



Briefrapport 607013008/2008

E.M. Dirven et al

De potentiële toxiciteit van oppervlaktewateren

Gemeten in 2007 op vijf locaties in de rijkswateren

RIVM briefrapport 607013008/2008

De potentiële toxiciteit van oppervlaktewateren Gemeten in 2007 op vijf locaties in de rijkswateren

E.M. Dirven, RIVM
E. Steenbergen, RIVM
M.J. Wouterse, RIVM
R. Scheper, Waterdienst
H. Maas, Waterdienst
S. Rotteveel, Waterdienst
E. van der Grinten, RIVM

Contact:
E. van der Grinten
LER
E.van.der.Grinten@RIVM.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van VROM, in het kader van MAP project M/607013, ontwikkeling en toepassing bioassays

© RIVM 2008

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

Rapport in het kort

De bepaling van toxische druk Rijkswateren in 2007

In 2007 is een aantal grote rivieren in Nederland, met behulp van bioassays, onderzocht op toxische druk. Op één van de vijf locaties bleek de toxische druk verhoogd te zijn. Het oppervlaktewater uit de Maas (Eijsden) bleek het gehele jaar 2007 een verhoogde potentiële toxiciteit te hebben in vergelijking met de andere bemonsterde locaties van dat jaar. De hoogste pT-waarde werd in februari gemeten (Eijsden 6 %). 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 losgemaakt, waarna een concentraat van de giftige stoffen ontstaat. Op dit mengsel zijn vijf testen losgelaten, die het effect van de stoffen op microscopische kleine organismen in water meten: Algentest (algen), Daphnia test (watervlo), Microtox-test (bacterie), Thamnotox (kreeftachtige) en Rotox (rotifeer).

De metingen zijn uitgevoerd in samenwerking met Rijkswaterstaat en Waterdienst, voor het project 'Ontwikkeling en toepassing van bioassays voor de beoordeling van waterkwaliteit.'

Trefwoorden / Key words:

Potentiele toxiciteit, bioassay, oppervlaktewater

Abstract

Toxic potency of surface waters of the Netherlands 2007

In the year 2007, several surface waters were sampled for a toxicity measurement. The work reported here is part of the RIVM research program “Monitoring and diagnosis surface water” and was carried out in cooperation with Rijkswaterstaat en Waterdienst.

In this report results of the toxic potency (pT) of five locations in the Netherlands are described. The toxic potency was attributed to organic substances in the surface water.

The organic substances in the water were concentrated by adsorption onto a resin that was sieved out and acetone-eluted. Contaminants were transferred to a (EPA) test medium by Kùderna-Dànish distillation. A set of five toxicity measurements on microscopic organisms was carried out. These tests are Algae, Microtox-test, Rotox, Thamnotox, and Daphnia IQ test. Results of the toxicity data from five sites were subsequently converted to toxic potency. The general conclusion of the research is that the measured toxic potency of the location Eijsden in the river Maas was, during the whole year, the highest of all tested Dutch surface waters in 2007. In februari, 6% of the species were potentially exposed at toxic levels exceeding the No Observed Effect Concentration (NOEC).

Trefwoorden / Key words:

Toxic potency, bioassay

Inhoud

1	Inleiding	6
1.1	Probleemstelling	6
1.2	Doel van het onderzoek en aanpak	6
1.3	Leeswijzer	7
2	Materiaal en methode	8
2.1	Monstername	8
2.2	Het concentreren van de watermonsters	9
2.3	De blanco	9
2.4	Kuderna-Dänish (KD)	10
2.5	Toxiciteitbepaling	10
2.5.1	Algentest (PAM)	10
2.5.2	Daphnia IQ test	11
2.5.3	Thamnotox-toets	11
2.5.4	Rotox-toets	12
2.5.5	Microtox-test	12
2.6	Berekeningswijze potentiële toxiciteit	12
3	Resultaten	14
3.1	Algemeen	14
3.2	De blanco	14
3.3	De gemeten toxiciteit	15
3.4	Berekening potentiële toxiciteit (pT)	16
4	Discussie en Conclusie	18
5	Aanbevelingen	19
	Referenties	20

1 Inleiding

1.1 Probleemstelling

Het milieu wordt belast met chemische verontreinigingen door 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 verschraling van de biodiversiteit of verandering van natuurlijke gemeenschappen. Deze verschuiving van de soortensamenstelling in flora en fauna is te meten. Om veranderingen van het ecosysteem aan te kunnen tonen, zijn er in het verleden verschillende monitoringsprogramma's opgestart. Eén methode om het aquatisch ecosysteem te monitoren is het analyseren van chemische verontreinigingen in het oppervlaktewater om zo de chemische belasting op 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 gemeten, waardoor het verkregen beeld incompleet is. Daarbij komt dat er geen volledig overzicht is van alle aanwezige stoffen en hun afbraakproducten. Daarnaast worden in oppervlaktewater steeds nieuwe probleemstoffen geïntroduceerd.

Een complicerende factor bij het inschatten van de toxiciteit van oppervlaktewater op basis van concentraties is dat over het algemeen het niet duidelijk is hoe combinaties van stoffen op organismen inwerken. Daarbij zijn voor vele stoffen en afbraakproducten geen toxiciteitsgegevens beschikbaar. Een bijkomend probleem van chemische 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. Daardoor is het moeilijk de vertaalslag te maken van chemische druk naar toxische druk.

1.2 Doel van het onderzoek en aanpak

Om toch een beeld te krijgen van de toxische druk in het aquatische ecosysteem, wordt de toxiciteit van het oppervlaktewater na een concentratie procedure bepaald door het testen van 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 ecosysteem.

Van elk oppervlakte water monster worden de resultaten van de vijf toxiciteitstoetsen gebruikt om een gevoeligheidsverdeling van soorten te schatten die model staat 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.

In het kader van het project Ontwikkeling en toepassing bioassays voor de beoordeling van waterkwaliteit is vanaf 1996 de toxiciteit bepaald van diverse oppervlaktewateren. In 2007 werd van de volgende locaties tweemaandelijks de toxiciteit bepaald: Lobith, Keizersveer, Vrouwenzand, Markermeer en Eijsden.

De toxische druk is een maat waarmee de toxicologische risico's van het oppervlaktewater worden gekwantificeerd in termen van potentiële Toxiciteit (pT). De pT is de combinatie van de drie hier onder genoemde onderdelen: het milieuchemisch deel, het ecotoxicologisch deel en tenslotte de Risico berekeningen deze laatste wordt in paragraaf 2.6 uitgelegd.

- 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 het oppervlaktewater bij kortdurende toxiciteitbepalingen niet toxisch genoeg is om te detecteren met acute toxiciteits testen. Nadeel van deze opwerkingstechniek is dat de terugvindbaarheid ca. 75% bedraagt, op basis van de stoffen die in de KRW genoemd zijn, hiervoor wordt niet gecorrigeerd (Struijs et al., 2001). Omdat iedere stof zijn eigen terugvindbaarheid heeft.

- 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 organismen worden blootgesteld aan water, sediment, effluent of baggerspecie, of extracten daarvan. Deze testen worden uitgevoerd in het laboratorium. De proeven kunnen kortdurend zijn (van enkele uren tot dagen) waarmee acute effecten kunnen worden vastgesteld, of langdurig (dagen-weken), waarmee chronische effecten (bv op de voortplanting) kunnen worden vastgesteld. Voor de pT-methode is om praktische en economische redenen voor kortdurende proeven gekozen.

- Risicoberekeningen

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 risicoschatting worden getoetst aan de voorgestelde normen voor in-vivo bioassays (Maas et al., 2003).

Het onderzoek is verricht in samenwerking met Rijkswaterstaat en Waterdienst, waarbij Rijkswaterstaat de bemonstering van het oppervlaktewater uitvoerde, de Waterdienst de Daphnia IQ test en de Microtox-test heeft uitgevoerd en Aquasense de Thamnotox-toets en de Rotox-toets heeft uitgevoerd.

Het oppervlaktewater werd door het RIVM opgewerkt tot waterextracten waarmee de toxiciteitstoetsen werden uitgevoerd. De Algentest werd uitgevoerd bij het RIVM.

1.3 Leeswijzer

In hoofdstuk 2 worden de gebruikte materialen en methoden beschreven. Daarin wordt uitgelegd hoe het oppervlaktewater 1000 keer wordt geconcentreerd en welke toxiciteitstoetsen worden gebruikt. In hoofdstuk 3 worden de resultaten gegeven en bediscussieerd. De conclusie en aanbevelingen staan respectievelijk beschreven in hoofdstukken 4 en 5.

2 Materiaal en methode

2.1 Monstername

Rijkswaterstaat heeft de tweemaandelijks bemonstering uitgevoerd. Er is een oppervlakte-watermonster genomen van minimaal 80 liter. Het monster (incl. zwevende stof) is verzameld in roestvrij stalen vaten van 25 liter. Na aflevering bij het RIVM zijn de monsters direct in behandeling genomen voor extractie m.b.v. XAD. In figuur 1 zijn de bemonsteringslocaties in kaart gebracht en in Tabel 1 staan de XY-coördinaten van de bemonsteringslocaties weergegeven en de bemonsterings data.

Tabel 1 Locaties, coördinaten en bemonsteringsdata 2007

Locatie	XY-coördinaten		Bemonsteringsdata					
	X	Y						
Eijsden	177000	310000	13-feb	10-april	05-jun	31-jul	25-sep	20-nov
Lobith	203500	429750	14-feb	11-april	06-jun	01-aug	26-sep	21-nov
Vrouwenzand	155400	535900	06-feb	03 april	30-mei	24-jul	18-sep	13-nov
Keizersveer	121070	414560	13-feb	10-april	05-jun	31-jul	25-sep	20-nov
Markermeer-Midden	143610	504350	08-feb	05-april	31-mei	26-jul	20-sep	15-nov

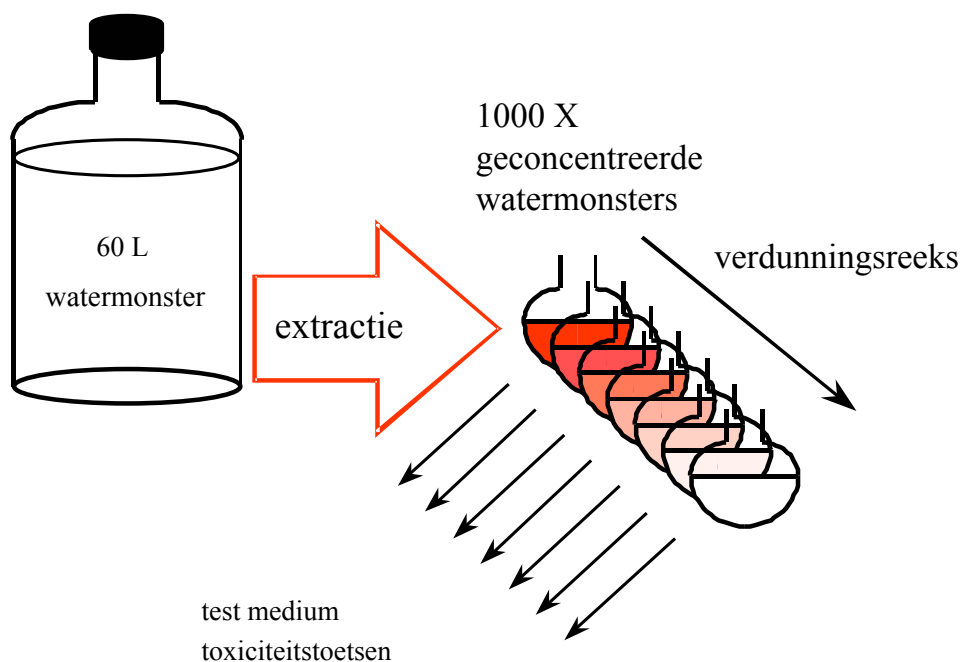


Figuur 1 Geografische weergave van de bemonsteringslocaties

2.2 Het concentreren van de watermonsters

De opwerkingsmethodiek van het oppervlaktewater bestaat uit het extraheren en concentreren van organische microverontreinigingen. Anorganische toxicanten, waaronder metalen, zouten en nutriënten worden niet met deze techniek geëxtraheerd.

Het oppervlaktewater met het daarin aanwezige zwevende materiaal wordt 48 uur geschud met een hars (XAD 4 en 8) waaraan de aanwezige organische microverontreinigingen zich binden. Het hars wordt vervolgens gescheiden van het water en overnacht gedroogd aan de lucht, waarna het bij RIVM wordt geëluëerd met aceton. Het aldus verkregen extract wordt in een vriezer bij -20°C bewaard voor verdere opwerkingen. De opwerkprocedure van oppervlaktewater naar de aceton-fase is in detail door Struijs et al. (2001) beschreven.



Figuur 2 Procedure voor het opwerken en toetsen van oppervlaktewater.

2.3 De blanco

De blanco die tijdens de opwerkingsmethodiek werd meegenomen bestond uit 6 monsters van ieder 10 liter Spa blauw, deze kwam uit PET-flessen van 1,5 liter. Het Spa blauw komt bij de groothandel vandaan. Deze PET-flessen zijn uit polyetheen-tereftalaat gemaakt en worden na gebruik vergruisd. De blanco wordt meegenomen om het opwerkingsproces te controleren. Ook al wordt er altijd met de juiste zorgvuldigheid gewerkt toch is het mogelijk dat tijdens het opwerken het monster gecontamineerd wordt. Door bijvoorbeeld vervuild XAD, de slangen van de pomp niet schoon zijn of het glaswerk. Het analyseren van dit soort blanco's is een moment opname en blijft altijd een globale inschatting. Het is nooit zeker of er in de monsters zelf iets is gebeurd,

2.4 Kuderna-Dänish (KD)

Eén dag voor het uitvoeren van de toxiciteitstoetsen worden de acetonconcentraten op het RIVM opgewerkt naar de water-fase. Vervolgens wordt het monster wat in water-fase zit gedeeld en over de laboratoria die de bioassays uitvoeren verdeeld. 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 methode is door Struijs et al. (2001) beschreven.

2.5 Toxiciteitbepaling

Om de toxiciteit van het geconcentreerde oppervlaktewater te bepalen wordt er eerst een verdunningreeks gemaakt (zie figuur 2). Met deze verdunningsreeks wordt de toxiciteit bepaald. Hiervoor worden vijf toxiciteitstoetsen met verschillende organismen gebruikt. Voor elke toets kan een dosis-respons curve worden berekend, waaruit een EC_{50} of LC_{50} kan worden afgeleid. Omdat dit niet een standaard EC_{50} of LC_{50} op basis van een concentratie van een stof betreft maar een concentratiefactor van een milieumonster waarbij 50% van de organismen effecten ondervindt, wordt in dit rapport verder gesproken over een EC_{50}^f of LC_{50}^f .

Met andere woorden, wanneer er voor een toxiciteitstoets een EC_{50}^f van 10 gerapporteerd wordt, betekent dit dat het oppervlaktewater 10 keer geconcentreerd moet worden om deze EC_{50} te meten. De toxiciteit is omgekeerd evenredig 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.

Tabel 2 Toxiciteitstoetsen (bioassays) voor het testen van de toxiciteit van de opgewerkte monsters

Toets	Organisme	Toetsduur	Toxicologische Observatie	Toxicologische Parameter
Algen test (PAM)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	4,5 uur	Fluorescentie na aanslaan Fotosynthesysteem	EC_{50}^f (E=remming op fotosynthese)
Daphnia IQ	<i>Daphnia magna</i>	1 uur 15 min	Luminescentie	EC_{50}^f (E=afname enzymactiviteit)
Thamnotox	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	24 uur	Sterfte	LC_{50}^f
Rottox	<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)

2.5.1 Algentest (PAM)

De Algentest van Van Beusekom et al. (1999) wordt uitgevoerd met het testorganisme *Pseudokirchneriella subcapitata*. 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. Dit wordt gemeten met de parameter yield die een maat is voor de fotosynthese efficiëntie. Wanneer 50% van de yield wordt gemeten ten opzichte van de yield van de controle is dat de uitkomst van de test. De verdunning van het concentraat waarbij deze lichtopbrengst wordt gemeten is de EC_{50}^f . De toets is gevoelig voor herbiciden die aangrijpen op het fotosysteem II en is relatief ongevoelig voor narcotische verbindingen en detergenten (Vaal en Struijs, 2002).

2.5.2 Daphnia IQ test

In de Daphnia 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 emitteert 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).

2.5.3 Thamnotox-toets

De Thamnotox-toets 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).

2.5.4 Rotox-toets

De Rotox-toets 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 de rotifeer *Brachyonus calyciflorus* wordt op vergelijkbare wijze uitgevoerd als de Thamnotox-toets. Ook dit organisme is als cyste beschikbaar. De eieren komen na 16-18 uur onder continue beluchting uit in een gestandaardiseerd medium. Voor deze test wordt een multiwell plaat gebruikt met een well-volume van 0,3 ml. Per well 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. In vergelijking met de eerdere genoemde toetsen, is de gevoeligheid van de Rotox-toets voor organische microverontreiniging onbekend.

2.5.5 Microtox-test

Bij de Microtox-test (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 Microtox-test. 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 toxiciteitstoets is gevoelig voor narcotische stoffen en detergents en ongevoelig voor pesticiden (Vaal en Struijs, 2002).

2.6 Berekeningswijze potentiële toxiciteit

De eindpunten van de toxiciteitsmetingen 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-Observed Effect Concentration factor ($NOEC^f$) wordt berekend uit de gemeten EC_{50}^f of de 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 de 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):

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

2

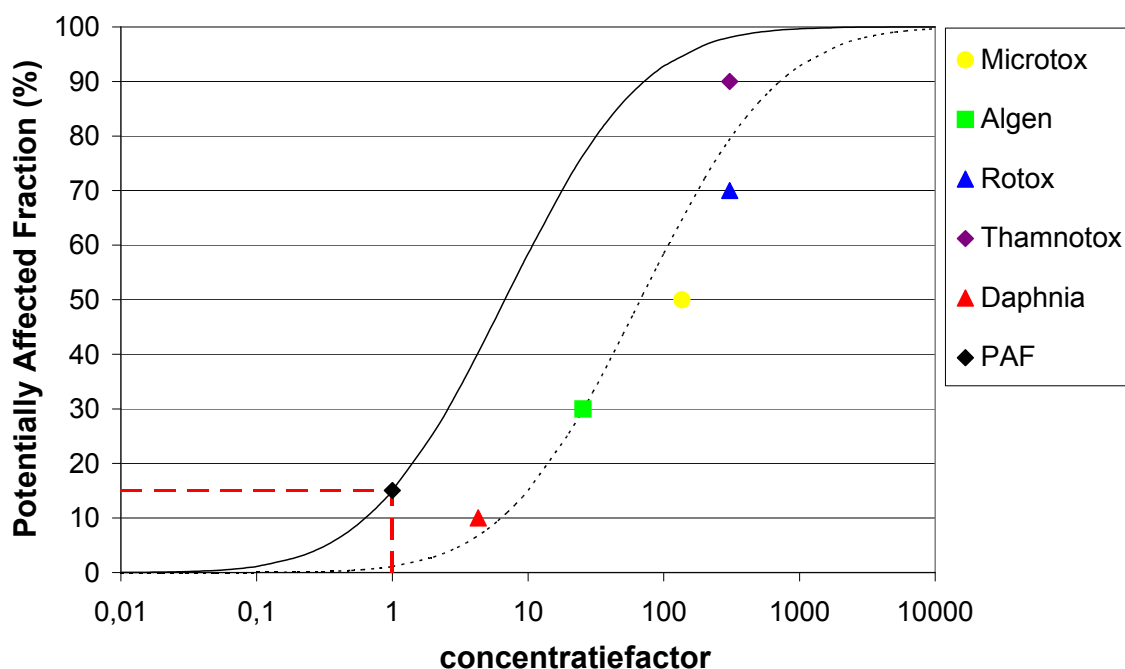
Hierin is α het gemiddelde van de log getransformeerde NOEC^f-waarden van de verschillende soorten:

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

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

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

De potentiële toxiciteit (pT) van het actuele oppervlaktewater wordt berekend door in formule 2 voor C^f het getal 1 in te vullen (de waarde voor het ongeconcentreerde oppervlaktewater monster). In figuur 3 wordt de bovenstaande berekening grafisch weergegeven in een gevoeligheidsverdelingscurve.



Figuur 3 De gevoeligheids verdelings curve. De concentratiefactor van het oppervlakte water monster uitgezet tegen de potentiële aangetaste fractie of wel de potentiële toxiciteit.

3 Resultaten

3.1 Algemeen

In 2007 zijn voor een aantal locaties en bemonsteringsdata geen resultaten voor de bioassays Thamnotox en Rotox gerapporteerd doordat deze monsters bij het uitvoeren van deze bioassays verloren zijn gegaan.

In tabel 3 worden de locaties en bemonsteringsdata weergegeven waarbij er géén resultaten van de Thamnotox en Rotox gerapporteerd zijn. Doordat deze twee bioassays niet meegenomen zijn in verdere mathematische bewerkingen heeft dit met name invloed op de spreiding van de berekende potentiële toxiciteit. In het geval dat met drie bioassays de potentiële toxiciteit uitgerekend wordt, zal de spreiding rondom het berekende pT-getal groter worden vergeleken met een standaard berekening op basis van vijf bioassays. Van het monster in juni van Markermeer (code 070601MAR) is een zesde deel van het oppervlakte water monster verloren is gegaan. Doordat één van de zes 10 liter flessen tijdens de extractie procedure gebroken is.

Tabel 3 Overzicht van locaties en monster datum waarop geen resultaten zijn voor de Thamnotox en Rotox.

Locatie	Bemonsteringsdatum
Eijsden	13-02-07, 10-04-07
Lobith	15-02-07, 11-04-07
Keizersveer	13-02-07, 10-04-07
Vrouwenzand	06-02-07, 03-04-07
Markermeer	08-02-07, 05-04-07

3.2 De blanco

De resultaten van de bioassays van het blanco monster staan in tabel 4.

Tabel 4 De resultaten van de bioassays in Spa blauw. C^f is concentratie factor, bi is betrouwbaarheids interval.

monster	Daphnia IQ		Microtox		Thamnotox		Rotox		PAM	
	EC ₅₀ (C ^f)	bi	EC ₅₀ (C ^f)	bi	EC ₅₀ (C ^f)	bi	EC ₅₀ (C ^f)	bi	EC ₅₀ (C ^f)	bi
070404 BL	>500	-	854	682-1181	-	-	-	-	375	351-401
070601 BL	>500	-	647	503-832	>1000	-	>1000	-	410	385-437
070727 BL	>500	-	433	300-624	>1000	-	>1000	-	352	327-379
070919 BL	>500	-	1066	578-1960	>1000	-	>1000	-	298	283-314
071116 BL	>500	-	981	641-1500	>1000	-	>1000	-	334	305-366

Hieruit blijkt dat één keer een effect bij de PAM test is gevonden in monster 070919BL, de EC₅₀ is beneden de C^f 300. De ervaring leert dat in de blanco de EC₅₀ boven de 300 zou moeten zijn. Tijdens de opwerkprocedure van dit oppervlaktewater, bij de KD-extractie (zie par 2.4) zou er wat aceton in het monster achter gebleven kunnen zijn. Dit omdat het XAD waarschijnlijk niet goed gedroogd is, er zat ongeveer 1.8 g gram water-aceton aan XAD. Het residu na KD-extractie was vervolgens c.a. 2.7 ml. Uit

testen met Daphnia blijkt dat een water-aceton residu van 6 ml effect heeft en bij PAM testen ligt deze waarde nog veel hoger. Aceton is daarom waarschijnlijk niet de oorzaak. Ook de Microtox-test gaf bij blanco monster 070601BL een kleine verhoging van de toxiciteit. De resultaten van de microtox test waarvan de EC_{50}^f 854, 981 en 1066 is zijn geëxtrapoleerd. Bij 45 vol % extracten is maar een effect van 18 tot 25 % effect aangetoond. Deze EC_{50}^f moeten eigenlijk worden genoteerd als > 1000 .

3.3 De gemeten toxiciteit

De indicatie voor chronische effecten voor bioassays voor twee risico niveaus zijn:

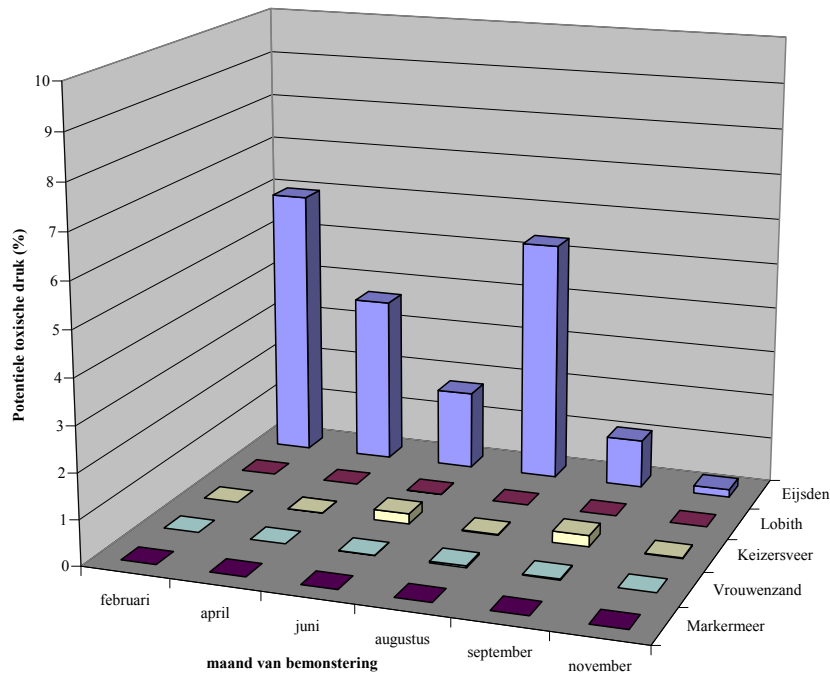
- Chronisch effect wanneer bij op z'n minst één bioassay een EC_{50} groter is dan $10 \times C^f$.
- Een verwaarloosbaar effect wanneer niet meer dan drie bioassays een EC_{50} hebben die kleiner is dan $100 \times C^f$.
- De indicatie van een acuut effect spreekt men als er voor een bioassay een EC_{50} tussen 1 en $10 \times C^f$ gevonden wordt.
- De toxiciteit gemeten in het bemonsterde oppervlaktewater is weergegeven in tabel 5. Daaruit blijkt dat er geen acute toxiciteit gemeten is in de geconcentreerde oppervlaktewatermonsters. De met behulp van bioassays gemeten toxiciteit lag altijd boven de concentratiefactor 10. Voor een aantal locaties en testen kunnen chronische effecten niet uitgesloten worden (EC_{50} tussen C^f 10 en 100).
- De toxiciteit gemeten met de Daphnia IQ test, met het geconcentreerde oppervlaktewater in de Maas bij Eijsden blijkt voor alle metingen hoger dan bij de andere locaties en bij de andere testen. De concentratiefactor (C^f) varieerde, voor Daphnia IQ, gedurende het gehele jaar tussen 19 en 52. In juni en augustus is er met de PAM test ook hoge toxiciteit gemeten in een geconcentreerd monster uit de Maas, met een concentratiefactor van resp. 58 en 71. Ook is er met de Microtox-test een verhoogde toxiciteit gemeten in februari met een concentratie factor van 91.
- In een geconcentreerd oppervlaktewatermonster uit Keizersveer wordt er met de Daphnia IQ test in april, mei en september een verhoogde toxiciteit gemeten, EC_{50} met een concentratiefactor van respectievelijk 71, 98 en 61. De PAM-test (cursief in tabel 5) gaf een verhoogde toxiciteit in de monsters die zijn genomen tussen eind mei en eind september, met een concentratiefactor van respectievelijk 50, 95 en 103. In Vrouwenzand wordt met de Microtox-test een verhoogde toxiciteit in de monsters gemeten die zijn genomen tussen eind mei en eind september, een concentratiefactor van respectievelijk 87, 69 en 90.
- In de geconcentreerde oppervlaktewatermonsters uit Lobith en Markermeer zijn géén aanzienlijke toxiciteits verhogingen met de bioassays gemeten.

Tabel 5 De resultaten van de bioassays van het gemeten oppervlaktewater in 2007. De EC₅₀ is uitgedrukt in concentratiefactor (C^f), bi is betrouwbaarheids interval.

Locatie	Bemonsterings datum	Daphnia IQ		Microtox		Thamnotox		Rotox		PAM		pT		Aantal bioassays
		EC50 Cf	bi 95%	EC50 Cf	bi 95%	EC50 Cf	bi 95%	EC50 Cf	bi 95%	EC50 Cf	bi 95%	5% - 90 %		
Eijsden	13-2-2007	19	14-28	91	91-113	-	-	-	-	261	242-282	6.0	0.14 -52	3
Eijsden	10-4-2007	21	15-32	106	98-115	-	-	-	-	195	181-210	3.7	0.04-48	3
Eijsden	6-6-2007	32	25-41	150	143-158	506	443-577	588	512-674	58	53-64	1.7	0.03-26	5
Eijsden	1-8-2007	12	9.8-16	150	143-158	759	719-792	374	370-375	71	66-77	5.3	0.32-35	5
Eijsden	26-9-2007	31	26-37	153	142-164	676	619-738	750		154	145-163	1.1	0.00-23	5
Eijsden	21-11-2007	52	44-62	134	131-136	737	706-765	572	502-651	254	237-270	0.17	0.00-15	5
Lobith	15-2-2007	126	98-163	119	113-125	-	-	-	-	258	240-278	0.00	0.00-9.1	3
Lobith	11-4-2007	153	125-187	159	14-169	-	-	-	-	188	173-204	-	-	3
Lobith	7-6-2007	149	117-188	261	250-273	726	689-766	948	724-1241	137	127-147	0.00	0.00-6.6	5
Lobith	2-8-2007	128	96-171	263	241-286	897	819-949	642	468-882	231	216-247	0.00	0.00-4.0	5
Lobith	27-9-2007	104	82-132	286	20-392	814	725-914	617	536-709	221	209-235	0.00	0.00-5.0	5
Lobith	22-11-2007	154	134-176	297	274-321	>1000	-	747	705-792	167	154-180	0.00	0.00-5.1	5
Keizersveer	13-2-2007	131	115-149	214	204-225	-	-	-	-	187	175-200	-	0.00-0.69	3
Keizersveer	10-4-2007	71	60-84	216	193-241	-	-	-	-	196	180-214	0.00	0.00-21	3
Keizersveer	31-5-2007	98	86-112	236	208-269	604	543-672	506	418-612	50	47-54	0.23	0.00-16	5
Keizersveer	1-8-2007	154	136-176	236	208-269	849	738-976	712	678-747	95	90-101	0.02	0.00-9.0	5
Keizersveer	26-9-2007	61	44-85	275	24-304	849	738-976	675	598-761	103	97-110	0.25	0.00-16	5
Keizersveer	21-11-2007	104	85-127	187	1780-194	912		695	616-784	175	164-188	0.02	0.00-8.8	5
Vrouwenzand	6-2-2007	231	192-277	488	436-546	-	-	-	-	232	215-251	0.00	0.00-4.5	3
Vrouwenzand	3-4-2007	343	266-443	104	101-107	-	-	-	-	332	313-352	0.00	0.00-18	3
Vrouwenzand	31-5-2007	577	313-1063	87	74-103	>1000	-	>1000	-	325	302-349	0.01	0.00-7.7	5
Vrouwenzand	25-7-2007	370	292-470	69	61-78	>1000	-	720	342-862	251	237-265	0.04	0.00-11	5
Vrouwenzand	19-9-2007	208	172-251	90	83-99	941	-	820	668-1009	232	217-248	0.02	0.00-9.3	5
Vrouwenzand	14-11-2007	341	236-494	339	271-423	>1000	-	>1000	-	290	273-309	0.00	0.00-0.51	5
Markermeer	8-2-2007	263	226-306	498	457-542	-	-	-	-	256	240-273	-	-	3
Markermeer	5-4-2007	266	231-307	920	668-1267	-	-	-	-	380	362-399	0.00	0.00-11	3
Markermeer	1-6-2007	>840		372	303-457	>840	-	>840	-	331	307-357	-	-	5
Markermeer	27-7-2007	922	469-1813	433	300-625	>1000	-	420	286-638	365	340-391	-	-	5
Markermeer	21-9-2007	219	175-273	248	239-257	>1000	-	>1000	-	286	268-306	0.00	0.00-2.5	5
Markermeer	16-11-2007	378	275-519	548	356-844	>1000	-	>1000	-	325	302-350	0.00	0.00-0.07	5

3.4 Berekening potentiële toxiciteit (pT)

Met de formule in paragraaf 2.6 is de potentiële druk van het bemonsterde oppervlaktewater berekend. In onderstaande figuur worden de gevoeligheids verdelings curves weergegeven van de gemiddelde toxiciteit van de verschillende monsterdata van de vijf locaties in 2007. Naarmate het oppervlaktewater meer toxisch wordt zal de curve naar links verschuiven.



Figuur 4 Potentiële druk gedurende het jaar 2007 in het oppervlaktewater

Uit deze figuur blijkt dat Eijsden gedurende het gehele jaar 2007 de hoogste potentiële druk heeft van het bemonsterde oppervlaktewater. In februari 2007 is de hoogste potentiële toxiciteit (6 %) gemeten in het oppervlaktewater van de Maas op locatie Eijsden. Deze potentiële druk is gebaseerd op maar drie bioassays, namelijk de Daphnia IQ test, Microtox-test en PAM en is zodoende niet goed vergelijkbaar met andere bemonsteringen. De hoogste potentiële toxiciteit op basis van alle vijf de bioassays werd ook gemeten in de Maas bij Eijsden in augustus. Deze pT-waarde is 5 %. De gemiddelde potentiële druk op locatie Eijsden in 2007 is 3% (zie tabel 6). In de jaren 2002 en 2005 is de gemiddelde toxische druk op locatie Eijsden hoger. De toxischedruk lag in 2002 tussen 0.3 % en 10 % en in 2005 tussen 0.0 % en 20.1 %. De standaardafwijking is hoog respectievelijk 3.8 % en 7.0 %.

Tabel 6 Gemiddelde toxische druk op locatie Eijsden gedurende 2000-2007 (De Groot et.al. 2007, De Groot et.al. 2008).

Jaar	Gemid.	stdev
2005	8.2	7.0
2002	4.8	3.8
2007	3.0	2.2
2001	1.7	2.1
2000	1.3	1.1
2003	1.1	1.5
2006	0.3	0.4
2004	0.2	0.3

4 Discussie en Conclusie

De toxiciteit bij Eijsden, gemeten met de Daphnia IQ test met het geconcentreerde oppervlaktewater uit de Maas blijkt tijdens alle metingen hoog gedurende het gehele jaar. In juni en augustus wordt er met de PAM test ook hoge toxiciteit (EC_{50}^f) gemeten in de Maas. Daphnia is het meest gevoelig voor pesticiden en de PAM test het meest gevoelig voor herbiciden. Waarschijnlijk komt er in de Maas water verontreinigd met pesticiden terecht en in de zomer maanden ook nog een contaminatie van herbiciden. In de zomer is er vaak ook nog minder water, waardoor concentraties stoffen hoger worden. Lager stroomafwaarts bij monsterpunt Keizersveer wordt er met de Daphnia IQ test in april, mei en september een verhoogde toxiciteit gemeten evenals met de PAM-test tussen eind mei en eind september. De pT-waarde wordt in het geconcentreerde monster van de Maas stroomafwaarts wel lager, met een gemiddelde van 3 % bij Eijsden en stroom afwaarts bij Keizersveer 0.1 %.

In Lobith en Markermeer worden géén aanzienlijke toxiciteits verhogingen met de bioassays gemeten.

In Vrouwenzand wordt met de Microtox-test een verhoogde toxiciteit in de geconcentreerde monsters gemeten die zijn genomen tussen eind mei en eind september, een concentratie factor van resp 87, 69 en 90. Deze toxiciteitstoets is gevoelig voor narcotische stoffen en detergenten.

De gerapporteerde toxiciteit, bepaald door middel van bioassays, zal in de praktijk een onderschatting zijn van de werkelijke toxiciteit. Deze onderschatting is het gevolg van de opwerkingsmethodiek, doordat de gebruikte XAD niet alle stoffen even goed bindt en doordat bij de mathematische bewerking niet wordt gecorrigeerd voor recovery en toxiciteit voor metalen. Ook is de set van vijf bioassays maar een modelsysteem voor het aquatisch ecosysteem. De in het veld aanwezige soorten kunnen gevoelig zijn (ook overgevoeliger). Ook specifieke vaak chronische effecten worden maar met een grove benadering meegenomen (factor 10). In figuur 5 is te zien dat de pT-waarden van Eijsden het gehele jaar verhoogd is in vergelijking met de andere monster locaties.

De blanco metingen van de bioassays in Spa Blauw gaven een enkele keer een lichte verhoging van de toxiciteit.

In 2007 is in de rivier de Maas bij monsterlocatie Eijsden gedurende het gehele jaar de hoogste potentiële toxiciteit gemeten in vergelijking met de bemonsterde locaties Lobith, Keizersveer, Vrouwenzand en Markermeer. De hoogst gemeten pT-waarde in 2007 was 6 %, welke is gemeten in februari 2007 in het geconcentreerde oppervlaktewater van de Maas, op monsterlocatie Eijsden. De gemiddelde potentiële druk op locatie Eijsden in 2007 is 3% (zie tabel 6). In de jaren 2002 en 2005 was de gemiddelde toxische druk op locatie Eijsden hoger met respectievelijk 4.8 en 8.2 %. Dus het jaar 2007 is de potentiële toxische druk niet bijzonder hoog.

Het oppervlaktewater van de Maas bij Eijsden bleek in de meerjarenrapportage de hoogste waarden voor potentiële toxiciteit op te leveren (De Groot et al., 2008).

5 Aanbevelingen

- Naar aanleiding van de gemeten toxiciteit van de afgelopen zeven jaar zou de monitorings frequentie aangepast kunnen worden. Locaties waarbij een relatief hoge toxiciteit gemeten wordt zouden jaarlijks gemonitord kunnen worden en locaties waar lage toxiciteit wordt gemeten zouden minder frequent gemonitord kunnen worden.

Rond de zomerperiode worden regelmatig effecten gevonden bij organismen die gevoelig zijn voor pesticiden en herbiciden. Veel pesticiden en herbiciden worden in deze periode gebruikt in de landbouw. Of er een variatie is tussen de jaargetijden kan uitgezocht worden in de meerjarenrapportage. Maar de verhoogde concentraties in de rivieren kan ook worden veroorzaakt door minder water gedurende zomermaanden. We bevelen daarom een seizoensonderzoek aan.

- De pT-methode richt zich met name op organische micro-verontreinigingen aangezien met name deze stoffen bij de extractieprocedure worden meegenomen. De toxiciteit geïntroduceerd door metalen/nutriënten en sommige (vaak heel polaire) verontreinigingen wordt niet meegenomen in de pT-methodiek. Hierdoor wordt er een onderschatting gemaakt van de totale toxiciteit in het oppervlaktewater. Om deze reden is het aan te bevelen om een methodiek (praktische of mathematische) te ontwikkelen om de toxiciteit geïntroduceerd door metalen mee te nemen in de totale toxiciteit (pT-methode).

- De recovery van micro-verontreinigingen is stof-afhankelijk. Bij de berekening van de potentiële toxiciteit wordt hiermee geen rekening gehouden. Dit resulteert in een onderschatting van de pT-waarde (best-case scenario). Om een reëel beeld te krijgen van de potentiële toxiciteit zou er een correctie hierop kunnen worden toegepast. Het is echter nog niet duidelijk welke factor daarvoor gekozen zou moeten worden en het is experimenteel lastig die factor vast te stellen.

- De afgelopen decennia is voor verschillende aquatische ecosystemen een pT-waarde berekend. Hiermee kan zowel een ruimtelijk patroon als een jaarlijkse trend berekend worden. Een pT van 5% houdt in dat 5% van de aanwezige organismen potentieel worden blootgesteld boven hun NOEC waarde. Tot op heden is er geen duidelijke relatie bekend tussen de gemeten pT-waarde en de ecologie van een aquatisch ecosysteem. Om deze reden is het aan te bevelen om te onderzoeken of er verbanden zijn tussen een gemeten pT-waarde en ecologische data van dezelfde locaties.

Eind 2009 eindigt de huidige monitoringscyclus. Er zal een plan gemaakt worden voor de monitoring vanaf 2010.

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., de Zwart D., (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., Isenberg D.L. (1981). Use of the luminescent bacterial system for the rapid assesment in aquatic toxicity. *ISA Transactions*, 20: 29-33.
- Centeno M.D, Persoone G., Goyvaerts M.P. (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.
- De Zwart D. (2002). Observed regularities in species sensitivity distributions for aquatic species. In L. Posthuma, G.W. Suter II and T.P. Traas (eds) *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, blz 133-154.
- De Zwart D., Sterkenburg A. (2002). Toxicity-based assesment of water quality. In L. Posthuma, G.W. Suter II and T.P. Traas (eds) *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, pp 383-402.
- De Groot A.C., Wouterse, G.G. van Dijk and C. Mulder. De bepaling van de toxische druk in Rijkswateren. RIVM Rapport 607013002 /2007.
- De Groot A.C., Wouterse M.J., Dirven – van Breemen E.M, Maas H., van der Grinten E., Bepaling van de toxische druk in Oppervlakte water in 2006. Report No. 607013007 /2008.
- European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances (EINECS)
EINECS published in O.J. C., 146A, 15.6.1990.
EINECS corrections published in O.J. C., 54/13 01.03.2002, 2002/C54/08.
<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ein>.
- Maas J.L., van de Plassche E.J., Straetmans A., Vethaak A.D., Belfroid A.C., (2003). Normstelling voor bioassays, RIZA rapport 2003.005, RIKZ rapport nr 2003.007.
- Roghair C.J., Struijs J., de Zwart D. (1997). Measurement of toxic potency of fresh waters in The Netherlands-part A: Methods. RIVM Reports No. 607504004.
- Snell T.W., Persoone G. (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., Persoone G. (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.

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

Struijs J., van de Kamp R.E. (2001). A revised procedure tot concentrate organic micro-pollutants in water. RIVM Report No. 607501001.

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

RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl