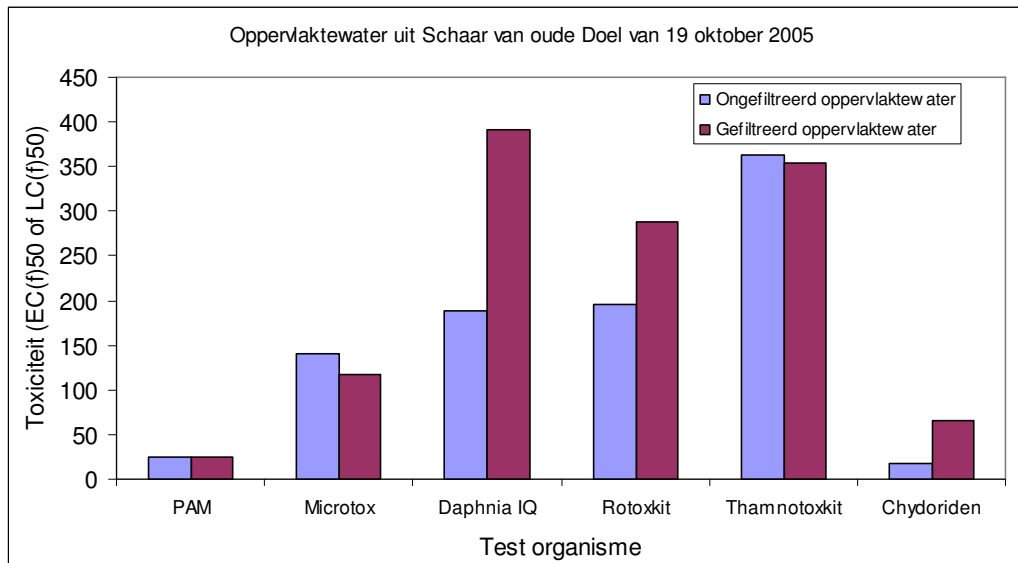
De resultaten van de drie gefiltreerde en ongefiltreerde monsters uit Schaar van Ouden Doel zijn in de figuren 13, 14 en 15 grafisch weergegeven. In deze grafieken worden de afzonderlijke toxiciteittoetsen met elkaar vergeleken.



Figuur 13: Toxiciteitdata bioassays van oppervlaktewater uit Schaar van oude Doel (27 juni)



Figuur 14: Toxiciteitdata bioassays van oppervlaktewater uit Schaar van oude Doel (23 aug.)



Figuur 15: Toxiciteitdata bioassays van oppervlaktewater uit Schaar van oude Doel (19 okt.)

Om statisch te kunnen aantonen of er voor elke afzonderlijke toxiciteittoets een significant verschil is tussen gefiltreerd en ongefiltreerd oppervlaktewater is de dataset ontoereikend ($N=3$). Om deze reden kan er geen uitspraak worden gedaan of er een verschil is tussen gefiltreerd en ongefiltreerd oppervlaktewater voor elke individuele toxiciteittoets.

Een andere benadering is het methodisch bekijken van de vraagstelling. De 0 hypothese is dat er methodisch geen verschil is tussen het ongefiltreerde en gefiltreerde oppervlaktewater. Met deze stelling kunnen alle toxiciteittoetsen van het gefiltreerde en ongefiltreerde oppervlaktewater bij elkaar worden genomen waardoor er een dataset ontstaat van $N=18$.

Deze 0 hypothese wordt getoetst met behulp van de Wilcoxon rank sum test. Hieruit blijkt dat de 0 hypothese aangenomen kan worden, er is geen significant verschil tussen de toxiciteitsmetingen van ongefiltreerd en gefiltreerd oppervlaktewater (bijlage 4).

4. Conclusie

- In het oppervlaktewater uit de Maas (Eijsden) is dit jaar een bijzonder hoge potentiële toxiciteit gemeten (in maart > 15 %). Vooral de bij de Daphnia IQ test is het oppervlaktewater erg toxisch. Welke stof/stoffen deze toxiciteit veroorzaken is onbekend.
- De toxiciteit gemeten in het oppervlaktewater is een onderschatting van de werkelijke toxiciteit omdat onder andere anorganische verontreinigingen en hormoonverstorende stoffen in het oppervlaktewater geen bijdrage leveren aan de gemeten toxiciteit. Bovendien is de terugvindbaarheid van de organische microverontreinigingen gemiddeld 60% waarvoor niet gecorrigeerd wordt.
- Metalen leveren waarschijnlijk een substantiële bijdrage aan de totale toxiciteit in het oppervlaktewater.
- Bij 100% beschikbaarheid van de metalen zijn zink, nikkel en koper verantwoordelijk voor meer dan 80% van de totale toxiciteit in het oppervlaktewater. voor hun rekening nemen.
- De Chydoridetoets die dit jaar parallel heeft mee gedraaid naast de reguliere bioassays heeft als meerwaarde dat het betrouwbaarheidsinterval van de potentiële toxiciteit kleiner wordt maar ook dat er gevoeliger gemeten kan worden.
- Het filteren van oppervlaktewater over een 0,45µm filter geeft geen significant verschil tussen de toxiciteitsmetingen van het ongefiltreerd en gefiltreerd oppervlaktewater.

5. Aanbevelingen

- De pilot over effecten van filtratie over een 0,45µm filter voor bio-assays is ten dele uitgevoerd. Er is aangetoond dat er geen significant verschil is tussen het gefiltreerde en ongefiltreerde oppervlaktewater, maar de data was ontoereikend om te kunnen aantonen of dit ook geldt voor elke afzonderlijke toxiciteitstoets. Dit zou nader onderzocht moeten worden.
- De Chydoridetoets te implementeren in de testbatterij voor toxiciteitsmetingen omdat de meerwaarde van deze toets de gevoeligheid en betrouwbaarheid van de methodiek vergroot.

6. Referenties

- Aqua Survey, Inc. 1993. *Daphnia magna* IQ toxicity test, technical information update. Aqua Survey, Inc, 499 Point Breeze R.D, Flemington, NJ. USA.
- Beusekom van S.A.M, Admiraal W, Sterkenburg A. & D. de Zwart, 1998, Handleiding PAM-test ECO-notitie 98/09.
- Bulich, A.A. 1979. Use of the luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In *Aquatic Toxicology*. ASTM 667, Markings, L.L. and R.A. Kimerle, Eds, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: pp. 98-106.
- Bulich, A.A. and D.L. Isenberg. 1981. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assesment in aquatic toxicity. *ISA Transactions*, 20: 29-33
- Centeno, M.D, G. Persoone and M.P. Goyvaerts. 1995. Cyst-based toxicity tests IX: the potential of *Thamnocephalus platyurus* as test species in comparison with *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10: 275-282
- Colombon, M, Van de Kamp R.E, Struijs, J. Procedures for extracting organic micropollutants from water samples to monitor toxicological stress. RIVM Report No. 607042008, 1997.
- De Zwart D, 2002, Observed regularities in species sensitivity distributions for aquatic species. In Leo Posthuma, Glenn W. Suter II and Theo P. Traas; *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, blz 133-154.
- De Zwart, D. and A. Sterkenburg, blz 383-402, 2002, Toxicity-based assesment of water quality. In Leo Posthuma, Glenn W. Suter II and Theo P. Traas: *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, 2002
- Hamers T, Aldenberg T, Van de Meent D (1996) Definition report – Indicator effects toxic substance (tox). RIVM reports no. 607128001
- Maas J.L, van de Plassche E.J, Straetmans A, Vethaak A.D, A.C. Belfroid, 2003, Normstelling voor bioassays, RIZA rapport 2003.005, RIKZ rapport nr 2003.007.
- Roghair, C.J, Struijs, J, and D. de Zwart, 1997. Measurement of toxic potency of fresh waters in The Netherlands-part A: Methods. RIVM Reports No. 607504004.
- Snell, T.W. and G. Persoone. 1989. Acute toxicity bioassay using rotifers. II. A freshwater test with *Brachionus rubens*. *Aquatic Toxicology*, 14: 81-92
- Snell, T.W, Moffat B.D, Janssen C. and G. Persoone. 1991. Acute toxicity bioassay using rotifers.IV.Effect of cyst age, temperature and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21: 308-317

SOP nr. LER/303/03, 25 juni 2003. Voorschrift voor het concentreren van organische microverontreinigingen uit water met behulp van XAD-harsen.

SOP nr. LER/310/02, 25 juni 2003. Opwerking van een acetonconcentraat tot een watermonster voor aquatische toxiciteitstoetsen.

Struijs J, Van de Kamp, R.E. (2001) Concentrating the unknown cocktail of organic micro pollutants in surface water samples. RIVM Report No. 607200004, 2001

Struijs J. (2003) Briefrapport project "Toxische druk metalen in water" Projectnummer S/607501/01/EB.

Struijs J, De Zwart D. (2003) Evaluatie van pT. RIVM rapport 860703001.

Traas T.P, Van de Meent D, Posthuma L, Hamers T, Kater B.J, De Zwart D, Aldenberg T. (2002). The potentially affected fraction as a measure of ecological risk. In: Posthuma, L, Traas, T.P, Suter, G.W. (eds.) (2002). The use of species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis publishers.

Vaal, M.A. and A.J. Folkerts, 1998, Microbiotests: sensitivity and usefulness. RIVM Report No. 607042009.

Vaal, M.A. en J. Struijs, 2002, Toxische druk organische microverontreinigingen. Briefrapport.

Bijlage 1: Resultaten EC^f_{50} en LC^f_{50} van het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Schaar van oude Doel, Steenberg en Wolderwijd.

Monsternaam	Bemonsterings datum	PAM EC50		Microtox EC50		Daphnia IQ LC50		Rotokit LC50		Thamnotokit LC50		Chloriden LC50
		CF	95 % b.t.l.	CF	95 % b.t.l.	CF	95 % b.t.l.	CF	95 % b.t.l.	CF	95 % b.t.l.	CF
Bianco-1	18-mrt-05		474 454-495	nb		1000		1000		1000		
Bovensluis 05-1	31-jan-05		382 342-426		296		412 323-527		561 465-676		853 755-963	36
Bovensluis 05-2	29-mrt-05		320 293-349		300 360-409		93 83-105		962 436-1000		1000	50
Bovensluis 05-3	23-mei-05		140 130-151		414 352-488		274 232-323		612 540-694		798 683-930	24
Bovensluis 05-4	18-jul-05		111 104-119		331 326-337		503 420-603		846 740-968		851 731-990	305
Bovensluis 05-5	12-sep-05		190 174-206		307 271-348		325 247-426		546 479-622		730 640-833	210
Bovensluis 05-6	7-nov-05		110 104-115		239 230-248		327 249-429		437 373-513		974 851-1000	204
Eijsden 05-1	18-jan-05		238 221-255		140 131-149		88 78-100		196 171-224		657 575-751	35
Eijsden 05-2	15-mrt-05		277 252-305		116 113-120		1 0.64-1.63		204 165-252		678 591-778	33
Eijsden 05-3	10-mei-05		74 68-80		126 110-145		10 8-12		424 366-492		299 249-360	10
Eijsden 05-4	5-jul-05		25 22-28		136 128-145		4 3.4-5.4		306 270-347		306 225-415	1
Eijsden 05-5	30-aug-05		51 47-56		146 138-155		17 14-20		229 202-261		799 704-908	37
Eijsden 05-6	25-okt-05		67 62-73		103 94-112		14 11-18		306 270-347		329 288-375	0
Haringvlietsluis 05-1	4-jan-05		233 213-254		202 191-213		1000		388 329-458		956 796-1000	199
Haringvlietsluis 05-2	2-mrt-05		211 192-232		196 190-201		358 302-425		786 638-969		1000	113
Haringvlietsluis 05-3	26-apr-05		121 114-128		254 243-265		248 202-305		447 383-522		747 649-861	21
Haringvlietsluis 05-4	21-jun-05		197 183-212		292 287-298		118 104-133		339 284-405		908 804-1000	55
Haringvlietsluis 05-5	16-aug-05		96 87-106		331 290-379		247 215-284		640 563-729		941 796-1000	198
Haringvlietsluis 05-6	19-okt-05		130 122-139		380 358-403		619 525-731		591 505-692		1000 865-1000	562
Ketelmeer 05-1	6-jan-05		188 170-208		418 377-462		789 630-987		500		1000	320
Ketelmeer 05-2	3-mrt-05		305 274-340		255 239-271		452 386-528		1000 958-1000		1000	15
Ketelmeer 05-3	28-apr-05		115 109-122		119 117-121		209 171-255		471 420-528		572 493-664	522
Ketelmeer 05-4	23-jun-05		171 158-186		111 101-122		303 251-365		408 349-476		612 540-694	483
Ketelmeer 05-5	18-aug-05		156 144-168		294 267-324		348 270-449		345 301-395		824 709-959	263
Ketelmeer 05-6	13-okt-05		169 151-188		246 228-265		503 420-603		864 500-1000		870 771-982	264
Lobith 05-1	19-jan-05		188 173-204		230 204-260		323 274-381		443 366-537		500 446-560	366
Lobith 05-2	16-mrt-05		292 272-314		186 181-192		350 282-435		468 407-539		612 540-694	23
Lobith 05-3	11-mei-05		141 131-152		177 160-195		534 445-642		542 482-608		772 661-901	30
Lobith 05-4	6-jul-05		88 81-96		145 140-150		250 206-304		364 305-434		657 575-751	144
Lobith 05-5	31-aug-05		228 210-248		420 369-479		411 317-531		626 551-711		996 834-1000	396
Lobith 05-6	26-okt-05		102 96-108		124 119-130		336 273-414		490 437-549		389 331-458	232
Steenbergen 05-1	31-jan-05		123 113-134		327 297-361		684 476-982		515 371-712		666 569-780	179
Steenbergen 05-2	31-mrt-05		167 157-178		251 232-270		1000		992 913-1000		1000	298
Steenbergen 05-3	26-mei-05		93 85-102		262 239-288		284 223-361		678 591-778		851 731-991	85
Steenbergen 05-4	21-jul-05		90 83-97		205 188-224		489 400-599		599 530-678		878 753-1000	271
Steenbergen 05-5	15-sep-05		94 80-112		340 324-356		452 386-528		534 469-608		1000	296
Steenbergen 05-6	10-nov-05		78 73-83		211 203-220		405 336-488		570 500-649		1000	151
Schaar van oude Doel 05-1	12-jan-05		40 37-43		54 52-56		191 158-231		272 239-310		245 206-291	70
Schaar van oude Doel 05-2	7-mrt-05		60 55-66		59 58-60		174 152-200		261 227-300		305 266-330	8
Schaar van oude Doel 05-3	2-mei-05		34 30-38		87 80-94		254 185-349		267 232-307		339 284-405	20
Schaar van oude Doel 05-4	27-jun-05		28 25-31		88 85-92		395 322-484		150 127-177		262 222-309	74
Schaar van oude Doel 05-5	23-aug-05		25 23-28		76 73-79		502 368-687		204 177-235		218 181-263	102
Schaar van oude Doel 05-6	19-okt-05		24 22-26		140 136-144		188 164-216		195 169-224		363 307-428	19
Schaar v O Doel (gefiltreerd)	27-jun-05		34 31-38		80 73-88		530 429-655		198 166-236		347 292-411	157
Schaar v O Doel (gefiltreerd)	23-aug-05		21 14215		70 67-74		608 477-775		288 242-342		300 257-351	71
Schaar v O Doel (gefiltreerd)	19-okt-05		24 22-27		117 108-128		392 323-477		288 242-342		354 302-415	66
Wolderwijd 05-1	4-jan-05		160 131-196		174 163-187		679 570-809		490 401-598		496 457-538	121
Wolderwijd 05-2	28-feb-05		285 258-315		232 220-246		1000		1000		1000	512
Wolderwijd 05-3	26-apr-05		248 232-265		302 276-330		318 236-394		626 551-711		785 610-1000	49
Wolderwijd 05-4	21-jun-05		117 110-125		343 330-357		512 427-614		536 465-617		1027 879-1000	90
Wolderwijd 05-5	16-aug-05		164 146-184		270 262-289		501 427-588		667 585-761		1000	360
Wolderwijd 05-6	10-okt-05		188 173-205		251 247-254		659 543-799		761 666-869		835 738-944	698

Bijlage 2: Resultaten potentiële toxiciteit berekend zonder de Chydoridetest in het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Schaar van oude Doel, Steenbergen en Wolderwijd.

SAMPLE CODE / DATE	PAFLOGISTIC%	PAFNORMAL%	(5%CLN - 90%CLN)	(n= #)
Blanco-1	0.0	-	(0.0 - 0.0)	((n= 4))
Bovensluis 05-1	0.0	-	(0.0 - 0.0)	((n= 5))
Bovensluis 05-2	0.1	0.0	(0.0 - 7.7)	((n= 5))
Bovensluis 05-3	0.0	0.0	(0.0 - 1.7)	((n= 5))
Bovensluis 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 4.0)	((n= 5))
Bovensluis 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 0.2)	((n= 5))
Bovensluis 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 4.4)	((n= 5))
Eijsden 05-1	0.1	0.0	(0.0 - 5.8)	((n= 5))
Eijsden 05-2	17.9	20.1	(4.7 - 53.0)	((n= 5))
Eijsden 05-3	5.4	5.7	(0.4 - 35.4)	((n= 5))
Eijsden 05-4	13.3	15.0	(2.7 - 47.9)	((n= 5))
Eijsden 05-5	4.5	4.7	(0.2 - 33.5)	((n= 5))
Eijsden 05-6	3.8	3.8	(0.2 - 31.6)	((n= 5))
Haringvlietsluis 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 2.3)	((n= 5))
Haringvlietsluis 05-2	0.0	0.0	(0.0 - 2.3)	((n= 5))
Haringvlietsluis 05-3	0.0	0.0	(0.0 - 2.4)	((n= 5))
Haringvlietsluis 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 3.9)	((n= 5))
Haringvlietsluis 05-5	0.1	0.0	(0.0 - 6.1)	((n= 5))
Haringvlietsluis 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 2.5)	((n= 5))
Ketelmeer 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 0.7)	((n= 5))
Ketelmeer 05-2	0.0	0.0	(0.0 - 0.7)	((n= 5))
Ketelmeer 05-3	0.0	0.0	(0.0 - 4.9)	((n= 5))
Ketelmeer 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 2.7)	((n= 5))
Ketelmeer 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 0.8)	((n= 5))
Ketelmeer 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 2.1)	((n= 5))
Lobith 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 0.0)	((n= 5))
Lobith 05-2	0.0	0.0	(0.0 - 0.1)	((n= 5))
Lobith 05-3	0.0	0.0	(0.0 - 3.0)	((n= 5))
Lobith 05-4	0.1	0.0	(0.0 - 5.7)	((n= 5))
Lobith 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 0.2)	((n= 5))
Lobith 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 3.9)	((n= 5))
Steenbergen 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 2.0)	((n= 5))
Steenbergen 05-2	0.0	0.0	(0.0 - 3.7)	((n= 5))
Steenbergen 05-3	0.1	0.0	(0.0 - 6.1)	((n= 5))
Steenbergen 05-4	0.1	0.0	(0.0 - 6.9)	((n= 5))
Steenbergen 05-5	0.1	0.0	(0.0 - 5.2)	((n= 5))
Steenbergen 05-6	0.2	0.0	(0.0 - 8.9)	((n= 5))
Schaar van oude Doel 05-1	0.6	0.3	(0.0 - 16.3)	((n= 5))
Schaar van oude Doel 05-2	0.2	0.0	(0.0 - 10.8)	((n= 5))
Schaar van oude Doel 05-3	0.7	0.3	(0.0 - 16.4)	((n= 5))
Schaar van oude Doel 05-4	1.1	0.7	(0.0 - 20.0)	((n= 5))
Schaar van oude Doel 05-5	1.6	1.2	(0.0 - 23.3)	((n= 5))
Schaar van oude Doel 05-6	1.0	0.6	(0.0 - 19.2)	((n= 5))
Schaar v O Doel	1.1	0.6	(0.0 - 19.9)	((n= 5))
Schaar v O Doel	2.5	2.2	(0.0 - 27.2)	((n= 5))
Schaar v O Doel	1.3	0.8	(0.0 - 21.2)	((n= 5))
Wolderwijd 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 1.6)	((n= 5))
Wolderwijd 05-2	0.0	0.0	(0.0 - 1.4)	((n= 5))
Wolderwijd 05-3	0.0	0.0	(0.0 - 0.1)	((n= 5))
Wolderwijd 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 3.3)	((n= 5))
Wolderwijd 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 1.8)	((n= 5))
Wolderwijd 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 1.3)	((n= 5))

Bijlage 3: Resultaten potentiële toxiciteit berekend met de Chydoridetest in het oppervlaktewater uit Bovensluis, Eijsden, Haringvlietsluis, Ketelmeer, Lobith, Schaar van oude Doel, Steenbergen en Wolderwijd.

SAMPLE CODE / DATE	PAFLOGISTIC%	PAFNORMAL%	(5%CLN - 90%CLN)	(n= #)
Blanco-1	0.0	-	(0.0 - 0.0)	(n= 4)
Bovensluis 05-1	0.4	0.1	(0.0 - 9.2)	(n= 6)
Bovensluis 05-2	0.7	0.3	(0.0 - 12.8)	(n= 6)
Bovensluis 05-3	1.1	0.7	(0.0 - 15.9)	(n= 6)
Bovensluis 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 1.4)	(n= 6)
Bovensluis 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 0.1)	(n= 6)
Bovensluis 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 1.8)	(n= 6)
Eijsden 05-1	0.7	0.3	(0.0 - 12.4)	(n= 6)
Eijsden 05-2	17.5	19.6	(5.2 - 49.1)	(n= 6)
Eijsden 05-3	10.5	11.9	(2.1 - 40.4)	(n= 6)
Eijsden 05-4	27.4	29.5	(10.8 - 58.3)	(n= 6)
Eijsden 05-5	5.0	5.2	(0.4 - 30.2)	(n= 6)
Eijsden 05-6	3.8	3.8	(0.2 - 31.6)	(n= 5)
Haringvlietsluis 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 1.3)	(n= 6)
Haringvlietsluis 05-2	0.1	0.0	(0.0 - 3.2)	(n= 6)
Haringvlietsluis 05-3	1.4	0.9	(0.0 - 17.5)	(n= 6)
Haringvlietsluis 05-4	0.3	0.1	(0.0 - 8.1)	(n= 6)
Haringvlietsluis 05-5	0.1	0.0	(0.0 - 3.0)	(n= 6)
Haringvlietsluis 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 0.5)	(n= 6)
Ketelmeer 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 0.2)	(n= 6)
Ketelmeer 05-2	2.0	1.6	(0.0 - 20.7)	(n= 6)
Ketelmeer 05-3	0.0	0.0	(0.0 - 2.2)	(n= 6)
Ketelmeer 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 0.8)	(n= 6)
Ketelmeer 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 0.1)	(n= 6)
Ketelmeer 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 0.7)	(n= 6)
Lobith 05-1	0.0	-	(0.0 - 0.0)	(n= 6)
Lobith 05-2	0.9	0.4	(0.0 - 14.2)	(n= 6)
Lobith 05-3	0.9	0.5	(0.0 - 14.2)	(n= 6)
Lobith 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 2.8)	(n= 6)
Lobith 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 0.0)	(n= 6)
Lobith 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 1.1)	(n= 6)
Steenbergen 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 1.2)	(n= 6)
Steenbergen 05-2	0.0	0.0	(0.0 - 1.6)	(n= 6)
Steenbergen 05-3	0.2	0.0	(0.0 - 6.9)	(n= 6)
Steenbergen 05-4	0.0	0.0	(0.0 - 2.8)	(n= 6)
Steenbergen 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 1.9)	(n= 6)
Steenbergen 05-6	0.1	0.0	(0.0 - 5.6)	(n= 6)
Schaar van oude Doel 05-1	0.5	0.2	(0.0 - 11.2)	(n= 6)
Schaar van oude Doel 05-2	5.2	5.5	(0.5 - 30.8)	(n= 6)
Schaar van oude Doel 05-3	2.7	2.4	(0.1 - 23.6)	(n= 6)
Schaar van oude Doel 05-4	0.9	0.5	(0.0 - 14.4)	(n= 6)
Schaar van oude Doel 05-5	1.1	0.7	(0.0 - 16.0)	(n= 6)
Schaar van oude Doel 05-6	3.3	3.2	(0.2 - 25.7)	(n= 6)
Schaar v O Doel	0.6	0.3	(0.0 - 12.2)	(n= 6)
Schaar v O Doel	2.2	1.9	(0.1 - 21.7)	(n= 6)
Schaar v O Doel	1.3	0.8	(0.0 - 17.0)	(n= 6)
Wolderwijd 05-1	0.0	0.0	(0.0 - 1.8)	(n= 6)
Wolderwijd 05-2	0.0	0.0	(0.0 - 0.3)	(n= 6)
Wolderwijd 05-3	0.2	0.0	(0.0 - 6.6)	(n= 6)
Wolderwijd 05-4	0.1	0.0	(0.0 - 5.3)	(n= 6)
Wolderwijd 05-5	0.0	0.0	(0.0 - 0.4)	(n= 6)
Wolderwijd 05-6	0.0	0.0	(0.0 - 0.2)	(n= 6)

Bijlage 4: Hard-copy van de Wilcoxon rank sum test over

<http://eatworms.swmed.edu/~leon/stats/utest.cgi?n1=18&n2=18&U=182.0&formtype=stats>

U Test Results

n ₁	n ₂	U	P (two-tailed)	P (one-tailed)
18	18	182.0	0.541494*	0.270747*
normal approx z = 0.632772			0.526882*	0.263441*

*These values are approximate.

The two samples are not significantly different (P >= 0.05, two-tailed test).

Do another test:

Use this form if you have calculated the Mann-Whitney test statistics n₁, n₂, and U:

n₁:

n₂:

U:

Use this form if you want the statistics calculated for you. Paste into each box a list of numbers:

dataset 1:

dataset 2:

Use "." for decimals, not ",".

If your numbers are large, be patient -- the calculation may take a minute or two. **Don't reload** -- that will only slow the response down.

Details:

command: "/home/leon/bin/utest -m 1000000 -nt 60 18 18 182.0"

results:

27.0747% (270747/1000000) 73.9357% (739357/1000000)

26.3441% 73.6559% (z = 0.632772)

RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl