



Briefrapport 607013006/2007

J.A. Vonk

## Relevantie van toxiciteit-bioassays bij de beoordeling van een goede toestand van oppervlaktewater

RIVM Briefrapport 607013006/2007

## **Relevantie van toxiciteit-bioassays bij de beoordeling van een goede toestand van oppervlaktewater**

J.A. Vonk, Laboratorium voor Ecologische Risicobeoordeling

Contact:

Jan Arie Vonk

LER

Arie.Vonk@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van VROM/DGM/BWL, in het kader van het project "Ontwikkeling en toepassing bioassays voor de beoordeling van water kwaliteit".



## Inhoud

<b>Voorwoord</b>	<b>4</b>	
<b>1</b>	<b>Beleidsmatige probleemstelling</b>	<b>5</b>
1.1	Beleidsmatige context en einddoel	5
1.2	Aanpak van het onderzoek	5
<b>2</b>	<b>Huidige stand van zaken</b>	<b>7</b>
2.1	De huidige status van bioassays	7
2.2	Belangrijke aspecten van bioassays/Kaders van deze studie	7
2.3	Evaluatie ecologische doelstelling	8
<b>3</b>	<b>Wetenschappelijk inhoudelijke aspecten</b>	<b>9</b>
3.1	Wanneer zijn toxiciteit-bioassays inzetbaar?	9
3.2	Wat betekenen toxiciteit resultaten voor de ecologische toestand?	10
3.3	De relevantie van bioassays voor biodiversiteit	12
3.4	Relevantie van bioassays voor ecosysteem functioneren	14
<b>4</b>	<b>Conclusies</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>Benodigd toekomstig onderzoek</b>	<b>17</b>
<b>Dankwoord</b>	<b>19</b>	
<b>Referenties</b>	<b>20</b>	

# Voorwoord

Dit briefrapport is het resultaat van een inventarisatie binnen het RIVM over de meningen betreffende de relevantie van toxiciteits-bioassays bij de beoordeling van een goede toestand van oppervlaktewater. Hiervoor zijn zowel individuele gesprekken met experts als een brainstorm-sessie gehouden. De standpunten en argumentatielijnen van toxiciteit-bioassays besproken in dit document zijn gebruikt voor het vierkantsoverleg tussen RIVM, RIZA, en de ministeries van VROM en Verkeer en Waterstaat, van 18 oktober 2007.

# 1 Beleidsmatige probleemstelling

## 1.1 Beleidsmatige context en einddoel

De Kaderrichtlijn Water (KRW) streeft naar een goede toestand van het oppervlaktewater. Een onderdeel hiervan vormt de goede ecologische toestand (GET). Hiervoor moeten de soortenrijkdom en -dichtheden, evenals functionele eigenschappen van oppervlaktewater worden beschermd. De lokaal gedefinieerde GET in rijkswateren wordt op dit moment vaak niet gehaald. De GET wordt beïnvloed door factoren zoals eutrofiering, hydromorfologie en de chemische status van het oppervlaktewater. De chemische status wordt gedeeltelijk bepaald door de toxiciteit van alle lokaal aanwezige chemische stoffen voor soorten die in het aquatisch ecosysteem vóórkomen. Toxiciteit in het water kan het vóórkomen van soorten in het water beïnvloeden, hoewel dit effect vaak versluierd wordt door een veelheid aan andere stressoren (Posthuma en De Zwart, 2006).

Er bestaan veel technieken om (enig) inzicht te krijgen in de mate waarin een systeem kan zijn aangetast door toxische stoffen. Klassiek is de bepaling van normoverschrijding voor de genormeerde stoffen. Recent is toegevoegd de zogenaamde eco-epidemiologische analyse van monitoring-data die over grote arealen verzameld zijn. Als tussenvorm worden vaak bioassays toegepast. Bioassays kunnen worden toegepast om de netto toxiciteit van stoffenmengsel (ook onbekende stoffen) in het water voor organismen te meten. Door middel van bioassays kan een beeld worden verkregen van de toxische eigenschappen van een onbekend mengsel voor toetsorganismen. Dit kan geschat worden als de mogelijke totale toxiciteit voor een ecosysteem.

De beleidsmatige probleemstelling is, samengevat:

*Hoe kunnen toxiciteit-bioassays worden ingezet voor het beoordelen en/of realiseren van een goede ecologische toestand en wat impliceert toxiciteit gemeten met bioassays over de ecologische toestand en functioneren van het ecosysteem in rijkswateren?*

Het einddoel van dit onderzoek dat bereikt moet worden is een duidelijk standpunt of toxiciteit gemeten met behulp van bioassays een maat geeft voor de bedreiging van de goede ecologische toestand in aquatische ecosystemen en of dit een maat is voor de aantasting van het functioneren van het ecosysteem. Hierbij ligt de nadruk op de mogelijkheden van bioassays.

## 1.2 Aanpak van het onderzoek

Dit briefrapport concentreert zich op bioassays die de toxiciteit van het oppervlaktewater in Nederland meten. Bioassays, die uitgevoerd worden met monsters van oppervlaktewater en met soorten die goed kweekbaar en gevoelig zijn, vertonen een heldere uitslag bij hoge mate van belasting. Aangezien de milieumaatregelen uit het verleden geleid hebben tot een wezenlijke daling van de toxiciteit in het water, wordt er vaak gebruik gemaakt van concentratietechnieken om ook de toxiciteit van onbekende diffuse belasting nog te kunnen kwantificeren. Organismen worden blootgesteld aan concentraten van stoffen uit het oppervlaktewater. Deze concentraten worden met behulp van kunstharsen verkregen

(voor methodiek, zie Struijs en De Zwart, 2003, Durand *et al.*, in prep.). Methodische aspecten en mogelijkheden worden ook kort besproken in dit briefrapport.

Ontwikkeling en implementatie van bioassays zijn afhankelijk van verschillende factoren. Eén van deze factoren, de ecologische relevantie van bioassays, wordt in dit briefrapport toegelicht. Ecologische relevantie betekent hier, dat er vastgesteld wordt of – en zo ja in hoeverre – er een relatie bestaat tussen de uit de bioassaysresultaten afgeleide toxiciteit van mengsels van toxische stoffen in oppervlaktewateren, en de gewenste GET. Op basis van deze toelichting kunnen (beleids)keuzes worden gemaakt. Deze zijn cruciaal voor de ontwikkeling en implementatie van bioassays als onderdeel van het pakket van mogelijkheden om de afwijking van GET vast te stellen, en daarna vast te stellen welke oorzaken aan die afwijkingen ten grondslag liggen.

In dit briefrapport worden de mogelijkheden van bioassays in relatie tot de ecologische toestand van oppervlaktewater toegelicht. De volgende wetenschappelijk inhoudelijke aspecten van bioassays worden behandeld:

- Wanneer zijn toxiciteit-bioassays inzetbaar?
- Welke informatie geven toxiciteit-bioassays in relatie tot de ecologische toestand van het water?
- Wat zijn toepassingsmogelijkheden voor toxiciteit-bioassays in de toekomst?

Tenslotte worden aanbevelingen voor het verder onderzoek benodigd voor optimale toepassing van deze bioassays uitgelicht.

## 2 Huidige stand van zaken

Voordat ingegaan wordt op de in het voorgaande hoofdstuk genoemde aspecten, wordt in dit hoofdstuk eerst de context van de bioassays uiteengezet. Hierdoor kunnen de volgende hoofdstukken terugvallen op de hier gepresenteerde gegevens.

### 2.1 De huidige status van bioassays

Bioassays hebben op dit moment in Nederland alleen een rol bij de monitoring nader onderzoek (ofwel diagnostiek), het nagaan waarom de ecologische toestand van een waterlichaam niet voldoet. Meer voor de hand liggende abiotische oorzaken, zoals concentraties van nutriënten en zuurstof, pH of hydromorfologie/inrichting zijn dan al bekend. Ook worden in elk waterlichaam alle prioritaire stoffen gemonitord, naast enkele “overige relevante stoffen” (bijvoorbeeld metalen die geen prioritaire stof zijn maar wel normen overschrijden). Bioassays spelen nu geen rol in de KRW, omdat de KRW alleen stofgericht is en niet effectgericht. Tijdens internationale bijeenkomsten zijn geluiden te horen om bioassays toe te passen als vervanging van- of aanvulling op het chemiedeel in de eerste beoordeling. Afgezien van de formele status van bioassays onder de KRW worden bioassays in Nederland al sinds 1992 ingezet voor de kwaliteitsbewaking (monitoring) van de waterstaatkundige toestand des lands (MWTL) in Rijkswateren en voor de bewaking van de waterkwaliteit voor de drinkwatervoorziening uit oppervlaktewater. Er is een biologische bewaking van de waterkwaliteit bij Lobith (Rijn) en Eijsden (Maas). Met deze bewaking wordt continu de kwaliteit van het rivierwater dat Nederland binnenstroomt gecontroleerd. Vooral incidentele lozingen worden gedetecteerd met deze bioassays. Deze lozingen zijn veelal niet gedetecteerd met de standaardmonitoring van chemische analyses van het rivierwater. Bioassays worden ook gebruikt voor monitoring van oppervlaktewateren om verbeteringen of verslechtingen over de tijd of tussen locaties te meten (De Groot *et al.*, 2007). Regionale waterkwaliteitsbeheerders passen bioassays nauwelijks toe. Dit jaar is door RIZA (RWS-Waterdienst), RIVM en in samenwerking met enkele waterschappen een ‘schaduw’-monitoringprogramma gestart om de meerwaarde van biologische effectmetingen binnen de operationele monitoring van de KRW aan te tonen en de implementatie van deze metingen bij waterbeheerders op gang te brengen.

### 2.2 Belangrijke aspecten van bioassays/Kaders van deze studie

Dit rapport concentreert zich op bioassays die toxiciteit meten in het oppervlaktewater in Nederland. Het betreft hier meestal acute toxiciteit-bioassays die uitgevoerd worden met concentraten van het oppervlaktewater. De concentraten worden verkregen door de extractie van stoffen uit het water (Struijs en De Zwart, 2003). Door deze methode worden andere stressfactoren in het water, zoals eutrofiëringniveau, zuurstofconcentratie en pH niet meegenomen in de toxiciteitstesten. Deze stressfactoren kunnen afzonderlijk bepaald worden in het oppervlaktewater. Dit heeft ook een voordeel, omdat zo enkel de invloed van toxische stoffen kan worden bepaald zonder storingen van neveneffecten.

Aangezien veel toxiciteit-bioassays worden uitgevoerd als acute testen, maar er voor de veldsituatie sprake is van chronische blootstelling, wordt er bij de interpretatie van de resultaten van bioassays gebruik gemaakt van een omrekeningsfactor. Deze Acuut/Chronisch Ratio (ACR) die gehanteerd wordt is 10, bepaald aan de hand van een paar honderd testen voor verschillende organismen en soorten stoffen (De Zwart en Sterkenburg, 2002; Raimondo *et al.*, 2007).



Bioassays kunnen variëren van zeer stofspecifiek tot breed spectrum. De situatie waarin bioassays gebruikt worden, variërend van lokaal en zeer specifieke toxiciteit van een stofgroep tot totale toxiciteit van stoffen in het water, kan de keuze beïnvloeden voor het type bioassays dat uitgevoerd wordt. Alle bioassays moeten bovendien uitgevoerd worden volgens een Standard Operating Procedure (SOP). Bioassays geven inzicht in de toxiciteit van een veel grotere groep stoffen dan er op dit moment met chemische analyses bepaald kan worden. Ook biobeschikbaarheid, mengseltoxiciteit en de toxiciteit van metabolieten worden meegewogen in de bioassay-evaluatie, en niet in de chemische bepalingen. Hendriks *et al.* (1994) heeft aangetoond dat onderzoek met bioassays een nuttige aanvulling is op de chemische analyses en beoordeling van normoverschrijding, aangezien deze auteurs aantoonde dat >89% van de toxiciteit van oppervlaktewater (in de studie: Rijnwater) *niet* verklaard werd door de bekende stoffen.

## 2.3 Evaluatie ecologische doelstelling

De KRW is gebaseerd op het concept dat water een erfgoed is dat beschermd moet worden. De KRW schrijft voor dat de biodiversiteit van oppervlaktewater moet worden beschermd. Toxiciteit van het oppervlaktewater kan het aquatisch ecosysteem beïnvloeden, via directe toxische effecten (acuut of chronisch) en via indirecte effecten (voedselketeneffecten). Een voorbeeld hiervan wordt gegeven door Posthuma en De Zwart (2006) waarbij toxiciteit wordt uitgedrukt als *multi-substance* Potentieel Aangetaste Fractie (*msPAF*) waarden, berekend aan de hand van chemisch gemeten stoffenconcentraties. Deze berekende *msPAF* kan een deel van het (niet) voorkomen van soorten (vissen) verklaren en verschilt van plek tot plek (zoals te verwachten was gegeven de geografische spreiding van de monitoringslocaties). Het is te verwachten dat de via bioassays gemeten toxiciteit van water samen zal hangen met het ecosysteem en de soorten samenstelling, maar – hoewel de relatie logischerwijs te vinden zou moeten zijn – moet nog bewezen worden. In dit briefrapport wordt ingegaan op mogelijkheden van bioassays voor de evaluatie van de ecologische toestand van oppervlaktewater. Ook wordt ingegaan op de relevantie van bioassays met betrekking tot de biodiversiteit en het functioneren van aquatische ecosystemen.

### 3 Wetenschappelijk inhoudelijke aspecten

#### 3.1 Wanneer zijn toxiciteit-bioassays inzetbaar?

Bioassays in oppervlaktewater kennen twee bewezen nuttige toepassingen. De eerste toepassing is de monitoring en de tweede toepassing is het opsporen van bronnen van toxiciteit.

##### Monitoring

Bioassays kunnen gebruikt worden voor de monitoring van toxiciteit in het oppervlaktewater. Door monitoring in ruimte en tijd uit te voeren kan inzicht verkregen worden in de relatieve toxiciteit van verschillende wateren. Daarnaast kunnen trends in toxiciteit gedurende verschillende perioden vastgesteld worden. Deze trends kunnen belangrijke informatie opleveren over verandering van de toxiciteit, zoals die bijvoorbeeld zou kunnen ontstaan door beleids- of beheersmaatregelen. Omdat de toestand van oppervlaktewater niet mag verslechteren, moet de toxiciteit minstens gelijk blijven, maar zeker bij relatief hoge toxiciteit is het natuurlijk wenselijk dat een afnemende trend wordt waargenomen als gevolg van maatregelen.

Bij de monitoring van het oppervlaktewater in Nederland zijn de mogelijk aanwezige individuele toxische stoffen onbekend, maar omvatten in principe het gehele spectrum van toxische stoffen. De keuze van bioassays voor monitoring moet erop gericht zijn een zo breed mogelijk deel van dit spectrum te meten. Monitoringresultaten voor rijkswateren laten zien dat sommige bioassays met testorganismen gevoeliger zijn dan anderen voor de aanwezige toxische druk van het water, maar het is niet eenduidig te zeggen dat een enkele bioassay de meest gevoelige is in iedere situatie (Tabel 1; zie ook Maas *et al.*, 2005).

**Tabel 1.** Een ordening van de monitoringresultaten sinds 2000 met rangnummers per monster (1= minst toxische resultaat, 5= meest toxische resultaat) geeft een beeld van de relatieve gevoeligheid van de verschillende bioassays voor de onderzochte monsters (224 in totaal).

rangnummer	aantal testen per rangnummer				
	Microtox	Algen	Rotox	Thamnotox	<i>Daphnia</i>
1	0	6	43	144	42
2	3	13	112	54	32
3	38	20	57	18	90
4	123	57	7	6	31
5	60	127	4	2	28

Uit deze resultaten blijkt dat de gevoeligheid van bioassays voor de in het water aanwezige toxische stoffen verschilt. Sommige testen blijken vaker het meest gevoelig te zijn. Bij monitoring over tijd en tussen locaties moeten dus een voldoende aantal bioassays gebruikt worden om de toxiciteit te kunnen bepalen. Met andere woorden: door het verbreden van de selectie van bioassays worden zowel specifieke als aspecifieke effecten beter opgespoord. Of omgekeerd: als er gekozen wordt voor één standaard-bioassay loopt men de kans dat bepaalde, stofgroep-specifieke effecten gemist worden. Het is moeilijk te voorspellen welke soorten het meest beïnvloed worden door de aanwezigheid van een

onbekend mengsel van toxische stoffen in rijkswateren. Verschillende bioassays zijn nodig om de resultaten robuust te maken voor de spreiding van mogelijke toxische stoffen in het water. Het beperken van het aantal bioassays (1 tot 3 per watermonster) resulteert in een grotere kans geen toxiciteit te meten terwijl er wel toxiciteit aanwezig is, tenzij het om specifieke stofgroepen gaat. Bioassays moeten daarom nauwkeurig gekozen worden. Hierbij speelt ook mee dat de bioassays representatief moeten zijn voor de soorten organismen aanwezig in het ecosysteem. In de afgelopen jaren is er veel ervaring opgedaan met bioassays die ingezet kunnen worden om toxiciteit van verschillende stofgroepen op organismen te testen (zie o.a. de bijlage bij Derksen *et al.*, 2004).

### **Opsporen en typeren van toxiciteit**

De tweede belangrijke toepassing van bioassays betreft het opsporen van toxiciteit in het oppervlaktewater. Het opsporen van de bron van de toxiciteit kan plaatsvinden voor zowel de locatie vanwaar de toxiciteit in het oppervlaktewater terecht komt als voor de stofgroep verantwoordelijk voor de toxiciteit. Het opsporen van de bron van toxiciteit in het oppervlaktewater wordt op dit moment gedaan met behulp van de Totaal Effluent Beoordeling (TEB), een techniek die in Amerika voor de analyse van effluent-toxiciteit een grote vlucht heeft genomen onder de term WET (Whole-Effluent Toxicity Tests). Bij de TEB methode worden op verschillende locaties langs een rijkswater de toxiciteit van het water bepaald met bioassays (zie bijvoorbeeld Roex *et al.*, 2007). Uit gemeten verhogingen van de toxiciteit kan worden bepaald of stroomopwaarts van dit punt toxische stoffen in het water terecht komen. Nadere analyse van de mogelijke bronnen is nodig om de precieze locatie van de toxiciteit te achterhalen en/of om de verantwoordelijke stofgroep(en) te identificeren. Daarvoor bestaat een reeks van bioassay-gerelateerde technieken, zoals BDF (Bioassay-Directed Fractionation) en TIE (Toxicity-Identification Evaluation).

Bioassays kunnen worden gebruikt als een 'early warning' tool. Op het moment dat bioassays een toxisch signaal afgeven, kan er verder gekeken worden naar de stoffen die verantwoordelijk zijn voor de toxiciteit in het water. Bioassays zijn gevoelig voor bepaalde stoffen of stofgroepen met een specifiek werkingsmechanisme. Per bioassay is dit verschillend. Het meten van toxiciteit van het water met behulp van bioassays kan niet direct gekoppeld worden aan de stof die verantwoordelijk is. Toch is toxiciteit niet als een grijze deken waarbij het effect wordt veroorzaakt door alle stoffen samen. Vaak zijn er maar een paar stoffen verantwoordelijk. Het type bioassay dat de hoogste gevoeligheid vertoont, kan een indicatie geven van de soort stoffen verantwoordelijk voor de toxiciteit.

## **3.2 Wat betekenen toxiciteit resultaten voor de ecologische toestand?**

Bioassays resulteren in een waarde voor de toxiciteit van het oppervlaktewater. Wat zegt deze gemeten toxiciteit over de ecologische toestand van het water?

### **Bij hoge toxiciteit gemeten**

Op het moment dat de toxiciteit gemeten met bioassays hoog is, kan toxiciteit een belangrijke stressfactor zijn in het oppervlaktewater. Toxiciteit kan op dat moment een oorzaak zijn waarom de GET niet wordt bereikt, of zelfs de hoofdoorzaak. Indien dit bekend wordt, bijvoorbeeld via bioassays, kunnen maatregelen getroffen worden om de GET te kunnen bereiken. Dat wil zeggen: maatregelen waardoor de toxiciteit niet meer beperkend is voor het bereiken van de GET: er kunnen immers andere

stressoren “een zwakste schakel” zijn! Bijvoorbeeld: als de toxiciteit zou zijn opgelost, komen bepaalde vissoorten vanwege kanalisatie toch niet bovenstrooms in een rivier voor.

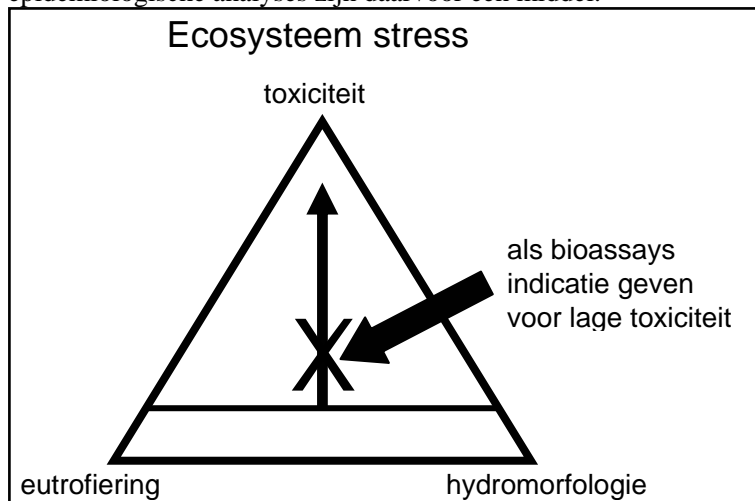
### Bij lage toxiciteit gemeten

Op het moment dat, ook bij geconcentreerde watermonsters, een *lage* toxiciteit in het water gemeten wordt, kan er met de huidige kennis *redelijk zeker* worden gesteld dat toxiciteit geen (grote) negatieve invloed heeft op de ecologische toestand van het oppervlaktewater. Dit kan niet 100% zeker gesteld worden omdat niet alle stoffen meegenomen worden in de bioassays, maar ten opzichte van het beperkte aantal chemische stoffen waarvan de concentraties worden gemeten, geven bioassays *meer zekerheid* over de conclusie dat stoffenmengsels geen majeure bron van afwijkingen van de GET hoeven te zijn.

Wat is lage en hoge toxiciteit? Dit is een goede vraag, maar op dit moment nog niet definieerbaar. Het is afhankelijk van de berekeningsmethode en aannames die gemaakt worden.

### Als de huidige ecologische toestand afwijkt van de gedefinieerde GET

Als de situatie vanuit de GET wordt beschouwd, kan bovenstaande redenering niet andersom worden gemaakt: Een lage toxiciteit gemeten in oppervlaktewater impliceert *niet* dat de GET in een waterlichaam bereikt zal worden. Bioassays zijn tools die gebruikt kunnen worden om een enkele stressfactor te identificeren, namelijk toxiciteit. Indien de huidige ecologische toestand afwijkt van de gedefinieerde GET moeten andere potentiële oorzaken onderzocht worden waarom de GET niet wordt bereikt. De GET kan afwezig zijn door andere stress factoren zoals pH, eutrofiering en hydromorfologie. Resultaten uit bioassays die gericht zijn op toxiciteit hebben geen relatie met deze overige (a)biotische factoren met potentiële stress. Kennis over deze andere factoren is nodig, om samen met bioassays een beeld te geven van de belangrijkste stressoren die de ecologische toestand in het oppervlaktewater beïnvloeden (figuur 1). Onderzoek van grote monitoring-databestanden via eco-epidemiologische analyses zijn daarvoor een middel.



**Figuur 1.** Een vereenvoudigde weergave van stress factoren op het ecosysteem, waarbij uit praktisch oogpunt gekozen is voor slechts 3 factoren. Lage toxiciteit betekent niet dat het ecosysteem op orde is en de GET aanwezig is, maar is wel een voorwaarde voor de gedefinieerde GET in het oppervlaktewater. Indien bij lage toxiciteit de GET niet aanwezig is, zijn andere stress factoren (= niet toxiciteit) verantwoordelijk.

Als een aquatisch ecosysteem onder grote druk staat van bv. eutrofiering, voegt de meting van toxiciteit weinig toe. Eutrofiering is de belangrijkste zorg en zorgt voor een sterke afname van soorten. Het bepalen van toxiciteit met behulp van extractie van stoffen uit het water kan uitsluitend resulteren in het uitsluiten van toxiciteit als belangrijke stress factor in het niet bereiken van een goede GET.

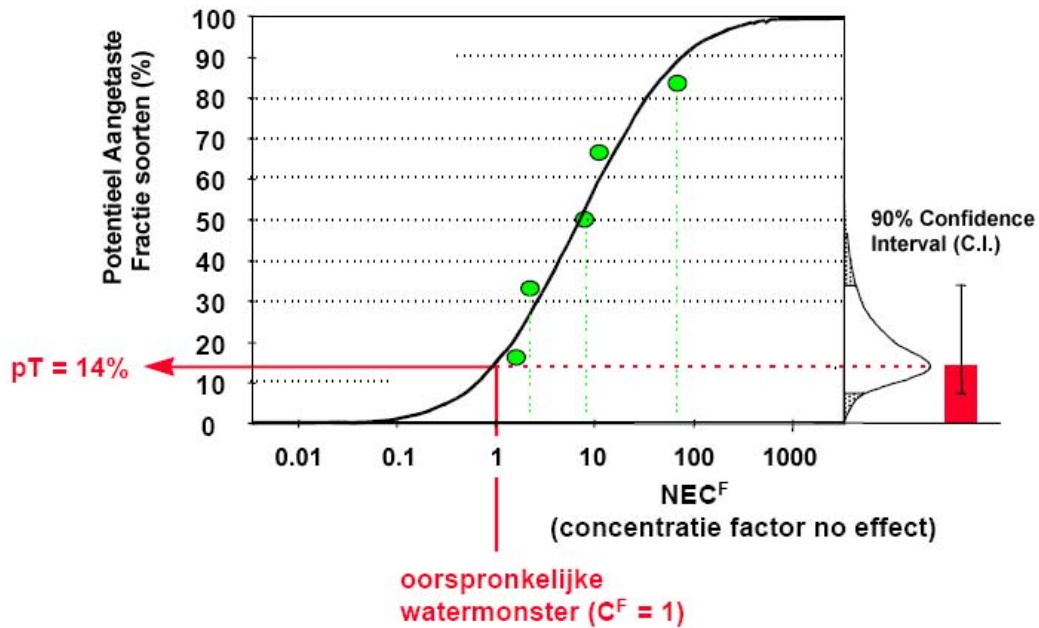
### 3.3 De relevantie van bioassays voor biodiversiteit

De GET van oppervlaktewater wordt voor een belangrijk deel bepaald door het vóórkomen van aantallen organismen en de biodiversiteit. De aanname hierbij is dat het systeem in orde is als alle soorten in de juiste verhoudingen vóórkomen. Bioassays worden uitgevoerd met verschillende organismen en geven een beeld van de mate waarin deze testorganismen beïnvloed worden door de toxiciteit aanwezig in het testwater. Dit kan geschat worden als mate waarin groepen organismen beïnvloed worden door de toxiciteit van het oppervlaktewater in het ecosysteem. Hieronder wordt besproken of resultaten uit bioassays, zodanig gekozen dat de testen met de bioassay-soorten een zo breed mogelijk beeld van de toxiciteit van het aquatische ecosysteem kunnen geven, vertaald kunnen worden naar de (potentiële) effecten van toxiciteit op de biodiversiteit in het water.

Bioassays geven de toxiciteit van een bredere groep stoffen weer dan op dit moment wordt bekeken aan de hand van chemische analyses. Door bioassays op een aantal verschillende organismen uit de voedselketen uit te voeren, kan de weerstand voor de diverse groepen organismen aanwezig in het ecosysteem tegen de toxische stress van het water worden bepaald. Deze resultaten worden met behulp van de pT-methode verder uitgewerkt (zie Struijs en De Zwart, 2003, voor een evaluatie van de pT-methode). Bij deze methode worden de meetresultaten voor de verschillende getoetste organismen omgezet naar een soorten gevoeligheidsverdeling (SSD - Species Sensitivity Distributions; Posthuma *et al.*, 2002). De pT-methode kwantificeert de toxische druk op ecosystemen via modellering van de bioassay-resultaten (meerdere soorten getest) en dit resulteert in de *meer-stoffen* Potentieel Aangetaste Fractie van soorten (*msPAF*; figuur 2), oftewel de toxische druk van een onbekend stoffenmengsel in het waterlichaam. Hoge pT-waarden (hoge toxische druk) geven direct aan dat de *getoetste* soorten in principe hoge effecten zouden ondervinden indien ze zouden vóórkomen in het waterlichaam. Hierdoor suggereren hoge pT-waarden sterk dat ook andere soorten in de natuurlijke omgeving dergelijke effecten zouden ondervinden. Met andere woorden: dit zou direct gerelateerd moeten zijn aan de biodiversiteit. Vooralsnog is er sprake van een (bruikbare) relatieve maat: hoe hoger de toxische druk in een waterlichaam, hoe groter de voorspelde effecten op de getoetste soorten (direct), en hoe hoger de mogelijke effecten op de afwijking van GET (indirect). Bij hoge toxische druk (zeker ten opzichte van een serie andere locaties) kan er aanleiding zijn om maatregelen te treffen die de toxische druk zouden kunnen verlagen.

Met behulp van de pT-methode is het in principe mogelijk een waarde te (gaan) definiëren waarop de biodiversiteit van het aquatisch ecosysteem in gevaar is door de toxiciteit van het water. Dit kan, indien duidelijk gemaakt wordt hoe de pT-waarde (of andere bioassay-gerelateerde resultaten) samenhangt met lokale impacts op ecosystemen. Door nu onder meer een aantal ontbrekende groepen organismen aan de set van bioassays toe te voegen, kan een beter overzicht verkregen worden van de gevoeligheid van verschillende groepen organismen voor bepaalde stofgroepen en de gevoeligheid binnen groepen organismen. De toetswaarde voor de interpretatie van bioassays zou voor de pT-methode een waarde van  $pT = 5\%$  kunnen worden, in navolging van risicogrenswaarden voor chemische analyses ( $HC_5$ ). Bij deze waarde wordt gesuggereerd dat 5% van de getoetste soorten nadelige chronische effecten zou ondervinden van het onbekende mengsel, en in navolging daarop ook

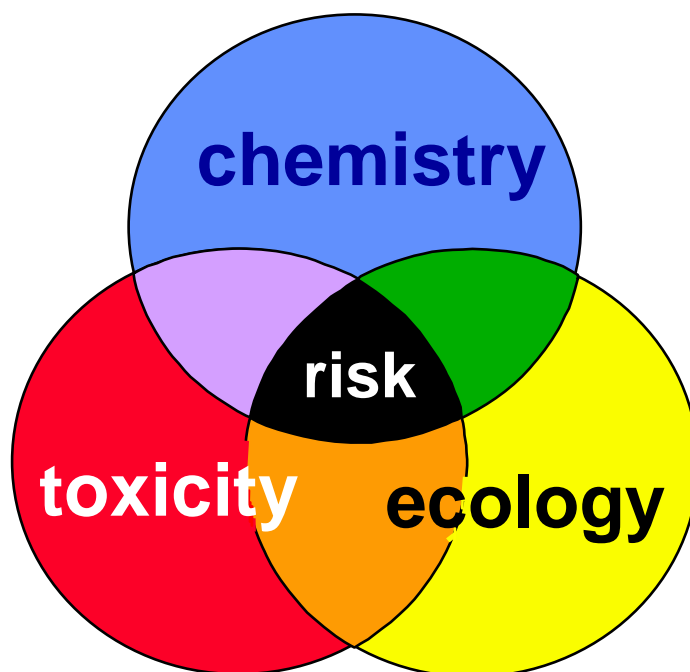
de lokale soorten. Een dergelijke vastgestelde waarde zegt *niet* dat het beleid aangeeft hoeveel procent van de soorten mag verdwijnen, maar is de vastgestelde norm die gericht is op het behoud van soorten, gegeven de onzekerheden die de methode met zich meebrengt. Indien de berekende pT-waarde zeer laag is (bv. <0,1%), kan met de huidige kennis gesteld worden dat het (zeer) onwaarschijnlijk is dat de biodiversiteit wordt beïnvloed door de toxiciteit van onbekende stoffenmengsels in het water.



**Figuur 2.** Het modelmatige deel van de bepaling van de msPAF (gemeten) of kortweg pT: de berekening van toxische druk door organische microverontreinigingen uit gemeten concentratiefactoren (De Zwart en Sterkenburg, 2002).

Bioassays resulteren in een bepaald type ecotoxicologische informatie, namelijk: toxiciteitinformatie over onbekende mengsels bij eenvoudig en snel te toetsen soorten. Die informatie kan onderdeel zijn van de klassieke triade-aanpak, waarbij ook informatie verzameld wordt over chemische en ecologische parameters. Tezamen kunnen de drie vormen van informatie erg belangrijk zijn om de status van het ecosysteem in rijkswateren te bepalen (Figuur 3). De ecotoxicologische informatie moet worden geplaatst in een kader samen met chemische en ecologische informatie om duidelijkheid over het ecosysteem te krijgen. Bioassays voorspellen of het waarschijnlijk is dat toxische druk een rol speelt bij (afwijkingen van) GET, maar kunnen niet voorspellen of soorten in een ecosysteem daadwerkelijk aanwezig zullen zijn. De samenstelling van de soorten en de totale biodiversiteit in het ecosysteem moeten worden bepaald door middel van ecologische monitoring op locatie. Als er geen toxiciteit wordt gemeten, zegt dit niet dat de biodiversiteit goed is, alleen dat de biodiversiteit niet beïnvloed wordt door stoffen in het water die meegenomen worden in de toxiciteitsbepaling. Maar als er toxiciteit gemeten wordt, kan mogelijk worden aangegeven of soorten er niet zijn door de toxiciteit van het water. Er kan een vertaalslag worden gemaakt van PAF naar 'Potentially Disappeared Fraction (PDF)' of (potentieel) verlies van soorten. Deze vertaalslag kan worden gemaakt door ecologische informatie uit acute waarden van bioassays te bepalen. Deze pT-waarde bij Cf=1 geeft aan welk percentage soorten er waarschijnlijk door de toxiciteit van het water verdwijnt. Deze berekening van de PDF of verlies van soorten is sterk afhankelijk van de steilheid van de PAF-curve. Extra kennis over de nu nog ontbrekende groepen organismen in bioassays is nodig om deze voorspellingen te toetsen. Hierbij moet wel in acht worden genomen dat het ecosysteem complex

is. Bioassays kunnen geen inzicht geven in interacties tussen soorten (predatie en competitie) en cascade effecten. Ecologische data zijn nodig om het onderlinge belang van soorten in een ecosysteem in te kunnen schatten. Data voor biodiversiteit hebben een grote natuurlijke variatie en achtergrondruis, waardoor het analyseren erg moeilijk is.



**Figuur 3.** Schematische voorstelling van de triade waarbij de relatie tussen chemie, toxiciteit en ecologie wordt aangegeven.

### 3.4 Relevantie van bioassays voor ecosysteem functioneren

De huidige minister van VROM (Cramer) staat voor een duurzaam gebruik van ecosystemen. Wat is de rol van V&W hierin? Dit houdt mede in dat het functioneren van het ecosysteem niet mag worden aangetast door menselijk handelen. Dit resulteert in goede ecologische kwaliteit, waarbij duidelijk moet zijn of dit gaat over ongestoord of gewenst ecosysteem functioneren. Toxiciteit geïnduceerd door menselijk handelen, kan het ecosysteem aantasten. Als toxiciteit wordt geanalyseerd met behulp van bioassays, is het belangrijk om duidelijkheid te krijgen wat er met bioassays in beeld is te brengen over het functioneren van een ecosysteem in het Nederlandse oppervlaktewater. Functioneren is een betere maat voor de toestand van het ecosysteem dan biodiversiteit, omdat biodiversiteit alleen is gebaseerd op lijsten met soorten, terwijl het functioneren ook de interacties tussen soorten beschouwt. In de KRW wordt echter dit ecosysteem functioneren niet als belangrijke maat in beschouwing genomen.

De pT-waarde (dus, de toxische druk) kan in de toekomst mogelijk ook gebruikt worden als inschatting voor het functioneren van een ecosysteem. Hiervoor moeten nog wel een aantal stappen gemaakt worden. Er moet geanalyseerd worden uit welke functionele groepen de soorten komen die beïnvloed worden door de toxische druk. Bij het mogelijk verdwijnen van functionele groepen wordt het functioneren van het ecosysteem aangetast. Hiervoor zijn de nu gebruikte 5 bioassays echter niet

voldoende, omdat deze een te beperkt beeld geven van het ecosysteem. Dit beeld kan verbreed worden door aanvullende bioassays op soorten en functionele groepen die nu nog niet zijn vertegenwoordigd. Belangrijke groepen die vertegenwoordigd zouden moeten zijn: bacteriën, algen, verschillende groepen kreeftachtigen en insecten, nematoden en mollusken. Effecten op gewervelde organismen (vissen) zijn mogelijk grotendeels te voorspellen aan de hand van functionele bioassays. De Microtox is een model voor de citroenzuurcyclus en data van Microtox bioassays zijn sterk gecorreleerd met visdata (Cronin *et al.*, 1991).

Er wordt verwacht dat de pT, naast de biodiversiteits-indicatie, ook de functionele diversiteit van het ecosysteem weerspiegelt. Voor het functioneren van het ecosysteem moet worden gekeken naar de gevoeligste groepen organismen. De kwaliteit van deze organismen moet worden bepaald om te bekijken of ze aangetast worden door de toxiciteit van het water. De effecten van het wegvallen van groepen organismen op het functioneren van het ecosysteem kan worden geschat. Hierbij moet ook worden bekeken in hoeverre andere aanwezige soorten de functie overnemen van de weggevallen groepen. Ook kan met bioassays worden gekeken naar de mogelijkheden van het ecosysteem om bepaalde substraten te verwerken. Een voorbeeld hiervan geeft de PAM test. Met de PAM test wordt de fotosynthese activiteit van algen gemeten en is een maat voor de primaire productie, ofwel het omzetten van het substraat CO<sub>2</sub> in organische koolstofverbindingen. Als deze substraten minder verwerkt kunnen worden door toxische druk, zal dit de effectiviteit van het ecosysteem beïnvloeden. Natuurlijk moet ook hier in acht worden genomen dat het functioneren van een ecosysteem complex is. Bioassays zijn zwak in het voorspellen van gemeenschapseffecten en cascade effecten en deze interacties moeten in het veld onderzocht worden.



## 4 Conclusies

Toxiciteit-bioassays zijn een (bewezen) goede maat om de toxiciteit van onbekende mengsels in het oppervlaktewater op te sporen en te bepalen. Bioassays zijn inzetbaar voor de monitoring van toxiciteit in het oppervlaktewater of voor het opsporen van bronnen of stofgroepen verantwoordelijk voor de toxiciteit. Hoge toxiciteit gemeten met bioassays betekent dat de toxiciteit in een waterlichaam een belangrijke stress factor kan zijn, en dat maatregelen genomen zouden moeten worden. Een lage toxiciteit impliceert dat het onwaarschijnlijk is dat de toxiciteit van onbekende mengsels een negatieve invloed heeft op de ecologische toestand. Bioassays hebben potentieel de mogelijkheid om de invloed van toxiciteit van onbekende mengsels op het ecosysteem in te schatten. Door bioassays van alle belangrijke groepen organismen uit te voeren, zodat voor alle te verwachten stofgroepen er tenminste één gevoelige test in de testbatterij voorkomt, kan de relatieve gevoeligheid voor de aanwezige toxische stoffen van soorten bepaald worden, alsmede kan zeker gesteld worden dat een negatieve uitkomst (geen toxiciteit van onbekende mengsels) inderdaad over alle relevante stofgroepen gaat. Hieruit kan worden bepaald of bepaalde soorten mogelijk zullen verdwijnen, en/of welke stofgroepen lokale effecten zouden kunnen hebben. Bioassays kunnen zo gebruikt worden om de invloed van toxiciteit op biodiversiteit in het water te bepalen. Gecombineerd met ecologische kennis over de functie van de mogelijk verdwenen soorten, kunnen deze resultaten ook indicaties geven over het functioneren van het ecosysteem. Met behulp van bioassays is echter geen uitspraak mogelijk over het bereiken van GET, omdat de ecologische toestand ook afhankelijk is van andere stress factoren welke niet worden bestudeerd met bioassays. Karakterisering van de ecologische toestand in het veld blijft nodig om de GET te bepalen. Bioassays kunnen wel bijdragen aan de oplossing waarom de ecologische toestand niet de gedefinieerde GET bereikt. Resultaten uit bioassays kunnen helpen met de prioritering van vervolgonderzoek op die plaatsen waar dat nodig is. Voor diverse situaties is daarvoor in principe een batterij aan middelen beschikbaar, waarbij gefocuseerd kan worden op de identificatie van de sterkst toxische stofgroep in het mengsel, bijvoorbeeld via Bioassay Direct Fractionation, of Toxicity Identification Evaluation. Beide zijn breed geaccepteerde werkwijzen, om vermoedens van toxische effecten van mengsels te analyseren teneinde de preciese bronnen van toxiciteit op te sporen en aan te pakken. Als hoofdconclusie geldt, dat bioassays niet wel- of niet nuttig zijn, maar dat ze een bewezen nut hebben in bepaalde fasen van onderzoek naar afwijking van de GET, op een manier die niet door andere methoden wordt gedekt, hetzij inhoudelijk, hetzij qua kosteneffectiviteit.

## 5 Benodigd toekomstig onderzoek

Onderzoek in de nabije toekomst kan verdere duidelijkheid scheppen over de interpretatie en validatie van bioassay-resultaten. Nadruk ligt hierbij op monitoring van rijkswateren om bioassay-resultaten te koppelen aan chemische en ecologische gegevens en methodische verbeteringen voor bioassays. Speciale aandacht is nodig om bioassays te kunnen vertalen naar biodiversiteit (GET) en het functioneren van het ecosysteem. Vervolg studies, naast de in punten 3.3 en 3.4 genoemde zaken, zouden moeten gericht zijn op de volgende aspecten:

### Monitoring

De bioassays geven vooralsnog een duidelijk, maar relatief beeld van de toxiciteit van mengsels. Met andere woorden: de resultaten zijn van belang (“hoger is erger, en erger leidt waarschijnlijk tot grotere afwijkingen van GET”), maar de relatie tussen bioassay-resultaten en afwijking van GET is nog niet bewezen. Dit punt leidt tot de vraag: hoe verhouden bioassay-resultaten zich tot afwijkingen van GET? Is de relatie 1:1 (relatieve maat krijgt absolute betekenis?), of is de relatie (ook) duidelijk maar niet 1:1? Dit is ook afhankelijk van het gebied. Om dit te onderzoeken moeten bioassay-gegevens gekoppeld worden aan (bestaande) monitoring-databestanden. Er zijn meer monitoring data nodig waarbij bioassays, chemische water analyses en veldgegevens over biodiversiteit en dichtheden van soorten gelijktijdig gemeten worden (triade benadering). Op dit moment zijn er nog onvoldoende datasets waarbij deze factoren onderling vergeleken kunnen worden. Overige (a)biotische stressfactoren voor het ecosysteem moeten bepaald worden om de relatieve invloed van toxische stress te kunnen bepalen t.o.v. totale stress. Hierbij moet vooral gedacht worden aan eutrofiering en hydromorfologie. Gezamenlijk bepalen de stressfactoren hoeveel druk er op het aquatisch ecosysteem aanwezig is. Bij hoge stress kan het mogelijk zijn dat de GET niet wordt gehaald door een of meerdere stressfactoren.

Door Peeters (2001) is in verschillende sedimentatiegebieden in het Rijnstroomgebied gekeken naar verklarende factoren voor effecten op macrofauna. Ecologische en ecotoxicologische waarnemingen zijn vergeleken met chemische gegevens van de locaties. Ecologische factoren, zoals diepte, organisch koolstof, verklaarde voor ca. 17% de variatie in macrofauna. Contaminanten verklaarden voor 14% de variatie. Ongeveer 54% bleef onverklaarbaar. In de grote rivieren was de verklaarbaarheid van contaminanten hoger (gem 30%).

### Methodische verbeteringen

*Watermonster sampling*- Door de gebruikte sampling van de watermonsters gaat het vooral om chronisch aanwezige stoffen, tenzij er precies tijdens een acute piek gemonsterd wordt. Langere interval gegevens over het voorkomen van toxische stoffen in het water kunnen een beter beeld geven van de toxische stress waaronder organismen leven in het water. Dit kan gemeten worden door het plaatsen van adsorberend hars in het water voor een langere periode (dagen/weken) en vervolgens het opwerken van het hars zoals gebruikelijk voor het verkrijgen van concentraten voor bioassays. Ook kunnen andere methoden voor passieve sampling gebruikt worden. Dit kan meer representatieve gegevens opleveren over de toxiciteit over tijd.

*Concentratie methode*- Bioassays geven een beeld van de toxiciteit van stoffen in het water die worden meegenomen in de methode van concentreren van de stoffen in het water. Met de meest gebruikte methode op dit moment (XAD-hars) gaat het om persistente apolaire organische stoffen. Deze groep stoffen bevat veel potentieel toxische stoffen. Ondanks dit beperkte deel van het chemische spectrum dat wordt bekeken, geven bioassays een beter inzicht van de toxiciteit dan chemische analyses van individuele stoffen.

Er moet meer aandacht gegeven worden aan concentratie technieken voor andere stoffen (de niet apolaire organische verbindingen) om alle stoffen mee te nemen in de bioassays. Deze mogelijkheden zijn op dit moment nog onvoldoende onderzocht (maar zie Collombon, 2007). Concentratie technieken moeten ongeveer gelijke efficiëntie hebben voor de doelgroep stoffen. Concentraten zouden apart en gezamenlijk moeten worden gebruikt in bioassays om de totale toxische druk te bepalen. Concentreren is de eerste stap van de toxiciteit-bioassays en vormt daarmee tegelijk het fundament van de methode. De mogelijkheid om bioassays met de verschillende stof groepen aanwezig in het water uit te voeren, kan alle sceptische en negatieve oordelen over bioassays in een keer doen verdwijnen.

*Specifieke bioassays*- Nieuwe inzichten in het voorkomen van specifieke groepen stoffen in het oppervlaktewater, zoals endocrien versturende stoffen, geneesmiddelen en antibiotica, kunnen resulteren in specifieke invloeden op het ecosysteem. Deze invloeden zijn op dit moment onbekend. Inzetten van nieuwe specifieke bioassays voor het bepalen van deze specifieke groepen stoffen is noodzakelijk. Specialistisch op locatie te kijken met specifieke bioassays kan inzicht geven op de effecten van deze stoffen. Ook de methode van extraheren in relatie tot specifieke stoffen is hierbij van belang.

*Valideren en ontwikkelen bioassays*- De huidige set van bioassays is voldoende gevalideerd (Durand *et al.*, in prep.). De huidige set van bioassays kan verder worden aangepast met nieuw te ontwikkelen bioassays, indien deze laatste betere resultaten blijken te geven. Hierbij kan gedacht worden aan het vervangen van Thamnotox door de Chydotox toets. Voor deze relatief nieuwe testen is de validatie nog niet voldoende afgerond. Hierbij moet wel in acht worden genomen dat het vervangen van bioassays langtermijn monitoringsresultaten beïnvloedt, omdat resultaten uit verschillende sets van bioassays niet vergeleken kunnen worden. Indien de nieuwe bioassays echter een grote verbetering geven, bv. doordat ze een beter beeld van de voorkomende soorten in het ecosysteem of de totale toxiciteit van mogelijk aanwezige stoffen geven, kan het vervangen overwogen worden.

## **Dankwoord**

De volgende experts hebben hun medewerking verleend aan het opstellen van dit briefrapport: Aart Sterkenburg, Barry Pieters, Christian Mulder, Dick de Zwart, Dik van de Meent, Esther van der Grinten, Evert-Jan van den Brandhof, Jaap Struijs, Leo Posthuma, Michiel Rutgers, Patrick van Beelen, Ton Breure, Wilko Verweij, Willie Peijnenburg (allen van het RIVM/MEV/LER) en Tom Aldenberg (RIVM/V&Z/EMI).

## Referenties

- Collombon MT (2007) Concentration of 'forgotten' substances using the XAD concentration method – Suitability of the method for hydrophilic chemicals. RIVM Letter Report 607013001.
- Cronin MTD, Daerden JC, Dobbs AJ (1991) QSAR Studies of comparative toxicity in aquatic organisms. *Science of the Total Environment* 109/110: 431-439.
- Derksen JGM, Spier JL, Maas JL, Vethaak AD (2004) Bioassays onder de loep – Selectie van bioassays voor zoet, zout en brak oppervlaktewater. RIZA rapport 2004.012.
- Durand A, Rotteveel S, Collombon M, Van der Grinten E, Maas JL, Verweij W (2007) Toxicity measurements in Concentrated Surface Water Samples. Evaluation and validation. RIVM/RIZA in preparation.
- De Groot AC, Wouterse MJ, Van Dijk GG, Mulder C (2007) De bepaling van toxische druk in Rijkswateren. RIVM rapport 607013002.
- De Zwart D, Sterkenburg A (2002) Toxicity-based assesment of water quality. *In* Posthuma L, Suter II GW, Traas TP (eds) *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 383-402.
- Hendriks AJ, Maas-Diepeveen JL, Noordsij A, Van der Gaag MA (1994) Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine delta: A major part of the toxic compounds remains unidentified. *Water Research* 28 (3): 581-598.
- Maas JL, Van den Heuvel-Greve MJ (2005) Opportunities for bio-analysis in WFD chemical monitoring using bioassays. RWS-RIZA working document 2005.053X.
- Peeters ETHM (2001) Benthic macroinvertebrates and multiple stressors. Quantification of the effects of multiple stressors in field, laboratory and model settings. Thesis Wageningen University, the Netherlands. pp 168.
- Posthuma L, De Zwart D (2006) Predicted effects of toxicant mixtures are confirmed by changes in fish species assemblages in Ohio, USA, rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (4): 1094-1105.
- Posthuma L, Suter II GW, Traas TP (2002) *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 383-402.
- Raimondo S, Montague BJ, Barron MG (2007) Determinants of variability in acute to chronic toxicity ratios for aquatic invertebrates and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (9): 2019-2023.
- Roex E, Rotteveel S, Ferdinandy M, Bakker V (2007) Totaal-effluentbeoordeling in de praktijk. *H<sub>2</sub>O* 10: 55-57.
- Struijs J, De Zwart D (2003) Evaluatie van pT – De bepaling van toxische druk in water. RIVM rapport 860703001.

**RIVM**

Rijksinstituut  
voor Volksgezondheid  
en Milieu

Postbus 1  
3720 BA Bilthoven  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)